

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA - PPGENT

Efeito da temperatura no desenvolvimento de imaturos de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae) de interesse forense

TOHNSON SALES

**Manaus, Amazonas
Abril de 2015**

Tohnson Sales

Efeito da temperatura no desenvolvimento de imaturos de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae) de interesse forense

Orientadora: Dra. Ruth Leila Ferreira Keppler

Coorientador: Dr. Renato Tavares Martins

Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de
Pós-Graduação como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração
em Entomologia.

Manaus, Amazonas

Abril de 2015

Ficha Catalográfica

S163e Sales, Tohnson

Efeito da temperatura no desenvolvimento de imaturos de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae) de interesse forense / Tohnson Sales. --- Manaus: [s.n.], 2015.
86 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.

Orientador : Ruth Leila Ferreira Keppler.

Coorientador: Renato Tavares Martins.

Área de concentração : Entomologia.

Entomologia Forense. 2. Grau-dia. 3. Grau-hora. I.Título

CDD 595.77

Sinopse: Estudou-se o efeito da temperatura no desenvolvimento de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae). Foram ainda fornecidas informações sobre o peso e comprimento das larvas, valores de Grau-dia (GDA) e Grau-Hora (GHA). Os dados fornecidos nessa dissertação servirão de auxílio para a estimativa do IPM (intervalo pós-morte) de cadáveres encontrados na região Amazônica, já que a espécie estudada apresenta importância nos estudos forenses.

1. Entomologia Forense. 2. Suidae. 3. Decomposição. 4. *Paralucilia fulvinota*. 5. Grau-dia e Grau-Hora acumulado.

“Ao longo da história previ muitas coisas – Explicou – Sou o Anjo da revelação e ganhei de meu Pai o dom da visão. No início achei que minha Onisciência estivesse a altura de Deus, mas o livre-arbítrio os homens me surpreendeu e ludibriou meus instintos. Certo dia, enfiando na depressão do infinito percebi meu engano. Ninguém, nem mesmo o Altíssimo, pode prever o futuro. Tudo que vislumbramos são caminhos trajetórias abertas. Cabe a cada um, homem ou anjo, deus ou demônio, escolher seu destino. – Ele discursava como o maior sábio da terra – De minha parte, sempre guardei a esperança e cultuei seu regresso. A certeza não existe, nem a perfeita verdade. Mas sempre nos resta a fé, que nos faz confiar no impossível. E o impossível, com frequência, se torna concreto”

Diálogo entre Ablon e o Arcanjo Gabriel, extraído do livro “A Batalha do Apocalipse – Da queda dos anjos ao crepúsculo do mundo”, de Eduardo Sphor.

Dedico a toda minha família em especial ao meu tio João da Mata Miranda Salles (*in memoriam*) o qual queria que estivesse aqui nesse momento tão especial; pois vocês são a base da minha força para vencer os obstáculos.

Agradecimentos

À Deus por ter me dado força e direção em todos os momentos da minha vida.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo apoio fornecido em minha formação.

À Dra. Ruth Leila Ferreira-Keppler pela orientação e por me acompanhar desde os meus primeiros passos na pesquisa e aos Drs. Renato Tavares Martins pela coorientação, por saber criticar e cobrar quando foi preciso e pela amizade e Margareth Maria Carvalho Queiroz por toda ajuda e colaboração no trabalho, todo apoio fornecido e amizade

Ao Dr. Rubens Pinto de Mello, pela identificação do exemplares de *Paralucilia fulvionota*.

À todos os professores que fizeram parte da minha formação profissional e aos funcionários da Entomologia que de forma direta ou indireta contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação Dr. José Alertino Rafael, Dra. Neusa Hamada, Dra. Karime Bentes, Dr. Renato Tavares Martins e Dra. Cíntia Barreto Chagas pelas contribuições.

Aos técnicos Atman Batista e Arthur Citó, toda a equipe de apoio da Reserva Florestal Ducke (Dona Maria, Arnoldo, Rosivaldo, Rosinaldo, Adailton) pela convivência.

Ao pessoal do Laboratório, Eduarda Denise, Eliane Solar, Daniel de Paula e demais membros do Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos pelo companheirismo, conversas e risadas.

Agradeço a Valdeana Linard, Eurico Humming, Rodrigo Barbosa e Silviane Domiciniano pela ajuda, convivência em campo e amizade.

Aos meus amigos da turma de Mestrado do INPA pela nossa convivência maravilhosa, por muitas risadas e diversão. E a turma do Curso de Entomologia Forense 2014. Vocês são muitos especiais na minha vida.

À minha Família por todo apoio e convivência, vocês são meu pilar de sustentação.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e estiveram presentes nessa etapa.

Este trabalho recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Projeto Institucional INPA/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). PRJ: 12.272.

Muito obrigado!

RESUMO

A Entomologia Forense utiliza informações sobre a biologia dos insetos, principalmente os Diptera Calliphoridae, associados a cadáveres em investigações científicas. A temperatura possui influência na taxa metabólica dos insetos. Geralmente as mais elevadas diminuem o tempo de desenvolvimento e afetam o comprimento e massa corpórea. Este trabalho buscou estudar o efeito da temperatura ambiente (média = $24,5 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$; e umidade média de $84 \pm 3,9\%$) e em cinco faixas de temperatura controlada (20, 23, 26, 29, 32 e 35°C) no desenvolvimento de *P. fulvinota*, fornecendo dados para auxiliar na estimativa do IPM (Intervalo pós-morte) de cadáveres encontrados nesta região. O estudo foi realizado de outubro a dezembro de 2014 na Reserva Florestal Ducke (Manaus-Amazonas). Fêmeas grávidas foram coletadas em um suíno (*Sus scrofa*) de 40 Kg e a partir das posturas foram obtidos os imaturos provenientes de colônias de estoque. O tempo de desenvolvimento em temperatura ambiente foi de 13,13 dias com razão sexual de 0,86 (7 ♂ e 46 ♀). Houve aumento constante do ganho de massa ao longo de cada instar em relação ao comprimento larval. Dados de Graus-dias (190.38) e Graus-horas (4569.24) do tempo total de larva (L1, L2,L3) a adulto, mostram o tempo transcorrido para atingir o período total. O tempo desenvolvimento em temperatura controlada foi maior a 20°C (~25 dias) com razão sexual de 0,3 (7 ♂ e 3 ♀). O menor a 29°C (~11dias) com razão sexual de 0,6 (18 ♂ e 27 ♀). A 23°C foi de 19 dias com razão sexual de 0,45 (13 ♂ e 11 ♀) e a 26°C foi de 13 dias com razão sexual de 0,5 (21 ♂ e 21 ♀). Nas temperaturas de 23° e 26°C houve ganho constante de comprimento enquanto nas demais esse ganho diminuiu. Em relação a massa houve ganho constante, com exceção da temperatura de 29°C . Nas temperaturas de 32 e 35°C não houve desenvolvimento completo. Em temperaturas controladas o limiar ótimo esteve entre 23 e 26°C e em temperatura flutuante em média de $24,5^{\circ}\text{C}$. Para que se possa obter um resultado mais preciso para o cálculo do IPM, ambos resultados (temperatura controlada e ambiente) se complementam, confirmando a influência da temperatura sobre o tempo de desenvolvimento, massa e comprimento. Essa análise se constitui importante ferramenta para entomologia forense e determinação do Intervalo pós-morte (IPM). em cadáveres encontrados na região.

Palavras-Chave: Entomologia Forense; Suidae; Decomposição; *Paralucilia fulvinota*.; Grau-dia e Grau-Hora acumulado.

ABSTRACT

Forensic entomology uses information based on the biology of some insects, mainly Diptera Calliphoridae, which are associated to corpses in forensic investigations. Temperature has direct effect on the metabolism rate. Higher temperatures reduce the development time and has a direct effect on the body mass and length. This research aims at studying the effects of ambient temperature (average temp. =24,5 ± 1,3°C; average humidity 84 ± 3,9%), in 5 different rates of controlled temperature (20, 23, 26, 29, 32 and 35 °C), on the development of *P. fulvinota*, thus generating data to help estimate the PMI (Postmortem Interval) of 5 corpses found in this area. The research was conducted at Reserva Florestal Ducke (Manaus-Amazonas). Five pregnant female mosquitoes were collected when feeding upon a forty-kilo swine (*Sus scrofa*). After being laid, immatures were collected from stock colonies. In ambient temperature, the individuals development took 13 days. Gender ratio was 0,86 (7 ♂ and 46 ♀). There was a constant mass gain through each instar phase in relation to the larvae length. The data in degree day (190.38) and degree hour (4569.24) of the total development time from larvae (L1, L2, L3) to adult reveal the elapsed time to reach the total period. Development time under controlled temperature was longer in 20° C (~25 days) with a gender ratio of 0,3 (7 ♂ and 3 ♀), whereas the shorter was in 29° C (~11 days). Gender ratio: 0,6 (18 ♂ and 27 ♀). At 23° C, 19 days, gender ratio: 0,45 (13 ♂ e 11 ♀) and 26° C, 13 days, gender ratio: 0, 5 (21 ♂ e 21 ♀). At 23° and 26° C there was a consistent length growth, unlikely the other temperatures where the growth rate was decreased. Regarding body mass there was gain in all temperatures apart from 29° C. At 32° and 35° C incomplete development occurred. Under controlled temperatures the optimal temperatures ranged between 23 and 26° C and in fluctuating temperatures, average 24, 5° C. In order to obtain an accurate result using PMI calculation, results from experiments under controlled and ambient temperatures were used and complemented each other, confirming the temperature influence on the development time, body mass and length. This study represents an important tool to forensic entomology and the PMI estimation in corpses found in this region.

Key-words: Forensic Entomology; Suidae; Decomposition; *Paralucilia fulvinota*; Degree day and Degree Hour.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Entomologia Forense	16
1.2. Histórico da Entomologia Forense	17
1.3. Estudos Aplicados à Entomologia Forense na Amazônia	18
1.4. Fauna decompositora	20
1.5. Indicadores Forense	21
1.6. Família Calliphoridae: Considerações Gerais	22
1.7. Temperatura X tempo de desenvolvimento	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Geral	27
2.2. Específicos	27
CAPÍTULO I - Efeito de temperatura não constante sobre desenvolvimento, massa e comprimento de imaturos de <i>Paralucilia fulvinota</i> (Bigot, 1877) (Diptera:Calliphoridae) de interesse forense	
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Geral	33
2.2. Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Área de estudo	34
3.2. Coleta criação do material e manutenção das colônias de estoque	34
3.3. Desenho experimental	36

3.4. Parâmetros Biológicos: Tempo de desenvolvimento e Razão Sexual	37
3.5. Análise Biométrica	38
3.6. Análise Estatística	39
3.7. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Tempo de desenvolvimento	40
4.2. Comprimento e massa larval	41
4.3. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)	45
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Tempo de Desenvolvimento	46
5.2. Razão Sexual	47
5.3. Comprimento e Massa Larval	48
5.4. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado GHA)	48
 CAPITULO II - Efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento, massa e comprimento de imaturos de <i>Paralucilia fulvinota</i> (Bigot, 1877) (Diptera:Calliphoridae) de interesse forense	
RESUMO	51
ABSTRACT	52
 1. INTRODUÇÃO	 53
1.1. Efeito de temperatura no tempo de desenvolvimento	54
1.2. Efeito de temperatura nas características biométricas (massa e comprimento)	54
1.3. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)	55
 2. OBJETIVOS	 57
2.1. Geral	57
2.2. Específicos	57

3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1. Área de estudo	58
3.2. Coleta, criação do material e manutenção das colônias de estoque	59
3.3. Parâmetros Biológicos: Tempo de desenvolvimento e Razão Sexual	60
3.4. Parâmetros Biométricos	61
3.5. Análise Estatística	62
3.6. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)	62
4. RESULTADOS	63
4.1 Tempo de desenvolvimento.....	63
4.2. Razão Sexual	63
4.3. Comprimento e massa dos imaturos	64
4.4. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)	67
5. DISCUSSÃO	68
5.1. Tempo de desenvolvimento	68
5.2. Razão Sexual	69
5.3. Comprimento e massa larval	70
5.4. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)	71
6. CONCLUSÃO GERAL	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1. A) Vista geral do suíno em decomposição no interior da armadilha instalada na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. B) Gaiola de ferro coberta com armadilha tipo “Shannon” utilizada durante o experimento com *Sus scrofa* (Suidae). C) Cadáver do suíno, coberto por ovos de várias espécies de Diptera (partes amareladas). D) Espécimes de Diptera contidas no interior da armadilha. 35
- Figura 2. A, B) Tubos *Falcon* utilizados para a coleta das fêmeas de *Paralucilia fulvinota*. C) Gaiola de criação (adaptada de garrafão de 5 L), utilizada para obtenção de ovos de *P. fulvinota*. D) Posturas em placa e petri. 36
- Figura 3. A) Pote plástico recoberto com organza, contendo carne bovina, sobre o substrato com vermiculita, para criação dos imaturos. B) Gaiola de criação dos imaturos de *Paralucilia fulvinota*. 37
- Figura 4. Tubos *Falcon* contendo vermiculita como substrato para os imaturos (L3 e pupa) de *Paralucilia fulvinota* individualizados após abandono da dieta. 38
- Figura 5. Desenvolvimento pós-embrionário de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Floresta Ducke, Manaus, AM. 40
- Figura 6. A) Larvas de *Paralucilia fulvinota* de primeiro instar após a eclosão. B) Larvas de terceiro instar com coloração cinza escuro. 41
- Figura 7. Média do comprimento larval (mm) ao longo do tempo total de desenvolvimento de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24.5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. 42
- Figura 8. Relação entre o comprimento (mm) e os instares larvais de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. . 42
- Figura 9. Ganho de comprimento (mm) nos instares larvais de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24.5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. .43
- Figura 10. Média da massa corporal (mg) dos imaturos de *Paralucilia fulvinota* ao logo do tempo de desenvolvimento em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. 44
- Figura 11. Relação entre massa larval e os instares de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. 44
- Figura 12. Ganho de massa corporal (mg) dos instares larvais de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. 45

CAPITULO II

Figura 1. Imagem de satélite da área de estudo na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.	58
Figura 2. Detalhe do cadáver de suíno <i>Sus scrofa</i> em decomposição na fase coliquativa, coberto por larvas de Calliphoridae (Diptera) na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.	59
Figura 3. Tempo de Desenvolvimento em relação as temperaturas de 20° a 35°C ($F_{3,108} = 81,36$; $p < 0,001$).	63
Figura 4. Razão sexual de machos e fêmeas de <i>Paralucilia fulvinota</i> entre as temperaturas de 20° a 35°C.	64
Figura 5. Média do comprimento (mm) dos imaturos de <i>Paralucilia fulvinota</i> em temperatura constante de 20° C a 35° C.	65
Figura 6. Ganho de comprimento (mm) dos imaturos de <i>Paralucilia fulvinota</i> em temperatura constante de 20° C a 35° C.	65
Figura 7. Média da massa corporal (mg) dos imaturos de <i>Paralucilia fulvinota</i> em temperatura constante de 20° a 35°C	66
Figura 8. Ganho de Massa corporal (mg) dos ínstares larvais de <i>Paralucilia fulvinota</i> em temperatura constante de 20° a 35°C.	67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Grau-dia e Grau-hora acumulados para o desenvolvimento larval e pupal de *Paralucilia fulvinota* coletados na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

Obs.: Os valores foram calculados com temperatura média de 24,5°C e limiar mínimo de 10°C (Higley e Peterson, 1994) 45

Tabela 2. Tempo de desenvolvimento em temperatura ambiente de espécies de *Paralucilia* coletadas neste e em outros trabalhos demonstrando a diferença entre os instares larvais de espécies morfologicamente semelhantes. 47

CAPÍTULO II

Tabela 1. Grau-dia e Grau-hora acumulados para os estágios de desenvolvimento de *Paralucilia fulvinota* coletadas em cadáver de suíno na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. GHA = Grau-hora acumulado; GDA= Grau-dia acumulado. Obs.: Os valores calculados sobre temperatura constante e limiar mínimo de 10°C (Higley e Peterson, 1994). 67

Tabela 2. Efeito da temperatura sobre desenvolvimento de espécies de *Paralucilia* coletadas neste e em outros trabalhos demonstrando a diferença entre os instares larvais de espécies morfologicamente semelhantes. 69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Entomologia Forense

A Entomologia Forense (EF) se utiliza de informações sobre a biologia dos insetos associados aos cadáveres, podendo ser usada como uma ferramenta dentro de investigações científicas, contribuindo com as investigações judiciais (Nuorteva, 1977; Smith, 1986; Catts e Goff, 1992; Leccese, 2004).

A EF pode ser dividida em três ramos: a) urbana, que inclui ações cíveis envolvendo a presença de insetos em imóveis danificados (ex.: cupins); b) de produtos estocados, referentes à contaminação em grande escala de produtos de origem comercial (ex.: caruncho nome dado a espécies de Coleoptera que ingerem os cotilédones do feijão, prejudicando sua venda); c) Médico-Legal, que é foco deste trabalho e envolve a área criminal, morte violenta (Lord e Stevesson, 1986), onde os insetos e outros artrópodes associados a cadáver humano em decomposição são usados em eventos envolvendo suspeita de morte por causa não natural, com o propósito de fornecer informações úteis para uma investigação médico-criminal (Keh, 1985; Smith, 1986; Greenberg, 1991; Vanlaerhoven e Anderson, 1999; Von Zuben, 2001).

Para que os insetos sejam usados em análises periciais e nos processos judiciais é necessário conhecer a taxonomia, biologia e ecologia das espécies necrófagas em diferentes regiões geográficas e climáticas (Oliveira-Costa, 2008), uma vez que a atuação dos insetos necrófagos está relacionada a diferentes coberturas vegetais, períodos sazonais e urbanização (Moura *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2000, 2004). Portanto é inviável utilizar manuais e dados de forma generalista (Monteiro-Filho e Penereiro, 1987; Fraga, 2004).

Na região Temperada as pesquisas somam um grande banco de dados sobre o padrão de sucessão de insetos em carcaças (Oosterbroek, 2006). No entanto, estes dados não são aplicáveis aos exames periciais no Brasil, devido às diferenças climáticas e extenso território, fazendo-se necessário a criação de um banco de dados próprio (Oliveira-Costa, 2008), já que os insetos estão entre os organismos mais numerosos entre os diferentes grupos de invertebrados que colonizam a carcaça, sendo capazes de colonizar rapidamente diversos habitats (Leccese, 2004) principalmente os

Calliphoridae (Diptera) adultos que possuem alta percepção dos odores exalados, sendo capazes de se deslocar rapidamente por grandes distâncias ao procurar alimento e local adequado para colocar seus ovos (Thyssen, 2005; Pujol-Luz *et al.*, 2008).

1.2. Histórico da Entomologia Forense

O primeiro caso documentado de entomologia forense foi reportado na China pelo advogado e investigador Sung Tzu em 1235, num livro texto chamado “The washing away of wrongs”. O autor descreve o caso de uma morte por golpes de foice perto de um campo de arroz, no qual na busca de vestígios na vizinhança, localizaram uma foice com traços de sangue onde sobrevoavam Diptera, cujo proprietário confessou o crime (Benecke, 2001). O primeiro caso moderno de entomologia forense utilizando à estimativa do tempo de morte foi realizado na França, pelo médico francês Bergeret (1855), num caso de infanticídio onde a fauna encontrada no cadáver foi associada com seu estágio de decomposição. Em 1894, Mégnin publicou uma das mais importantes e o pioneiro o livro sobre o tema “La faune des cadavres” (Benecke, 2001).

Foram revistos os primeiros estudos de entomologia forense que se iniciaram efetivamente com Oscar Freire (1908), que apresentou à Sociedade Médica da Bahia a primeira coleção de Insetos necrófagos coletados em cadáveres humanos e pequenos animais. Roquete Pinto (1908), publicou um estudo de caso sobre a fauna cadavérica de humanos no Rio de Janeiro. Lünderwalte (1911) estudou os besouros do atual Museu de Zoologia da universidade de São Paulo, publicando uma lista de insetos necrófagos. Freire (1914a, 1914b) publicou notas para o estudo da fauna cadavérica na Bahia. Belfort-Mattos (1919), sob orientação de Oscar Freire, estudou os Sarcophagidae (Diptera) do estado de São Paulo. Em 1923, foi publicada postumamente a obra de Oscar Freire sobre a fauna cadavérica brasileira (Freire, 1923).

Esse primeiro período de estudos se encerrou em 1941 com a obra de Pessoa e Lane (1941) sobre os Coleoptera de interesse médico-legal de São Paulo. Após esse período, os estudos forenses entraram em declínio e só voltaram nas décadas de 1970/80 a partir de estudos sobre sinantropia (espécies próximas do habitat humano) (Ferreira, 1978; 1983), decomposição de carcaças (Monteiro-Filho e Peneireiro, 1987) e atratividade frente a diferentes iscas (D’ Almeida, 1988). Na década de 1990 podemos citar os estudos de Souza e Linhares (1997) com Diptera e Coleoptera do Sudeste do

Brasil e o de Moura *et al.* (1997) com insetos de importância médico-legal do Paraná. No século XXI, temos os estudos de Carvalho *et al.* (2000), que publicaram um “*checklist*” de artrópodes de importância médico-legal no sudeste do Brasil e Carvalho e Mello-Patiu (2008) que publicaram uma chave de identificação para os Diptera de importância forense da América do Sul. Estes e outros estudos forenses forneceram uma base inicial de dados sobre as espécies adaptadas à biocenose humana e suas preferências para oviposição, indicando quais poderiam ser utilizadas nos estudos forenses. Nos últimos 20 anos surgiram centros de estudos voltados para a entomologia forense com metodologia definida.

1.3. Estudos Aplicados à Entomologia Forense na Amazônia

Nos primeiros estudos na região Amazônica, havia apenas o conhecimento sobre atividade de vôo de espécies de Calliphoridae (Diptera) em área urbana (Paraluppi e Castellon 1993, 1994). No estado do Pará, foi avaliada a influência do tamanho da carcaça de suínos na sucessão da entomofauna com ênfase em Calliphoridae, onde foi registrada relação positiva entre o tamanho da carcaça e a abundância de Calliphoridae que aumentou de acordo com o tamanho, no entanto, este mesmo estudo não observou influência do tamanho da carcaça sobre a sucessão, diversidade, composição e na riqueza dos Calliphoridae (Anjos, 2001).

No estado do Amazonas, o primeiro estudo em entomologia forense foi em uma área de terra firme, onde foi avaliado o comportamento de oviposição de adultos, tempo de desenvolvimento e morfologia de imaturos de *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805), *H. semidiaphana* (Rondani, 1850) e *Lucilia eximia* (Wiedmann, 1819) (Diptera: Calliphoridae) em suíno em decomposição (Fraga, 2004). Em outro estudo na mesma área, foram avaliados os aspectos bionômicos de duas espécies de Sarcophagidae, demonstrando a diferença no tempo de desenvolvimento de espécies morfologicamente semelhantes (Oliveira-da-Silva *et al.*, 2006).

Na região Norte, o primeiro caso com cálculo de estimativa de IPM (Intervalo pós-morte) (tempo entre a morte e o descobrimento do cadáver) associado a cadáver humano em decomposição; aconteceu no estado de Rondônia, em uma reserva indígena onde foi utilizando *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae) (Pujol-Luz *et al.*, 2006). No Amapá, em 2008, foi registrado outro caso de estimativa de IPM

para cadáver humano, através da utilização *Hermetia illucens* Linnaeus, 1758 (Diptera: Stratiomyidae) (Pujol-Luz *et al.*, 2008).

Em Manaus, foi desenvolvido um levantamento taxonômico, além da determinação da flutuação temporal dos Calliphoridae associados à suíno em decomposição em área de terra firme (Ururahy-Rodrigues, 2008). A atuação do Coleoptera *Coprophanaeus lancifer* (Linnaeus, 1767) foi caracterizada como dado importante no deslocamento de cadáveres de porcos (tafonomia forense) (Ururahy-Rodrigues *et al.*, 2008). Na área urbana de Manaus foi avaliada a associação de Calliphoridae a carcaça de porco doméstico, onde foi realizado o primeiro registro do tempo de desenvolvimento de *Paralucilia paraensis* (Mello, 1969) (Barros-Souza, 2009). No mesmo ano, em 2009, em condições de laboratório foi verificada a sobrevivência de pupas de *Phaenicia eximia*, citada como *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819) quando submersa em água destilada, verificando uma alta taxa de viabilidade dessa espécie em ambientes com pouco oxigênio, auxiliando no caso de corpos encontrados submersos em água (Barros-Souza e Ferreira-Keppler, 2009).

Mise *et al.* (2010) ao estudar os Coleoptera associada a carcaças de suínos, verificou que a fauna na região Amazônica difere de outras regiões do Brasil. Neste estudo, foi registrado pela primeira vez para a região de Manaus, as espécies *Omalodes lucidus* (Erichson, 1824) e *Scapomegas auritus* (Marseul, 1855) (Coleoptera: Histeridae) ressaltando a importância de estudos locais. No mesmo ano, foi reportado a presença e o comportamento de *Oxelytrum cayennense* Sturm, 1826 (Coleoptera: Silphidae) em carcaça de suínos em área de terra firme em Manaus, sendo essa espécie responsável por causar injúrias que podem alterar o cálculo do IPM (Ururahy-Rodrigues *et al.*, 2010).

Em 2011, iniciaram-se os primeiros estudos com a comunidade de insetos associados à decomposição de suínos parcialmente submersos em igarapé na Reserva Florestal Ducke, verificando os estágios de decomposição, a fauna presente e a influência de fatores abióticos (Oliveira-da-Silva, 2011). Em 2012, foi estudada a biologia de *Bocainomyia hagmannarum* (Papavero e Val, 1971) (Diptera: Piophilidae) em suínos em área de mata primária descrevendo seu comportamento, tempo de desenvolvimento e morfologia dos imaturos (Linard, 2012). Sales *et al.* (2013) fizeram a primeira descrição dos imaturos de *P. paraensis* coletados em suínos parcialmente

submersos. No mesmo ano, foi verificado o efeito da cocaína em carcaças de coelhos no desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) (Vieira, 2013).

1.4. Fauna decompositora

A decomposição é um processo natural responsável pelo retorno da matéria orgânica ao ecossistema (Gotelli, 2007). Este processo consiste, sobretudo, na degradação da matéria orgânica em compostos orgânicos e inorgânicos simples, com consequente liberação de energia, contudo, o processo de degradação biológica é contínuo podendo ser dividido ou subdividido em estágios com o propósito de facilitar seu estudo. O número e o tempo de duração de cada estágio são fortemente dependentes das condições climáticas e sazonais (Bornemissza, 1957).

Os principais organismos envolvidos na decomposição são bactérias, fungos, invertebrados e vertebrados de pequeno ou grande porte. Entre os artrópodes, os insetos possuem grande importância forense, já que podem utilizar o substrato de três formas: 1) decompondo o substrato e usando a energia obtida para seu crescimento; 2) Predando outros organismos; 3) utilizando o substrato como um sítio de fixação para obter suas necessidades nutricionais (Nuorteva, 1977; Smith, 1986; Catts e Goff, 1992).

Os necrófagos constituem a maior porção da fauna que se alimenta de corpos animais em decomposição, tendo os insetos como o grupo predominante (Smith, 1986; Greenberg, 1991). Ao longo do processo de decomposição do cadáver, ocorre normalmente uma sucessão de fauna necrófaga utilizando-se da matéria orgânica deste substrato (Catts e Goff, 1992). Os Diptera são os primeiros a chegar e começam colonizando as partes moles do corpo como feridas abertas ou os orifícios naturais, posteriormente chegam os insetos predadores (ex.: Formicidae, Vespidae, Coleoptera e parasitóides), que se alimentam de ovos, larvas ou mesmo pupas dos Diptera; a cartilagem e os tecidos secos que sobram são consumidos pelos Coleoptera; fenômeno de chegada e substituição de espécies é conhecido como sucessão ecológica, sendo um dado importante para a estimativa IPM (Catts e Haskell, 1991).

Os insetos necrófagos são os primeiros organismos a localizar e colonizar um cadáver em decomposição, iniciando logo após a morte se o cadáver estiver em

ambientes naturais, assim, a biologia das espécies de moscas colonizadoras, fornece informações muito precisas.

O tempo de desenvolvimento dos insetos na carcaça funciona como um relógio biológico que, no caso de cadáveres humanos, pode ser interpretado para estimar o IPM (Intervalo pós-morte) (Smith, 1986; Greenberg, 1991; Von Zuben *et al.*, 1996).

A fauna de insetos associados a cadáveres nem sempre se alimenta de tecidos decompostos, e dependendo da associação podem ser classificados em cinco categorias ecológicas quanto ao hábito alimentar: espécies necrófagas (se alimentam de tecidos do cadáver e constituem a mais importante categoria para estabelecer o tempo de morte do cadáver); parasitas (que parasitam os imaturos da fauna associada); predadores (que predam os imaturos da fauna associada); onívoras (se alimentam tanto do cadáver como da fauna associada) e acidentais compostas de outros artrópodes que utilizam o cadáver como uma expansão dos recursos de seus habitats (Catts e Goff, 1992; Smith, 1986).

Apesar da alta riqueza de espécies que colonizam carcaças, algumas assumem um papel de maior relevância dentro investigações criminais, especialmente os indivíduos da família Calliphoridae. Esses organismos são geralmente registrados em elevada abundância e utilizam a carcaça como substrato para oviposição dos adultos e desenvolvimento dos imaturos (Oliveira-Costa, 2011).

1.5. Indicadores Forense

Quando um cadáver é encontrado após dias, semanas, meses ou anos após a ocorrência da morte, a temperatura do corpo e outras condições como o *livor mortis* (livores cadavéricos) ou o *rigor mortis* (rigidez cadavérica) deixam de ser apropriados para estimar o tempo de morte. Nesses casos, os insetos podem fornecer importantes estimativas do IPM (Greenberg e Kunich, 2002). Os chamados indicadores forenses são espécies que além de visitar a carcaça, também a utilizam como recurso para os seus estágios imaturos de desenvolvimento. Neste caso, a determinação do período de desenvolvimento embrionário dos ovos, duração dos diferentes instares larvais e do estágio pupal possibilita o cálculo do IPM (Keh, 1985).

Para ser considerado um bom indicador forense as espécies devem ter sua distribuição restrita a uma determinada região ou clima, e possuir alguma característica

em seu ciclo biológico que permita algum tipo de inferência, como o tempo de desenvolvimento (Souza, 1999). Dentre os insetos, os Diptera de interesse forense, são os mais utilizados para o cálculo do IPM. Na Europa, diversos autores têm contribuído com estudos de biologia de dípteros (Marchenko, 2001) No Brasil, também há destaque para o estudo da biologia de espécies de Calliphoridae (D’Almeida e Mello, 1995), Muscidae (Krüger *et al.*, 2003a) e Sarcophagidae (Krüger *et al.*, 2003b) por serem os principais grupos de importância forense (Oliveira-Costa, 2011) pois espécies dessas famílias apresentam facilidade de criação dos imaturos e constituem a maior porção da fauna que coloniza cadáveres em decomposição (Oliveira-Costa, 2011).

1.6. Família Calliphoridae: Considerações Gerais

Os adultos de Calliphoridae, exceto Mesembriellinae, apresentam coloração escura com reflexos metálicos, azulados, esverdeados, violáceos e cobre, principalmente no abdômen, sendo conhecidas como moscas varejeiras (Lenko e Papavero, 1996). Os representantes de Calliphoridae, assim como os demais Diptera, são holometábolos típicos, passando por quatro estádios durante seu ciclo de vida: ovo, larva (LI, LII e LIII), pupa e adulto (Shewell, 1987). As larvas podem ter hábitos biontófagos (se alimentam de tecido não necrosado) ou necrófagos (se alimentam de tecido em necrose) (Mello, 2003), possuem corpo cilíndrico vermiforme, região anterior mais afilada que a posterior, com três tubérculos na superfície dorsal e ventral que são restritos à porção terminal do último segmento abdominal e um par de espiráculos anteriores e posteriores (Bonatto e Carvalho, 1996).

São conhecidas aproximadamente 1.526 espécies de Calliphoridae, distribuídas em 108 gêneros, sendo 80% das espécies restritas ao velho mundo (Thompson, 2008). Na região neotropical 126 espécies (Amorin *et al.*, 2002) estão agrupados em Mesembrinellinae, Chrysomyinae, Calliphorinae e Toxotarsinae (James, 1970). A família é de grande importância para estimativa do IPM (Intervalo pós-morte) em cadáveres humanos (Oliveira-Costa, 2011). Este grupo tem preferência pelos estágios iniciais de decomposição (Carvalho e Linhares, 2001). As espécies dos gêneros *Calliphora* (Robineau-Desvoidy), *Chloroprocta* Wulp, *Cochliomyia* Townsend, *Comptosyops* (Robineau-Desvoidy), *Chrysomya* Robineau-Desvoidy, *Hemilucilia* Brauer, *Lucilia* Robineau-Desvoidy, *Paralucilia* Brauer & Bergenstamm e *Sarconesia* Bigot participam de forma expressiva da fauna decompositora (Norris, 1965).

Em ambiente urbano podemos classificar os Calliphoridae como indicadores forenses, por serem úteis no cálculo da estimativa do IPM, as espécies: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1830), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *C. putoria* (Wiedemann, 1830) e *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819) são as que apresentam maior importância na área urbana (Thyssen, 2005). Outras espécies como *Chloroprocta idioidea* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775), *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805), *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) e *P. fulvinota* (Bigot, 1877) foram posteriormente incluídas, juntamente com as citadas anteriormente, como indicadoras forenses, em estudos envolvendo a fauna associada a suínos em ambiente de mata natural (Carvalho *et al.*, 2004).

Estudos feitos em laboratório descreveram a morfologia e duração dos instares de *C. albiceps* com novos aspectos morfológicos referentes ao segundo e terceiro instar (Queiroz *et al.*, 1997). Também foi descrito os estágios imaturos de *C. putoria* fornecendo novas informações sobre a biologia dessa espécie (Oliveria *et al.*, 2007), em ambos os trabalhos os indivíduos foram criados utilizando câmara de climatização (BOD) sob temperatura controlada e constante. Em outro estudo sobre variabilidade de luz no desenvolvimento de *Phormia regina* (Meigen, 1826), verificou-se que essa espécie se desenvolve mais rápido sobre luz cíclica do que sobre luz constante (Nabity *et al.*, 2006). A interação larval de *Chrysomya rufifacies* (Macquart) com outras espécies de Diptera (Calliphoridae) foi observada diariamente em cinco carcaças de ursos no estado da Flórida (Estados Unidos), cujas informações ajudam no cálculo mais preciso do IPM (Swinger *et al.*, 2014).

O gênero *Paralucillia* Brauer & Bergenstamm, 1891

O gênero *Paralucillia* é limitado à região Neotropical, com distribuição desde o México até o Brasil onde foi estudado inicialmente como *Myiolucillia* Hall, 1948. Após os estudos de Dear (1985) foram agrupados dentro do gênero *Paralucillia* (Amat, 2009). Na década de 90, Mello (1996) fez uma revisão do gênero *Paralucillia* sinonimizando várias espécies com base em descrição e desenhos.

Grupo Alvo: *Paralucillia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae)

Diagnose Adulto: Os adultos machos apresentam a cabeça enegrecida, recoberta de pilosidade prateada; frontália muito estreita e visível somente no terço inferior da fronte; parafrontália é enegrecida e com raros pelos brancos; triangulo ocelar também enegrecido, com um par de cerdas ocelares e esparsos pelos longos e escuros; tórax apresenta coloração azul ou verde metálico recoberto com pilosidade prateada sem apresentar faixas dorsais longitudinais; espiráculo pró e metatorácico castanho escuro (Mello, 1969); esternito V (cinco) não fortemente fendido em forma de “V”; calíptera superior nua (Mello, 2003).

Diagnose Imaturo: No terceiro instar apresentam segmentos 2–10 circulado com espinhos; segmentos posteriores sem espinhos; espinhos laterais fusiformes presentes nos segmentos 5–10; espinhos largos, simples e multipontiagudos, altamente pigmentados; espiráculo anterior com 9–12 expansões; espiráculo posterior moderadamente pigmentado com peritrema incompleto. Foram descritos por Greenberg e Szyska (1984), junto a outras 14 espécies de Calliphoridae com material obtido ao longo rodovias a partir de Lima (Peru) atravessando os Andes e terminando na Floresta Amazônica do Peru.

Paralucillia fulvinota apresenta importância forense e já foi relatada no estado de São Paulo (Jundiaí), na Reserva Florestal Serra do Japi, em carcaças de suínos expostos em diferentes altitudes e condições pluviométricas, onde foi considerada junto com *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) e *H. semidiaphana* (Rondani, 1850) como melhores indicadores forenses para aquela região (Tavares, 2003). Na Amazônia, Pujol-Luz *et al.* (2006) no estado de Rondônia, registrou a espécie em uma reserva indígena associadas a corpos humanos, quando realizou a estimativa do IPM com imaturos criados com carne de suíno em temperatura ambiente. Nesta região, foi coletada por Oliveira-da-Silva (2011) (dados não publicados) na Reserva Florestal Ducke, município de Manaus em carcaças de suínos parcialmente submersos, onde foi mais abundante no período menos chuvoso, ocorrendo diretamente sobre o cadáver junto a espécies morfológicamente semelhantes tanto na fase imatura quanto adulta, como é o caso de *P. paraensis* (Mello 1969) e *P. pseudolyrcea* (Mello, 1969).

1.7. Temperatura X tempo de desenvolvimento

Os insetos são organismos ectotérmicos, ou seja, o seu desenvolvimento depende da temperatura ao qual estão submetidos. De modo geral, pode-se dizer que quanto maior a temperatura mais rápido é seu desenvolvimento (Ames e Turner, 2003). Além disso, a temperatura afeta também a fisiologia do inseto para alimentação, crescimento e reprodução, ocorrendo variações na duração, peso e comprimento larval (Lecheta, 2012). Cada espécie responde de maneira distinta as variações de temperatura sendo esse um importante detalhe para a determinação do IPM (Reibe *et al.* 2010).

A influência da temperatura na taxa metabólica dos insetos é algo bastante conhecido e muitos estudos continuam a documentá-las onde se pode observar que temperaturas altas normalmente diminuem o tempo de desenvolvimento e aumentam as taxas de crescimento (Atkinson, 1994; Atkinson e Silby, 1997). Entre os dois principais métodos para o cálculo do IPM podemos citar: primeiro a comparação entre tamanho e tempo de desenvolvimento larval em função do tempo e da média de temperatura do ambiente em um simples diagrama (Grassberger e Reiter, 2002), entretanto esse método só é eficaz em ambientes fechados onde a temperatura é constante (Reibe *et al.* 2010). O segundo método consiste no cálculo de Grau-Dia e Grau-Hora acumulados (GDA e GHA), que consiste no tempo necessário para o desenvolvimento de um determinado estágio larval (Higley e Haskell, 2010).

As mudanças de temperatura ao longo do dia podem exercer influência na estimativa de IPM, principalmente se comparadas a estudos em temperaturas constantes (Higley e Haskell, 2010; Kruger *et al.*, 2010). A maioria dos estudos é feita sob temperatura controlada, muitas vezes não levando em consideração as variações de temperatura (Nabity *et al.*, 2007; Higley e Haskell, 2010). O tamanho da larva (comprimento) em relação ao tempo e temperatura pode ser usado para a determinação do IPM, já que diferentes espécies de moscas varejeiras apresentam taxa de crescimento diferenciado de acordo com a temperatura (Donavan *et al.*, 2006).

Na presente dissertação foi abordado o efeito da temperatura no desenvolvimento de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae), já que em diferentes localidades os Calliphoridae podem ter um padrão distinto de desenvolvimento por estarem sujeitas a flutuações de temperatura, o que pode gerar

erros no cálculo do Intervalo Pós Morte/ IPM. Temperaturas controladas permitem reconstruir com precisão os dados de desenvolvimento dos insetos imaturos associados a cadáveres, permitindo que um Entomologista Forense calcule a idade de um inseto amostrado.

No primeiro capítulo foi avaliado o efeito de temperatura não constante no desenvolvimento de *P. fulvinota*, avaliando o efeito da temperatura na massa e no comprimento dos imaturos das espécies.

O segundo capítulo abordou o efeito de temperatura controlada no tempo de desenvolvimento, na massa e no comprimento de *P. fulvinota*. Foram avaliados os efeitos de seis faixas de temperatura constante, com imaturos sendo criados a 20, 23, 26, 29, 32 e 35°C; temperaturas estas, dentro da faixa máxima e mínima anual da região.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Fornecer informações bionômicas sobre *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) a fim de obter dados para a determinação do IPM (Intervalo pós-morte) de cadáveres encontrados no Amazonas.

2.2. Específicos

- Verificar o efeito da temperatura no desenvolvimento de larva a adulto de *P. fulvinota*;
- Verificar como a temperatura afeta o peso corporal e o comprimento das larvas durante o desenvolvimento de *P. fulvinota*;
- Calcular o GDA (Grau dia acumulado) e GHA (Grau hora acumulado), para estabelecer o tempo necessário para o desenvolvimento dos estágios imaturos (L1, L2, L3 e de pupa a adulto) de *P. fulvinota*.

Capítulo I

**Efeito de temperatura não constante sobre o desenvolvimento,
massa e comprimento de imaturos de *Paralucilia fulvinota*
(Bigot, 1877) (Diptera:Calliphoridae) de interesse forense**

Abril, 2015

Efeito de temperatura não constante sobre desenvolvimento, massa e comprimento de imaturos de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera:Calliphoridae) de interesse forense

RESUMO

No campo da entomologia forense os artrópodes constituem o maior elemento desta fauna, principalmente os insetos. Os Diptera demonstra maior potencial informativo, principalmente os muscoides pertencentes à família Calliphoridae. Estimar a idade dos insetos é o principal método para presumir o intervalo pós-morte (IPM), que pode ser estimado também através comprimento e da massa corpórea. *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) é indicador forense e já foi registrada em corpos humanos nesta região, sendo necessário um estudo biológico da espécie para que possa dar suporte em casos de estimativa de IPM. Este trabalho tem como objetivo estudar a bionomia de *P. fulvinota* fornecendo dados que irão auxiliar na estimativa do IPM de cadáveres encontrados nesta região. O estudo foi realizado de outubro a dezembro de 2014 na Reserva Florestal Ducke (Manaus-Amazonas). Fêmeas grávidas de *P. fulvinota* foram coletadas em um suíno (*Sus scrofa*) de 40 Kg e a partir das posturas foram montadas colônias de estoque e obtidos os imaturos para observações em temperatura ambiente (média =24,5± 1,3 °C e umidade média de 84 ± 3,9 %). O tempo de desenvolvimento foi de 13,13 dias com razão sexual 0,86 com razão sexual de 0,86 (7 ♂ e 46 ♀). Foi observado um aumento constante no ganho de massa ao longo dos instares; em relação ao comprimento houve um ganho menor do segundo ao terceiro instar; mostrando que a espécie ganha muito mais em volume do que em comprimento. Dados de Graus-dias (190.38) e Graus-horas (4569.24) do tempo total de larva (L1, L2,L3) a adulto, mostram o tempo transcorrido para atingir o período total. Essas informações servirão de base para o cálculo do Intervalo pós-morte (IPM) em cadáveres encontrados na região, visto a importância da espécie como indicador forense.

Palavras-Chave: *Paralucilia fulvinota*; temperatura ambiente; cálculo de IPM (Intervalo pós-morte); Amazonia Central

Not constant temperature effect on development, weight and length of immature *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae) of forensic interest

ABSTRACT

In Forensic Entomology arthropods are a very important and the biggest group among its fauna, specially the insects. Diptera have a huge informative potential, in special, the muscoids (Calliphoridae). Estimating how old these insects are is a powerful tool to evaluate the Post Mortem Interval (PMI) by analyzing body mass and length of these individuals. *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) is a forensic indicator and has been found in human corpses. For this reason it is vital to that biological studies of this species are conducted. The results can provide data to support PMI estimation. This research aims at studying *P. fulvinota* bionomy as to provide data to help calculating the PMI of bodies found in this region. The research was conducted from October to December, 2014 at Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus, Amazonas). Pregnant females of *P. fulvinota* were collected from the corpse of a forty-kilogram swine (*Sus scrofa*). Immatures were egg-laid and collected from stock colonies to be observed in ambient temperatures (average temperature = $24,5 \pm 1,3$ °C, average humidity $84 \pm 3,9$ %). In ambient temperature, the individuals development took 13 days. Gender ratio was 0,86 (7 ♂ and 46 ♀). There was a constant mass gain through each instar phase in relation to the larvae length. Regarding body length there was a minor growth from the second to the third instar, revealing that this species develops more in volume than in length. The data in degree day (190.38) and degree hour (4569.24) of the total development time from larvae (L1, L2, L3) to adult reveal the elapsed time to reach the total period. Information provided from this research will be used to feed the PMI calculations of the bodies found in this region, emphasized by the level of importance of this species as a forensic indicator.

Key-words: *Paralucilia fulvinota*; Ambient Temperature, PMI Calculation, Central Amazonia.

1. INTRODUÇÃO

Os insetos necrófagos apresentam grande importância no processo de decomposição de cadáveres. Segundo Payne (1965), a entomofauna que se espera encontrar em cadáveres e que são considerados de maior potencial forense são os Diptera e os Coleoptera, que juntos podem representar aproximadamente 60% da fauna presente na decomposição de um cadáver. Outras ordens de insetos também são consideradas como indicadores forenses, tornando-se necessária a elaboração de uma lista com todos os insetos do local, quer associados ao cadáver ou a flora presente (Carvalho *et al.*, 2000).

De acordo com Catts e Goff (1992) no campo da entomologia forense os artrópodes constituem o maior elemento desta fauna, principalmente os insetos. Dentre os Diptera, os muscóides pertencentes à Calliphoridae, são alguns dos primeiros a chegar aos corpos em decomposição e se considerando (Archer, 2003) o intervalo de tempo entre a morte e o encontro do cadáver, o conhecimento do ciclo de vida permite determinar a estimativa do intervalo pós-morte (IPM).

Os estudos realizados por Carvalho *et al.* (2000), Horenstein *et al.* (2005), Mavárez-Cardozo *et al.* (2005), Barbosa *et al.* (2009), Barbosa *et al.* (2010), relatam que a composição dos Diptera em um cadáver é influenciada pelo estágio de decomposição do corpo e também pelas condições ambientais. Corroborando estas informações Wigglesworth (1972), Sanders (1975), Salvadori e Parra (1990) também relatam a temperatura afetando o desenvolvimento, massa e tamanho dos imaturos. Em Greenberg (1991), Goff *et al.* (1991), Turner e Howard (1992), Goff *et al.* (1997), Higley e Haskell (2000), Carvalho *et al.* (2000) e Donovan *et al.* (2006) pode-se rever esse aspecto de que o período de desenvolvimento pós-embriônico de um inseto sobre um cadáver pode ser influenciado por diversos fatores como a temperatura, umidade, fotoperíodo, precipitação, interação entre diferentes espécies, calor gerado pela massa larval e/ou efeitos de drogas.

Estimar a idade dos insetos é o principal método dentro da entomologia forense para presumir o intervalo pós-morte, sendo assim necessário que se conheça a biologia da espécie (Thyssen, 2005), que pode ser estimada também através de comprimento e da massa corpórea (Greenberg e Kunich, 2002). Quando o IPM é baseado na taxa de desenvolvimento é preciso considerar fatores bióticos (como metabolismo) e fatores abióticos (temperatura, umidade, fotoperíodo, recurso alimentar, presença de

substâncias e agregação de larvas presentes), já que ambos podem afetar diretamente o IPM (Greenberg e Kunich, 2002).

O principal método para estimar o IPM é o cálculo do Grau-Dia Acumulado (GDA) que assume como pressuposto que o tempo de desenvolvimento e a temperatura apresentam uma relação linear (Oliveira-Costa, 2008), entretanto somente em temperaturas constantes essa relação é linear (Higley e Peterson, 1994). Já em temperatura ambiente essa variação é hiperbólica, o que causa variação no tempo de desenvolvimento (Ikemoto e Takai, 2000).

A maioria dos estudos foi realizada sob temperaturas controladas em laboratório, sendo que pequenas oscilações de temperatura ditam as variações no tempo de desenvolvimento (Grassberg e Reiter, 2002). As diferentes espécies de Calliphoridae respondem de forma diferente as ações da temperatura e essas diferenças nem sempre estão relacionadas a fatores extrínsecos (como diferença nas metodologias), mas também a fatores intrínsecos (como adaptação geográfica), ou seja, espécies de diferentes regiões respondem de forma diferente a variações de temperatura (Grassberg e Reiter, 2002).

Considerando a importância de espécies de Calliphoridae como indicadores forenses, e o uso de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) como indicador forense em diferentes regiões do Brasil (Tavares (2003), Pujol-Luz (2006) e Oliveira-da-Silva 2011) é necessário um estudo biológico de *P. fulvinota* sob temperatura ambiente para que possa dar suporte em casos de estimativa de IPM utilizando insetos necrófagos em cadáveres encontrados.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Fornecer informações bionômicas sobre *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) a fim de obter dados para auxiliar na estimativa do IPM (Intervalo pós-morte) de cadáveres encontrados no Amazonas.

2.2. Específicos

- Verificar o efeito de temperatura ambiente sobre o desenvolvimento pós-embriônico (larva a adulto) e a razão sexual de *P. fulvinota*;
- Verificar como a temperatura ambiente afeta a massa corporal e o comprimento das larvas durante o desenvolvimento de *P. fulvinota*;
- Calcular o GDA (Grau-Dia Acumulado) e GHA (Grau-Hora Acumulado), para estabelecer o tempo necessário do desenvolvimento dos estágios imaturos (L1, L2, L3 e de pupa a adulto) de *P. fulvinota* em temperatura ambiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

A região de Manaus apresenta clima equatorial úmido, média anual de temperatura de 26°C, variando de 23,3°C a 31,4°C, com umidade relativa de 80% e média anual de chuvas de 2.286 mm³ (Costa *et al.*, 2013). As precipitações são periódicas com duas estações anuais distintas sendo uma chuvosa, nos meses de dezembro a maio, e outra menos chuvosa, de junho a outubro (Ribeiro *et al.*, 1999). Há ainda uma terceira estação que pode ser definida como de transição que compreende os meses de novembro a dezembro (Irion *et al.*, 1997).

O estudo foi realizado na Reserva Florestal Ducke (02°55'56,7"S/59°58'30,2"W), localizada no Km 26 da AM-10 Manaus, Amazonas, abrangendo uma área de 10.000 ha (Mendonça *et al.*, 2005). Quanto ao tipo de vegetação é classificada como floresta tropical úmida de terra firme com relevo elevado apresentando diferenças de 80 m entre o platô e as partes mais baixas (Ribeiro *et al.*, 1999).

3.2. Coleta, criação do material e manutenção das colônias de estoque

Fêmeas grávidas de *P. fulvinota* foram obtidas de coletas utilizando um suíno *Sus scrofa* (Linnaeus) como isca atrativa (Protocolo nº 007/2014-CEUA/UFAM – “Padrões de Decomposição e Entomofauna associada a Decomposição cadavérica de corpos enterrados em solo da Amazonia Central”) (Figura 1 A, C), em outubro de 2014, período menos chuvoso nesta região. Ao redor da isca foi montada uma gaiola de ferro (2,0 x 2,0 x 2,0m) para evitar a predação de mamíferos e aves de grande porte, e no interior da gaiola foi montada uma armadilha (1,5 x 1,5 x 1,5 m) de cor branca modelo “Shannon” (Figura 1B) para facilitar a captura dos exemplares. Os adultos foram coletados no interior da armadilha (Figura 1 D) utilizando tubos “Falcon” com tampa de rosca (50 mL) (Figura 2 A, B).

Para a formação das colônias de estoque foi utilizado garrafas plásticas de 5 L, (Figura 2 C) e as fêmeas foram mantidas com líquido açucarado e dieta à base de carne bovina moída crua como substrato para alimentação e oviposição. As gaiolas foram mantidas em temperatura ambiente, sendo os valores de temperatura verificados com auxílio de um termo-higrômetro digital INCOTERM.

As posturas obtidas das colônias de estoque foram transferidas para uma gaiola de criação (Figura 2D), dentro de placas de Petri com papel filtro umedecido e um pedaço de carne bovina moída crua.

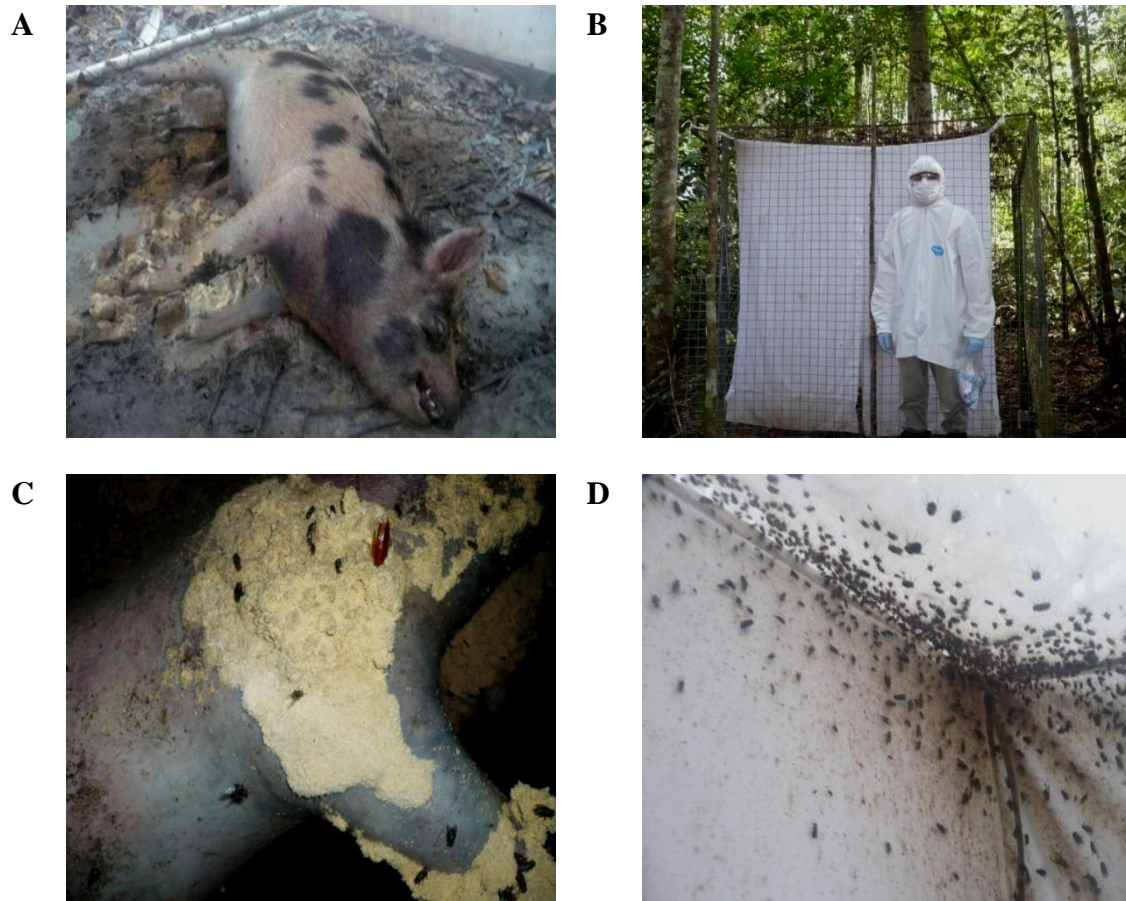


Figura 1. A) Vista geral do suíno em decomposição no interior da armadilha instalada na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. B) Gaiola de ferro coberta com armadilha tipo “Shannon” utilizada durante o experimento com *Sus scrofa* (Suidae). C) Cadáver do suíno, coberto por ovos de várias espécies de Diptera (partes amareladas). D) Espécimes de Diptera contidas no interior da armadilha.

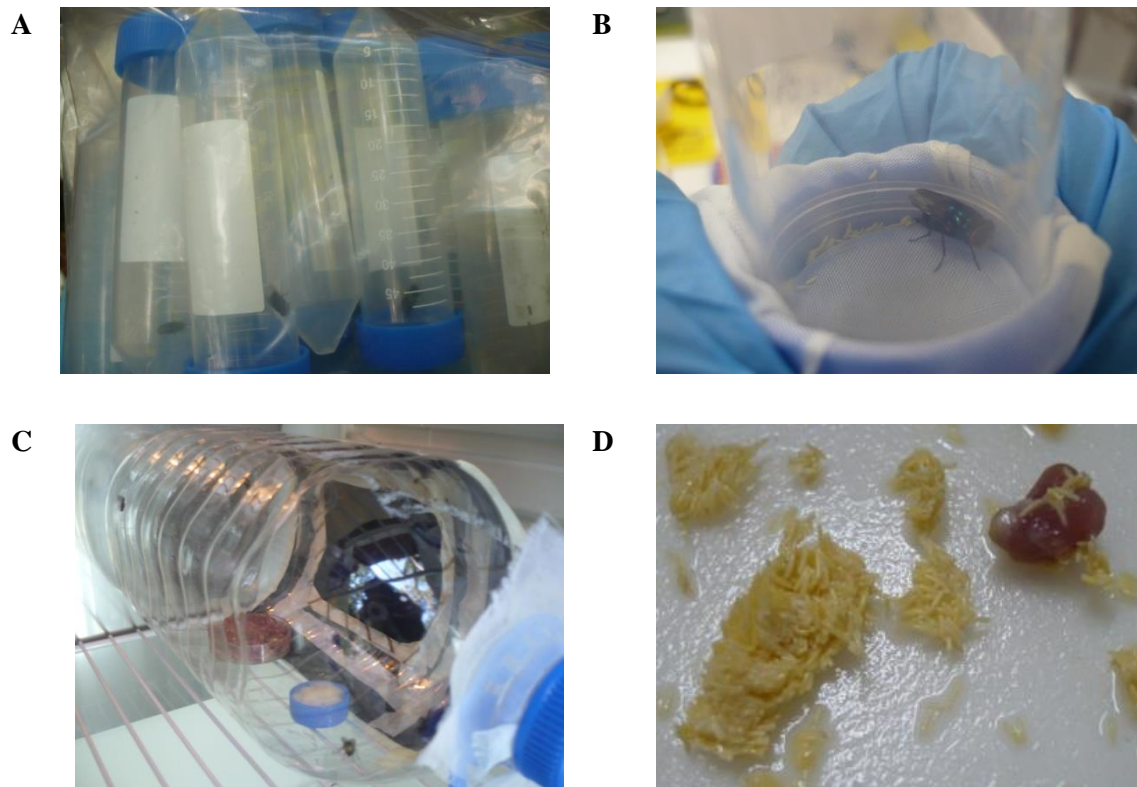


Figura 2. A, B) Tubos *Falcon* utilizados para a coleta das fêmeas de *Paralucilia fulvinota*. C) Gaiola de criação (adaptada de garrafão de 5 L), utilizada para obtenção de ovos de *P. fulvinota*. D) Posturas em placa e petri.

3.3. Desenho experimental

Para verificar o efeito da temperatura ambiente sobre o desenvolvimento de *P. fulvinota*, foram montadas seis réplicas com 60 larvas e inoculadas em carne moída na proporção de 1g por larva. Os potes plásticos cobertos por tecido náilon (organza) (Figura 3A) foram colocados em gaiola de criação (Figura 3B). Das seis réplicas iniciais, apenas uma foi utilizada para avaliação da massa e comprimento larval ao longo do tempo de desenvolvimento.

A determinação dos ínstares foi realizada com base em características das aberturas espiraculares (Oliveira-Costa, 2011). Os espécimes adultos obtidos da criação foram preservados a seco em alfinetes entomológicos, devidamente etiquetados, mantidos em caixas entomológicas e depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

As fêmeas foram levadas para o Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos (LACIA/ C BIO/ INPA) onde foram identificados sob microscópio estereoscópio Leica M165C de acordo com as chaves de Mello (1969; 1996; 2003) e Amat (2009) e posteriormente enviadas para confirmação da espécie pelo Dr. Rubens Pinto de Mello da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro - RJ, especialista em Calliphoridae.

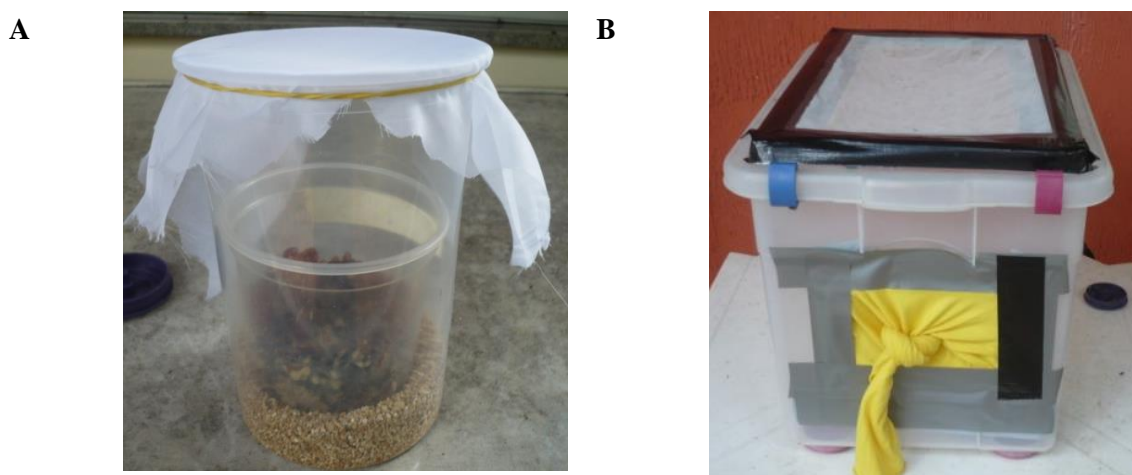


Figura 3. A) Pote plástico recoberto com organza, contendo carne bovina, sobre o substrato com vermiculita, para criação dos imaturos. B) Gaiola de criação dos imaturos de *Paralucilia fulvinota*.

3.4. Parâmetros Biológicos: Tempo de desenvolvimento e Razão Sexual

Os parâmetros biológicos analisados foram: tempo de desenvolvimento de larva a adulto, duração do período larval (L1, L2, L3) e a razão sexual dos adultos emergidos.

Para determinar o tempo de desenvolvimento foram feitas observações de hora em hora durante o período da oviposição até a eclosão das larvas. Após este período as observações foram feitas de 12 em 12 horas, até o abandono da dieta pelas larvas (Queiroz *et al.*, 1996).

Após atingir o terceiro ínstar as larvas que abandonaram a dieta foram contabilizadas, pesadas e individualizadas em tubos “Falcon” de 15 mL fechados com algodão hidrofóbico para observação do período pupal. Essas observações foram feitas diariamente a cada 24 horas, até que todos os exemplares atingissem o estágio de pupa (Figura 4). O período de emergência foi verificado até que da última pupa emergisse o

adulto. A razão sexual foi realizada para saber se a temperatura afetava o número de machos e fêmeas(Silveira-Neto *et al.*, 1976):

$$\text{Razão sexual} = \frac{\text{Número de fêmeas}}{\text{Número de fêmeas + machos}}$$



Figura 4. Tubos *Falcon* contendo vermiculita como substrato para os imaturos (L3 e pupa) de *Paralucilia fulvinota* individualizados após abandono da dieta.

3.5. Análise Biométrica

A cada ínstar larval foi separado 10% do total criado de uma das seis réplicas em períodos de 0 horas, 12 horas, 24, 36, 48 e 56 horas (a cada 12 horas). As larvas foram colocadas em água destilada para a retirada dos resíduos, em seguida transferidas para secagem em papel filtro. Posteriormente foram sacrificadas em água destilada aquecida a $80 \pm 5^\circ\text{C}$ e fixadas em KAAD (95% etanol (80 a 100 ml); Ácido Acético Glacial (20 ml); Querosene (10 ml)) por um período de 12 horas e transferidas para etanol a 70% para que em seguida fossem feitas as análises de massa e comprimento dos imaturos. Após as análises o material foi preservado em etanol a 95% (Oliveira-Costa, 2011).

Para avaliar o crescimento de *P. fulvinota* foram utilizados como parâmetro: comprimento das larvas e massa larval durante o desenvolvimento da espécie. As medidas foram realizadas sob estereoscópio Leica M165C, com ocular micrométrica

(acurácia = 0,001 mm). O comprimento total das larvas foi medido a partir do segmento cefálico até a extremidade distal do último segmento (Lecheta, 2012). As pesagens foram feitas para cada ínstar desde (L1) até o terceiro instar (L3), utilizando uma balança de precisão (Mettler-Toledo; acurácia = 0,01 mg) e em seguida acondicionadas em microtúbos (2,0 mL) com etanol 95%.

3.6. Análise Estatística

Para analisar o ganho de massa e de comprimento, foi calculada a diferença entre os valores das médias e desvio padrão das variáveis (massa e comprimento) entre os instares subsequentes (Lecheta, 2012).

Para avaliar a diferença da massa e comprimento entre os instares foi realizada uma análise de variância (ANOVA) aninhada de um fator, pois as amostras obtidas foram retiradas de uma única replicação, ou seja, as amostras eram pseudoréplicas. Como variável dependente foi utilizada a massa e comprimento e os instares como variável independente. As análises foram realizadas no software estatístico R (R Development Core Team 2011), utilizando o pacote nlme (Pinheiro *et al.*, 2015)

3.7. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)

De acordo com Oliveira-Costa (2011), após identificar a espécie na cena do crime, um dos primeiros passos é pesquisar seu tempo de desenvolvimento desde o estágio de ovo até adulto, sendo aconselhável utilizar temperatura de criação similar a temperatura ao qual a espécie esteve exposta no cadáver.

Para o cálculo dos valores de GDA e GHA foi utilizado a fórmula de Higley e Haskell (2003) conforme abaixo descrita. O limiar mínimo utilizado foi de 10°C sugerido por Higley e Peterson (1994), para espécies da região neotropical, isso porque não existem dados de exigências térmicas para a espécie alvo desse estudo.

$$\text{GHA esperado} = (\text{Temperatura de criação} - \text{limiar de temperatura}) \times \text{Tempo de desenvolvimento}$$

$$\text{GDA esperado} = \frac{\text{GHA esperado}}{24 \text{ horas}}$$

Para o cálculo do GDA e GHA, os dados de temperatura foram obtidos da Estação Meteorológica de responsabilidade da Coordenação de Pesquisa em Clima e Recursos Hídricos / CPR/ INPA instalada na Reserva F. Ducke.

4. Resultados

4.1. Tempo de desenvolvimento

Foram analisadas 360 larvas; destas foram obtidos 53 adultos sendo a maioria de fêmeas (46 indivíduos) e poucos machos (7 indivíduos), com uma razão sexual de 0,86.

O primeiro ínstar larval (L1) teve duração média de 0,5 dias (12 horas); o segundo (L2) 1,5 dias (36 h) e o terceiro (L3) 2,9 dias (70 h). O tempo total de L1 a L3 foi em média 4,9 dias (118 h), de pupa 5,6 dias (134 h) e o tempo total de larva a adulto foi em média ~13 dias (315 h) Figura 5.

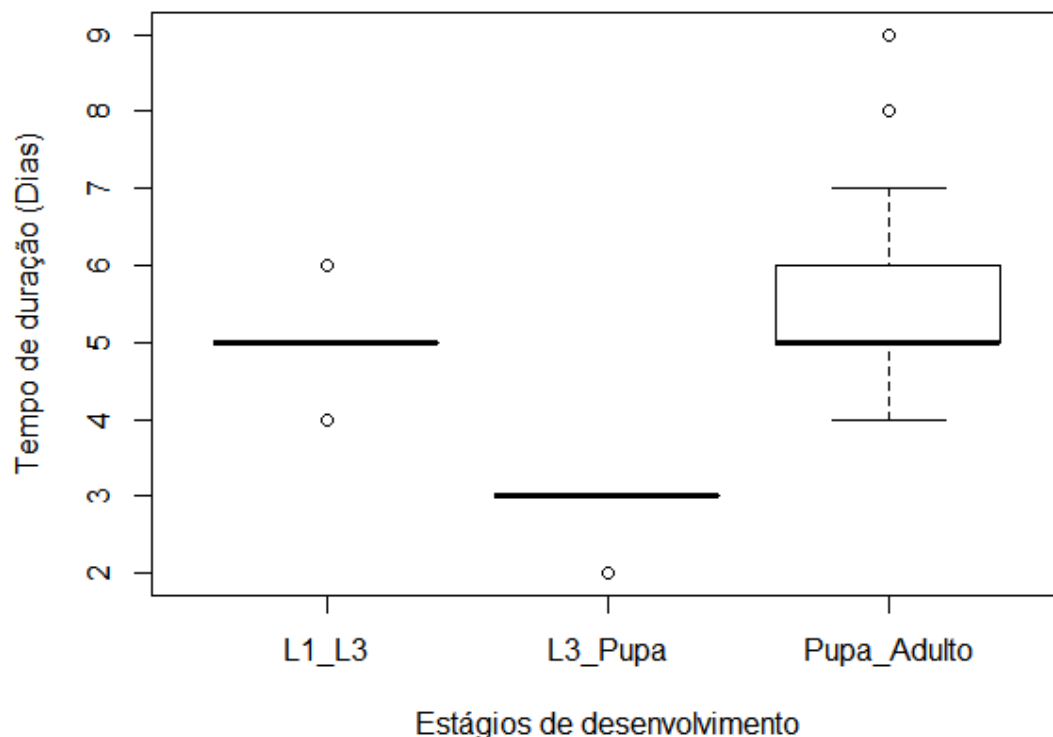


Figura 5. Desenvolvimento pós-embriônico de *Paraluçilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Floresta Ducke, Manaus, AM.

Durante os ínstaros L1 e L2 foi observado imaturos com coloração branco-creme (Figura 6A), diferente de larvas do terceiro ínstar que apresentaram coloração cinza escuro (Figura 6B). No estágio de pupa assumiram a uma coloração castanho-avermelhada escura.

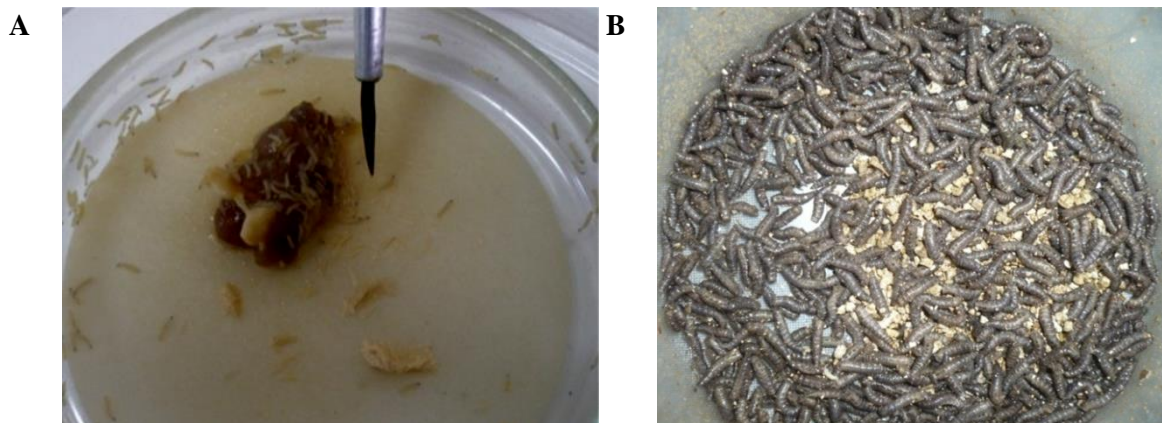


Figura 6. A) Larvas de primeiro ínstar de *Paralucilia fulvinota* após a eclosão. B) Larvas de terceiro ínstar com coloração cinza escuro.

4.2. Comprimento e massa larval

Ao longo do desenvolvimento o comprimento larval aumentou (Figura 7) aproximadamente 420 %. O comprimento inicial médio no momento da eclosão foi $2,72 \pm 0,17$ mm. Sessenta horas após a eclosão, ao atingirem o ínstar (L3) a média foi de $11,45 \pm 1,00$ mm sendo maiores que as L1 ($3,05 \pm 0,40$ mm) e L2 ($6,35 \pm 1,38$ mm) (Figura 8) com diferença significativa ($F_{2,33} = 119,66$; $p < 0,001$).

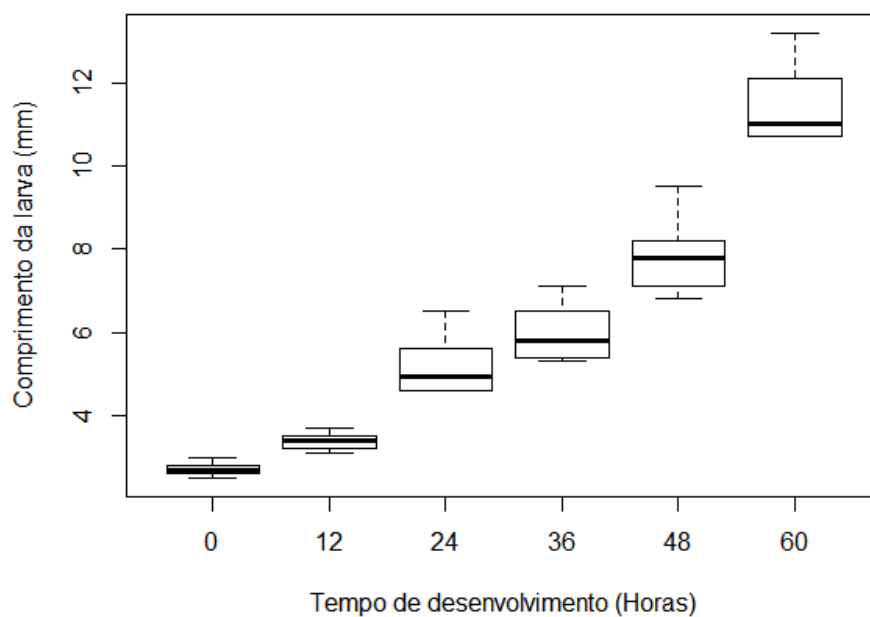


Figura 7. Média do comprimento larval (mm) de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

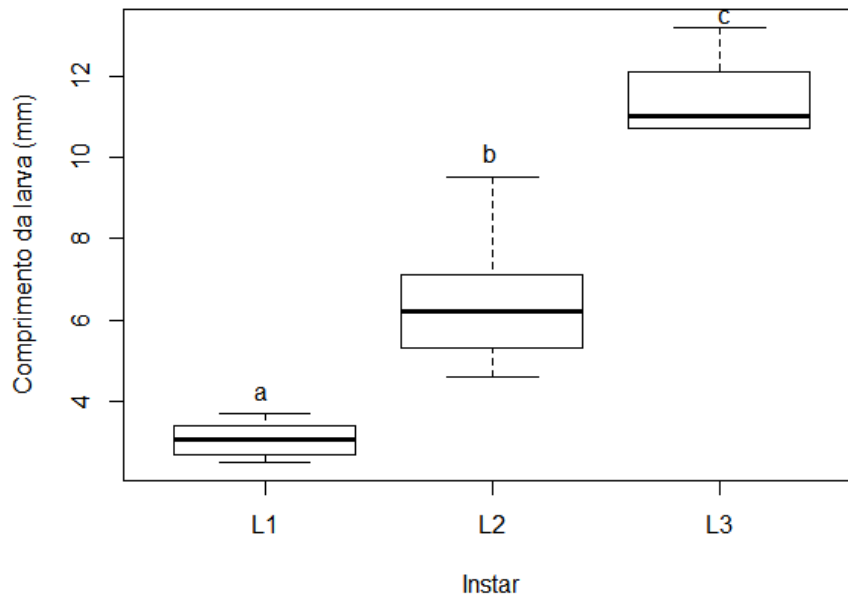


Figura 8. Relação entre o comprimento e os instares larvais de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

Nos primeiros instares (L1 a L2) houve um maior ganho, diminuindo de L2 até o terceiro instar (L3). O valor inicial de comprimento médio em L1 foi de 3,38 mm; no segundo instar (L2) o imaturo ganhou 4,48 mm e no terceiro instar (L3) esse ganho diminuiu para 3,58 mm (Figura 9).

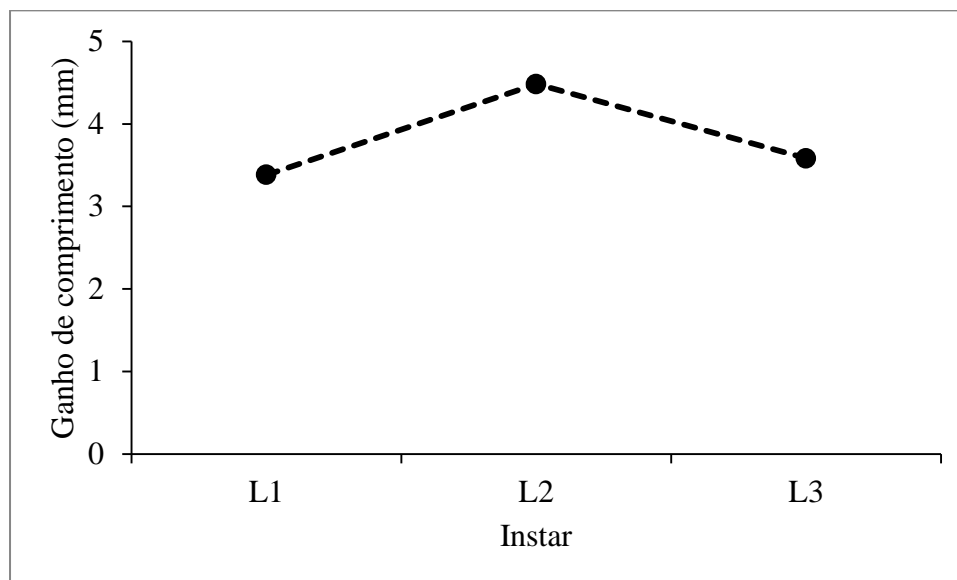


Figura 9. Ganho de comprimento (mm) nos instares larvais de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante, com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

A massa das larvas de *P. fulvinota* aumentou ao longo do desenvolvimento. No momento da eclosão 0,09 mg e após 60 horas, no terceiro instar (L3) $31,67 \pm 5,09$ mg (Figura 10). As L3 ($31,67 \pm 5,09$ mm) apresentaram maiores valores de massa em relação as larvas de L1 ($0,32 \pm 0,38$ mm) e L2 ($6,59 \pm 4,6$ mm) (Figura 11), com diferença significativa ($F_{2,33} = 134,36$; $p < 0,001$).

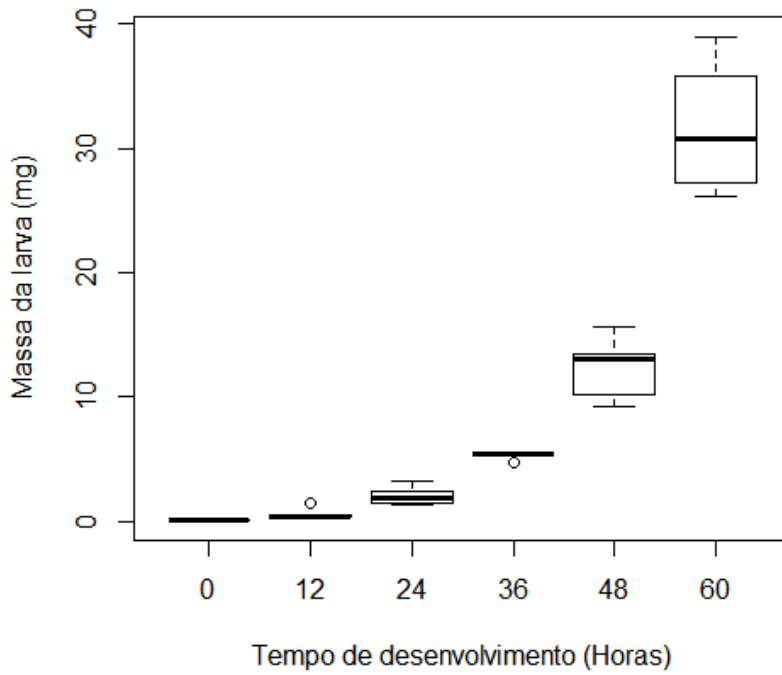


Figura 10. Média da massa corporal (mg) dos imaturos de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

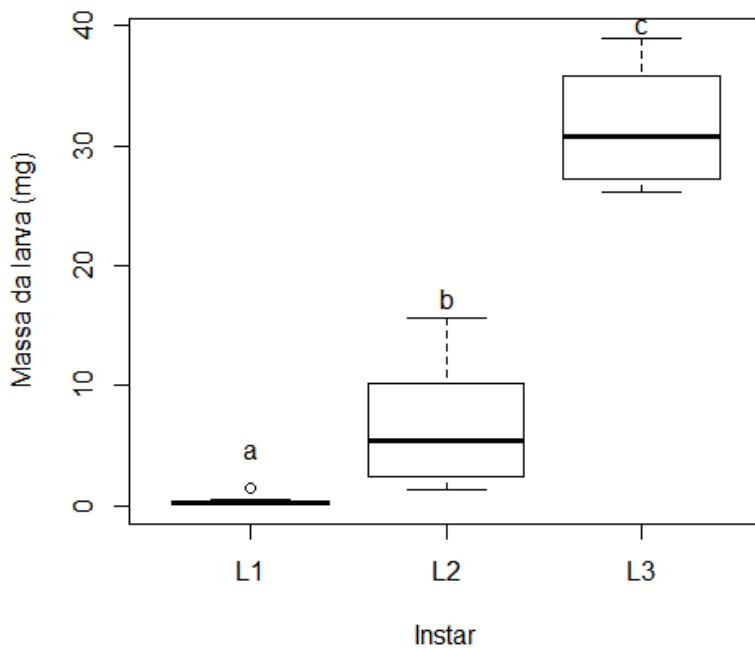


Figura 11. Relação entre massa (mg) larval e os ínstars de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

Em relação ao ganho de massa, os imaturos tiveram um aumento a cada instar. O valor inicial foi de 0,55 mg no primeiro instar (L1); no segundo instar (L2) o imaturo ganhou 11,89 mg e no terceiro instar (L3) esse ganho foi de 19,22 mm (Figura 12).

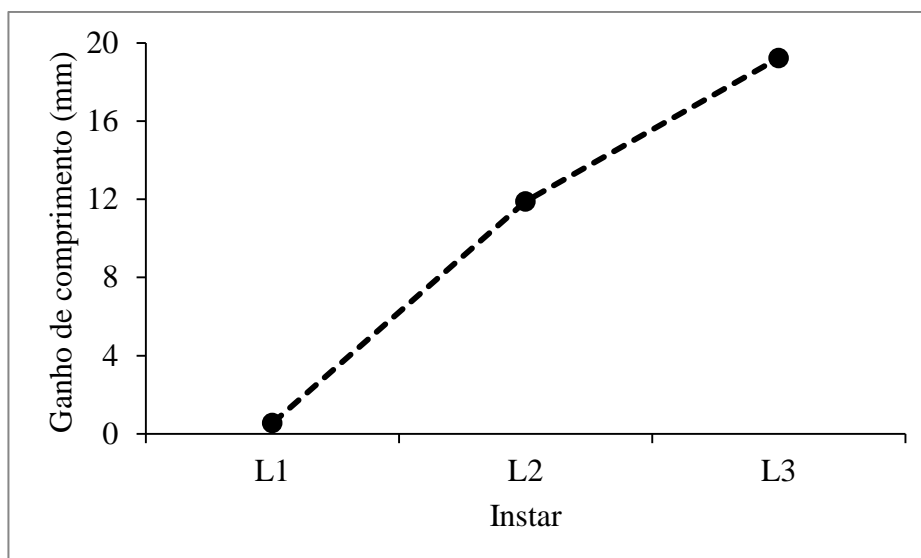


Figura 12. Ganho de massa corporal (mg) dos instares larvais de *Paralucilia fulvinota* em temperatura não constante com média de 24,5 °C na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

4.3. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)

No presente trabalho foi calculado o GDA e GHA utilizando a média de temperatura sendo de 24,5°C, com máxima de 27,6 °C e mínima de 21,1 °C.

Os valores totais de GHA e GDA para *P. fulvinota* foram de 4.569 e 190, respectivamente (Tabela 1). Para os dois índices os valores de L3-pupa foram inferiores em relação à L1-L3 e Pupa-adulto (Tabela 1).

Tabela 1. Grau-dia e Grau-hora acumulados para o desenvolvimento larval e pupal de *Paralucilia fulvinota* coletados na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

Obs.: Os valores foram calculados com temperatura média de 24,5°C e limiar mínimo de 10°C (Higley e Peterson, 1994)

Índice	Estágios			TOTAL
	L1 - L3	L3 - PUPA	PUPA - ADULTO	
Grau-hora acumulado = GHA	1687,80	991,80	1945,32	4569,24
Grau-dia acumulado = GDA	70,33	41,33	81,06	190,39

5. Discussão

5.1. Tempo de desenvolvimento

O estudo do tempo de desenvolvimento de espécies de Calliphoridae de importância forense são bastante comuns em diversas regiões (Lecheta, 2012), entretanto dados bionômicos de uma determinada espécie necrófaga não devem ser extrapolados para diferentes localidades, em função de oscilações térmicas, umidade entre outras particularidades de cada espécie.

Segundo Ururahy-Rodrigues (2008) morfótipos de *Paralucilia* foram obtidos em carcaça de suínos em área de mata na mesma região estudada neste trabalho em temperatura ambiente a 26,1 °C, sendo a maior abundância no terceiro dia pós-morte. Outra ocorrência da espécie sob temperatura ambiente de 27 °C de foi constatada em suínos parcialmente submersos em igarapés de mata da área *op cit* juntamente com outras espécies do gênero, a exemplo de *P. paraensis* e *P. pseudolyrcea* a partir do terceiro dia pós-morte (Oliveira-da-Silva, 2011), corroborando nossos resultados sobre a ocorrência da espécie no terceiro dia pós morte juntamente com outras espécies do gênero em temperaturas semelhantes para o período menos chuvoso nesta região.

P. fulvinota coletada no Peru e no Brasil (Tabela 2) em Roraima, sob faixa de temperatura de 21,7°C a 26°C revelam que o tempo do desenvolvimento total foi semelhante ao registrado neste trabalho (~13 dias) entretanto houve variação na duração dos instares (L1 a pupa) (Greenberger e Szyska, 1984; Pujol-Luz *et al.*, 2006).

Em área urbana (Barros-Souza *et al.* 2011) e de mata (Sales *et al.*, 2013) em Manaus, AM as informações de *P. paraensis* diferem aos obtidos nesse estudo tanto no tempo total quanto na duração dos instares, mesmo quando a temperatura esteve entre 21 e 26 °C demonstrando que mesmo em espécies morfologicamente semelhantes existem diferenças no tempo de desenvolvimento (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo de desenvolvimento em temperatura ambiente de espécies de *Paralucilia* coletada neste e em outros trabalhos demonstrando a diferença entre nos intares larvais de espécies morfológicamente semelhante.

	Duração Média do Tempo de Desenvolvimento (Horas)					
	Temperatura	L1	L2	L3	Pupa	Total
Referências						
Greenberger e Szyska (1984) <i>Paralucilia fulvinota</i>	21,7- 26° C	22	16,3	144	124	336
Pujol-Luz et al. (2006) <i>Paralucilia fulvinota</i>	26 °C	18	30	117	141	304,8
Barros-Souza et al. (2011) <i>Paralucilia paraensis</i>	25,8 °C	11,4	13	81,1	144,14	268,5
Sales et al. (2013) <i>Paralucilia paraensis</i>	26 °C	13	18	46	96	216
Dados deste estudo <i>Paralucilia fulvinota</i>	24,5 °C	12	36	72	144	312

5.2. Razão Sexual

Em cadáveres de porcos submersos nesta região, foi registrado maior número de fêmeas em *P. fulvinota*, *P. paraensis* e *P. pseudolyrcea* em relação ao número de machos (Oliveira-da-Silva, 2011), corroborando nossas observações, onde o esperado seria se obter a metade da prole de machos e metade de fêmeas como descrito em *P. paraensis* por Barros-Souza (2009). Isso pode estar relacionado ao fato de algumas espécies de Calliphoridae serem monogênicas, originando proles teligênicas (somente fêmeas) ou arrenogênicas (somente machos).

Observações complementares sobre a coloração foram feitas durante o desenvolvimento dos imaturos. Trabalhos anteriores relatam que larvas de espécies de *Paralucilia* apresentam coloração branco creme no primeiro e segundo instar, corroborando as observações atuais. Entretanto, nossas larvas de terceiro instar assumiram uma coloração cinza-escuro. Essas mudanças de coloração também foram observadas por Greenberg e Szyska (1984) utilizando isca de peixe e fígado na localidade de San Ramón (Peru). Larvas de *P. fulvinota* a partir do terceiro instar se tornaram azuis. Segundo os autores essa mudança é uma espécie de camuflagem contra

predadores. No atual trabalho a coloração assumida pelas larvas (L3) foi semelhante a do solo onde o cadáver se encontrava. Outras informações foram reportadas por Tobin *et al.* (1971) que relatou o pigmento azul em larvas de terceiro ínstar de *Orthellia caesarion* (Meigen, 1826) (Diptera, Muscidae).

5.3. Comprimento e Massa Larval

Através dos valores de massa e comprimento, foi constatado que os imaturos crescem mais em volume do que em comprimento. Assim, medidas de comprimento podem não ser o melhor fator utilizado para a determinação do estágio e tempo de desenvolvimento. Segundo Oliveira-Costa (2011) os imaturos sofrem uma ligeira inclinação na extremidade anterior da parte ventral, o que pode induzir um entomologista forense ao erro. Para solucionar esse problema foi sugerido utilizar a média da largura do quinto e sexto segmento abdominal em relação ao comprimento larval (Day e Walmann, 2006). Apesar desses diferentes contrapontos, trabalhos com espécies de Calliphoridae utilizam medidas do comprimento larval desde o segmento cefálico até o último segmento abdominal (Queiroz, 1995; Thyssen, 2005; Lecheta, 2012)

Thyssen (2005) com informações de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* em Campinas (SP) relatou diferenças de comprimento durante o tempo de desenvolvimento mesmo entre espécie morfologicamente semelhantes. No atual trabalho os imaturos tiveram no primeiro instar tamanho semelhante ($3,05 \pm 0,40$ mm) à *H. segmentaria* (3,38 mm). No decorrer do desenvolvimento (segundo ínstar: $6,35 \pm 1,38$; terceiro ínstar: $11,45 \pm 1,00$ mm), apresentaram médias de comprimento inferior aos encontrados para *H. segmentaria* (segundo ínstar: $9,23 \pm 0,11$ mm; terceiro ínstar: $15,86 \pm 0,01$) mostrando a importância do estudo individual da biologia de espécies de importância forense.

5.4. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)

Ao utilizar um suíno em área urbana Barros-Souza *et al.* (2011) apresentaram GHA e GDA para *P. paraensis* em temperatura não constante, onde registrou os valores no tempo total de desenvolvimento de 4841,06 para GHA e 201,71 para GDA. Esses valores são superiores ao observado no atual estudo onde GHA foi de 4569,24 e o GDA

foi de 190,385, apresentando assim diferenças que mostram que os valores são específicos para cada espécie e não devem ser utilizados mesmo para espécies morfológicamente semelhantes.

O cálculo dos valores de GDA e GHA são os principais métodos utilizados para a determinação do IPM, onde assume como pressuposto de que a taxa de desenvolvimento e a temperatura possuem uma relação linear, sendo de extrema importância que se realize estudos em temperatura não controlada para que se possam obter valores mais precisos de IPM (Barros-Souza *et al.*, 2011) já que a maioria desses estudos é feito com temperatura constante.

Capitulo II

Efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento, massa e comprimento de imaturos de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera:Calliphoridae) de interesse forense

Abril , 2015

Efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento, massa e comprimento de imaturos de *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera:Calliphoridae) de interesse forense

Resumo: A entomologia forense aplica o estudo dos insetos a procedimentos legais. Os insetos necrófagos são os primeiros invertebrados que colonizam corpos em decomposição gerando ferramentas para auxiliar na estimativa de IPM (Intervalo pós-morte). Estudos mostram que o fator mais importante sobre o desenvolvimento dos estágios imaturos de Calliphoridae (Diptera) é a temperatura. *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) é indicador forense nesta região, entretanto há pouco conhecimento da espécie, fazendo-se necessário estudos bionômicos sob diferentes temperaturas para que possa dar suporte em casos de estimativa de intervalo pós morte (IPM). Este trabalho teve como objetivo fornecer informações sobre *P. fulvinota* em temperatura controlada a fim de obter dados que possam auxiliar na estimativa de IPM de cadavers encontrados nesta região. O presente trabalho foi realizado na Reserva Florestal Ducke, Manaus Amazonas em novembro e dezembro de 2014. Fêmeas grávidas de *P. fulvinota* foram coletadas um suíno *Sus scrofa* de 40 Kg. Os imaturos provenientes de colônias de estoque foram criados nas temperaturas de 20, 23, 26, 29, 32 e 35°C com fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 80±10%. Houve uma relação negativa entre o tempo de desenvolvimento e a temperatura. A razão sexual teve uma relação positiva, aumentando o número de indivíduos a cada temperatura. A duração do tempo de desenvolvimento foi maior a 20°C (~25 dias) com razão sexual de 0,3 (7 ♂ e 3 ♀), enquanto que o menor tempo de desenvolvimento aconteceu a 29°C (~11 dias) com razão sexual de 0,6 (18 ♂ e 27 ♀). O número de ♂ sempre foi maior que o de fêmeas a 20 e 23° C, ao contrário disso ocorreu a 29° C. A faixa ótima de desenvolvimento foi em 23 e 26° C, onde houve ganho constante tanto em massa quanto em comprimento. Os imaturos nas temperaturas de 32 e 35°C não atingiram o desenvolvimento completo. As informações fornecidas por esse trabalho servirão de base para cálculo do IPM de corpos encontrados nesta região.

Palavras-chave: *Paralucilia fulvinota*; temperaturas controladas; cálculo de IPM; Amazonas

Effect of different temperature on development, weight and length of immature *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Diptera: Calliphoridae) of forensic interest

ABSTRACT

The Forensic Entomology applies from corpse developing insects to legal proceedings. Scavenger insects are the first group of invertebrates to colonize the decomposing bodies. For this reason the help estimating the PMI (Post Mortem Interval). Researches have proved that the most important variable about the stages of development in Calliphoridae (Diptera) is the temperature. *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) is the forensic indicator in this region. Due to the fact that there is limited knowledge of this species, further studies on its bionomics, under different temperatures, is needed to help stimulate the PMI and give support in some cases involving deaths. This research aims at providing information about *P. fulvinota* in controlled temperature environments to obtain data that will assist the PMI estimation of corpses found in this region. This study has been carried out at Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas between November and December, 2014. Pregnant female individuals of *P. fulvinota* were collected from the corpse of a forty-kilo swine (*Sus scrofa*). Immature individuals came from stock colonies. They were raised in temperatures of: 20, 23, 26, 29, 32 e 35°C, photoperiod of 12 hours, relative humidity 80±10%. Only one negative connection between development time and temperature. The Gender ration had a positive effect, for it increased the number of individuals as the temperature raised. Development time was longer at 20°C (~25 days), gender ratio: 0,3 (7 ♂ and 3 ♀), whereas the shorter was at 29°C (~11 days) gender ratio 0,6 (18 ♂ and 27 ♀). The number of male individuals was higher than females' at 20 and 23° C. The inverted ratio of males and females happened at 29° C. The optimal development temperatures happened at 23 and 26° C. Under these temperatures there was consistent gain in body mass and length. Immatures at 32 and 35°C did not reach full development. Information provided from this research will be used to feed the PMI calculations of the bodies found in this region.

Key-words: *Paralucilia fulvinota*; controlled temperatures, PMI calculation, Amazonas

1. INTRODUÇÃO

Atualmente cientistas forenses e as instituições judiciais utilizam estudos entomológicos junto a outras técnicas de investigação, sendo os vestígios entomológicos coletados por peritos e a identificação é feita por entomólogos experientes (Catts e Haskell, 1991).

Os insetos necrófagos estão entre os primeiros grupos de invertebrados que colonizam corpos em decomposição, utilizando matéria orgânica como fonte protéica de alimento, estimulando a oviposição ou para alimentação das formas imaturas, dessa forma acelerando a putrefação e a desintegração do corpo (Oliveira-Costa, 2011). Como a alimentação e a reprodução desses insetos esta associada a decomposição, esses hábitos possibilitam aplicação em investigações de litígios (Oliveira-Costa 2011).

Existem vários métodos para a estimativa de intervalo pós-morte (IPM), entre os principais i) tamanho e massa larval, comparando a temperatura e tempo de desenvolvimento (Grassberger e Reiter, 2002); ii) cálculo do GDA (Grau-Dia-Acumulado) e GHA (Grau-Hora-Acumulado), necessário para encontrar um determinado estágio de desenvolvimento, sendo esse o melhor método para determinar o IPM (Krüger *et al.*, 2010); iii) o método da PIA (Período de Atividade de Insetos), que indica quando a colonização de insetos ocorreu no cadáver assim que a primeira fêmea adulta de inseto teve acesso logo após a morte, ou seja, um tempo mínimo desde a morte conhecido como intervalo mínimo pós-morte (Amendt *et al.*, 2007).

Para que se possa apurar o IPM é necessário que se conheça a identificação dos insetos associados à decomposição assim como suas características do ciclo de vida, ecológicas e biológicas (Marchenko, 2001). A disponibilidade de dados relativos à duração de cada ínstar em diferentes temperaturas é essencial para a estimativa de IPM, utilizando dados entomológicos (Amendt *et al.*, 2011). O desenvolvimento mínimo e máximo não é estabilizado em muitas espécies de Calliphoridae e para usar o desenvolvimento larval na estimativa de IPM, é necessário conhecer informações sobre o desenvolvimento individual das espécies (Byrd e Allen, 2001), pois a taxa de desenvolvimento difere entre espécies, mesmo entre aquelas intimamente relacionadas (Richards *et al.*, 2009).

Para auxiliar na estimativa de IPM (Intervalo pós-morte) as correlações de temperatura e tempo de desenvolvimento podem gerar ferramentas úteis (Nabity *et al.*, 2006). No entanto, os estudos em meio natural usando ciclo de temperatura são

incompletos, pois as espécies estão sujeitas a flutuações de temperatura (Byrd e Butler, 1998). A influência da flutuação de temperatura, em relação à temperatura constante pode gerar erros relacionados ao cálculo de IPM (Byrd e Allen, 2001). Muitos dados referentes ao desenvolvimento de Calliphoridae são relacionados a temperaturas constantes, sendo necessário ajustar os dados de desenvolvimento em relação às variações de temperatura (Krüger *et al.*, 2010).

1.1. Efeito de temperatura no tempo de desenvolvimento

Os insetos são classificados como ectotérmicos, ou seja, sua taxa de desenvolvimento depende da intensidade das condições ambientais, determinando importantes processos fisiológicos como o metabolismo e influenciando diretamente no seu desenvolvimento, comportamento e na adequação a determinado ambiente, a longevidade a duração do período de pré-ovoposição e a capacidade de postura (Salvadori e Parra, 1990).

De maneira geral, podemos dizer que temperaturas mais altas aumenta a taxa de crescimento e diminui o tempo de desenvolvimento larval até um determinado limiar (Atkinson, 1994; Atkinson e Sibly, 1997). Sendo assim a mudança da temperatura provoca variações na duração, massa e comprimento das larvas (Lecheta, 2012). Assim como outros animais os insetos possuem uma temperatura ótima de desenvolvimento e quando esta cai a um determinado limiar mínimo o desenvolvimento cessa e abaixo desse limiar morrem, sendo o mesmo em limiares máximos (Oliveira-Costa, 2011).

1.2. Efeito de temperatura nas características biométricas (massa e comprimento)

Os insetos em estágios imaturos que ocorrem durante a decomposição são muito mais difíceis de identificar do que os adultos (Thyssen, 2005). Entre as razões podemos citar as minúsculas diferenças entre as espécies, principalmente as morfologicamente mais próximas (Liu e Greenberg, 1989).

A massa e o comprimento são parâmetros que dependem da temperatura ao qual o imaturo se encontra, sendo que uma vez conhecidas essas informações, é possível estimar o tempo que a larva levou para alcançar determinado estágio e obter informações que ajudarão na determinação do IPM (Lecheta, 2012). De acordo com

Greenberg e Kunich (2002) esses fatores são influenciados principalmente pela temperatura assim como a dieta ao qual são submetidos, principalmente no segundo e terceiro ínstar.

Existem certas restrições referentes ao método que utiliza tamanho e massa larval, devido ao número limitado de publicações (Ames e Turner, 2003).

Desde a eclosão até o estágio de pupa, massa e comprimento estão relacionados, aumentando nos estágios de alimentação e diminuindo na fase de dispersão larval (Nishida, 1984; Davies e Ratcliffe 1994).

Informações sobre a massa e o comprimento larval de imaturos, são juntamente com o cálculo do grau dia e grau hora acumulados, os componentes mais utilizados para a determinação do IPM (Richards *et al.*, 2008).

O comprimento de larvas de interesse forense normalmente é utilizado em casos onde os cadáveres são encontrados em ambientes fechados em temperatura constante (Reiter, 1984; Grassberger e Reiter, 2002). Em relação à massa, não se pode usar a massa úmida como parâmetro, já que não há padrão publicado para convertê-lo em massa da larva viva, sendo o mais comum associar o massa e comprimento ou utilizar apenas o comprimento (Oliveria-Costa, 2011).

1.3. GDA (Grau-Dia-Acumulado) e o GHA (Grau-Hora-Acumulado)

São produtos do efeito da temperatura sobre o desenvolvimento mínimo da espécie e o tempo gasto para atingir determinado estágio em determinada temperatura (Ames e Turner, 2003), ou seja, é a temperatura adequada entre os dois limiares para seu desenvolvimento em uma determinada base horária (Oliveira-Costa, 2011). O cálculo do grau-dia acumulado relaciona dados de desenvolvimento das espécies criadas em laboratório com condições ambientais a que estariam expostas, ou seja, relaciona a intensidade de temperatura que o inseto requer para completar seu desenvolvimento (Oliveira-Costa, 2011). No método de grau-dia (GDA) o desenvolvimento é medido como tempo térmico e cada estágio de desenvolvimento do inseto exige um número específico de grau-dia acumulados para alcançar o estágio seguinte. Os dados de tempo de desenvolvimento geralmente são resumidos em um modelo de grau-dia acumulado (GDA) (Amendt *et al.*, 2011), pois há uma relação positiva entre a taxa de desenvolvimento e o efeito da temperatura, sendo que o desenvolvimento cessa abaixo de um limiar mínimo (Byrd e Allen, 2001; Greenberg e Kunich, 2002; Richard e Villet, 2009; Higley e Haskell, 2010).

Nas espécies de interesse forense há poucos dados em mais de cinco temperaturas constantes (Higley e Haskell, 2010). Com base nas informações de Pujol-Luz (2006) e Oliveira-da-Silva (2011), considerando a importância das espécies de Calliphoridae, entre elas *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) que é indicador forense nesta região, se faz necessário um estudo biológico sob temperatura controlada para que possa dar suporte em casos de estimativa de IPM utilizando insetos necrófagos em cadáveres encontrados nessa região.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Fornecer informações bionômicas sobre *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) a fim de obter dados para auxiliar na estimativa do IPM (intervalo pós-morte) de cadáveres encontrados no Amazonas.

2.2. Específicos

- Verificar o efeito de temperaturas constantes (20, 23, 26, 29, 32 e 35°C) no desenvolvimento pós-embrionário (larva a adulto) e a razão sexual de *P. fulvinota*;
- Verificar como temperaturas constantes (20, 23, 26, 29, 32 e 35°C) afetam a massa corporal e o comprimento das larvas durante o desenvolvimento de *P. fulvinota*;
- Calcular o GDA (Grau-Dia Acumulado) e GHA (Grau-Hora Acumulado), para estabelecer o tempo necessário do desenvolvimento dos estágios imaturos (L1, L2, L3 e de pupa a adulto) de *P. fulvinota* em temperatura constante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

A região de Manaus apresenta clima equatorial úmido, com temperatura anual média de 26°C, variando de 23,3°C a 31,4°C, com umidade relativa de 80% e média anual de chuvas de 2.286 mm³ (Costa *et al.*, 2013).

O presente trabalho foi realizado na Reserva Florestal Ducke (Figura 1) no Km 26 da rodovia estadual AM-10 Manaus, Amazonas (02° 55' 44.8" S; 59° 58' 22.4" O), abrangendo uma área de 10.000 ha (Mendonça *et al.*, 2005). O tipo de vegetação é classificada como floresta tropical úmida de terra firme com relevo elevado apresentando diferenças de 80m entre o platô e as partes mais baixas. As precipitações são periódicas com duas estações anuais distintas sendo uma chuvosa, nos meses de dezembro a maio, e outra menos chuvosa, de junho a outubro (Ribeiro *et al.*, 1999). Há ainda uma terceira estação que pode ser definida como de transição que compreende os meses de novembro a dezembro (Irión *et al.*, 1997).

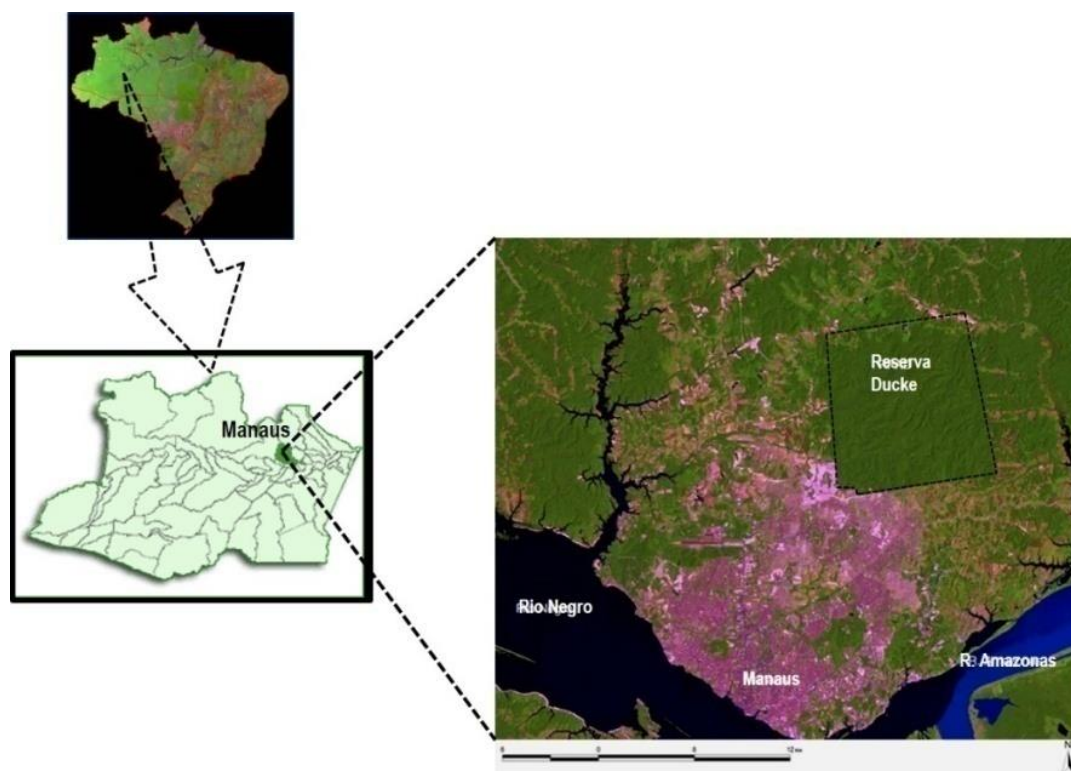


Figura 1. Imagem de satélite da área de estudo na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM (Adaptado de Oliveira-da-Silva, 2011).

3.2 Coleta, criação do material e manutenção das colônias de estoque

Fêmeas grávidas de *P. fulvinota* foram coletadas utilizando como isca atrativa, um suíno *Sus scrofa* (Linn.) de 40 Kg (Figura 2), (Protocolo nº 007/2014-CEUA/UFAM, no período entre novembro e dezembro 2014 (período chuvoso). Para isso, foi montada uma gaiola de ferro com dimensões de 2x2x 2m para evitar a predação por mamíferos e aves de grande porte. No interior da gaiola foi montada uma armadilha de cor branca tipo *Shannon* (1,50 x 1,5 x 1,5m). As fêmeas foram coletadas utilizando tubos *Falcon* com tampa de rosca (50 mL), em seguida os exemplares foram transferidos para gaiolas de criação utilizando garrafas plásticas de 5 L. Para alimentação e oviposição foi utilizado, líquido açucarado e carne bovina moída crua.



Figura 2. Detalhe do cadáver de suíno *Sus scrofa* em decomposição na fase coliquativa, coberto por larvas de Calliphoridae (Diptera) na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM.

As gaiolas de criação foram mantidas em câmara climática de germinação (Biochemical Oxygen Demand/ BOD) com temperatura de 26°C e umidade entre 80% \pm 10% sendo estes fatores acompanhados utilizando um termo-higrômetro digital (modelo INCOTERM). Os ovos obtidos desta geração deram origem às colônias de estoque, de onde foram retiradas as posturas para manutenção e a realização do experimento (Lecheta, 2012). Fêmeas adultas, após a oviposição foram levadas para Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos (LACIA/ CBIO/ INPA) onde foram identificadas de acordo com as chaves de Mello (1969, 1996, 2003) e Amat (2009) e posteriormente confirmadas pelo Dr. Rubens Pinto de Mello da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro - RJ, especialista em Calliphoridae

Os ovos obtidos das colônias de estoque foram colocados em placa de Petri forradas com papel filtro umedecido e um pedaço de carne bovina moída crua dentro da BOD sobre as mesmas condições em que foram criados (26°C e umidade entre 80% \pm 10%) . Após a eclosão, 60 larvas foram inoculadas em carne moída na proporção de 1g por larva em potes plásticos cobertos com tecido organza (para evitar a contaminação do material) e transferidas para câmaras (BOD) (Queiroz *et al.*, 1996).

Para a escolha dos intervalos de temperaturas adotados neste estudo, tomou-se como base as temperaturas desta região (média 26,7° C entre 23,3 °C e 31,4 °C) (Costa *et al.*, 2013). Desta forma, as amostras foram agrupadas em seis réplicas nas temperaturas de 20, 23, 26, 29, 32 e 35°C com fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 80 \pm 10%. Destas apenas uma réplica foi utilizada para a retirada das amostras de massa e comprimento larval.

3.3. Parâmetros biológicos: tempo de desenvolvimento e razão sexual

Para verificar o efeito da temperatura no desenvolvimento de *P. fulvinota* foram verificados o tempo de larva a adulto, a duração de cada estágio (L1, L2, L3 e pupa) e a razão sexual dos adultos emergidos.

Após a eclosão das larvas, as mesmas foram observadas de 12 em 12 horas até abandonarem a dieta (Queiroz *et al.*, 1996). Cada ínstar foi caracterizado utilizando as aberturas espiraculares (Oliveira-Costa, 2011). Ao atingir o terceiro ínstar, foram contabilizadas e individualizadas em tubos *Falcon* de 15 mL e fechados com algodão hidrofóbico. A partir desse período as observações foram feitas a cada 24 horas, até todos os exemplares atingirem o estágio de pupa, onde continuaram a ser observados a cada 24 horas ate atingirem o estágio adulto.

A razão sexual (Silveira-Neto *et al.*, 1976) foi verificada utilizando à seguinte fórmula: **Razão sexual = número de fêmeas/**

número de fêmeas + número de machos.

3.4. Parâmetros Biométricos

A cada observação de 12 horas (0 hora, 12 horas, 24, 36, 48, 60 horas ou mais) foi separado 10% dos imaturos de uma das seis réplicas de cada temperatura. Posteriormente foram lavados em água destilada para a retirada dos resíduos da criação e transferidos para secagem em papel filtro. Foram sacrificados em água destilada a 70° C e colocados em KAAD (Etanol 95% (70 a 100 mL), querosene (10 mL), Ácido Acético Glacial (20 mL), Dioxano (10 mL) por um período de 12 horas. Em seguida transferidos para etanol a 70% para as análises.

O comprimento total das larvas foi medido a partir do segmento cefálico até a extremidade distal do último segmento (Lecheta, 2012). A pesagem das larvas foi feita para cada ínstar (L1 a L3) utilizando uma balança de precisão (Mettler-Toledo; acurácia = 0,01 mg). Após as análise o material foi acondicionado em microtúbos (2,0 mL) com etanol 95% (Oliveira-Costa, 2011).

As medidas foram realizadas em estereoscópico Leica M165C, com ocular micrométrica. Os espécimes adultos obtidos da criação foram etiquetados, montados em alfinetes e mantidos em caixas entomológicas para serem depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA.

3.5. Análise Estatística

Para verificar a diferença do tempo de desenvolvimento dos indivíduos entre as diferentes temperaturas onde houve desenvolvimento completo (20, 23, 26, 29°C) foi realizada uma análise de variância (ANOVA) aninhada de um fator. Como variável dependente foi utilizada a massa / comprimento e os instares como variável independente. As análises foram realizadas no software estatístico R (R Development Core Team 2011), utilizando o pacote nlme (Pinheiro *et al.*, 2015).

Para análise do ganho de massa e de comprimento, foi calculada a diferença entre os valores das médias das variáveis (massa e comprimento) entre os instares subsequentes (Lecheta, 2012).

3.6. Grau-Dia Acumulado (GDA) e Grau-Hora Acumulado (GHA)

Para o cálculo dos valores de GDA e GHA foi utilizado a fórmula de Higley e Haskell (2003) conforme abaixo descrita. O limiar mínimo utilizado foi de 10° C sugerido por Higley e Peterson (1994), para espécies da região neotropical pois não existem dados de exigências térmicas para a espécie alvo desse estudo.

$$\text{GHA esperado} = (\text{Temperatura de criação} - \text{limiar de temperatura}) \times \text{Tempo de desenvolvimento}$$

$$\text{GDA esperado} = \frac{\text{GHA esperado}}{24 \text{ horas}}$$

4. RESULTADOS

4.1. Tempo de desenvolvimento em temperaturas constantes

Foi observada uma relação negativa entre o tempo de desenvolvimento e a temperatura, com maior duração em 20°C (~25 dias), enquanto que em 29°C foi de ~11 dias ($F_{3,108} = 81,36$; $p < 0,001$ (Figura 3). Os imaturos nas temperaturas de 32 e 35°C não atingiram o desenvolvimento completo, chegando apenas ao ínstar L3, com tempo aproximado de três dias em ambas as temperaturas. Nas demais temperatura o tempo foi de 19 dias a 23 °C e 13 dias a 26 °C (Figura 3). A temperatura ótima de desenvolvimento esteve entre 23 e 26°C (Figuras 3-8).

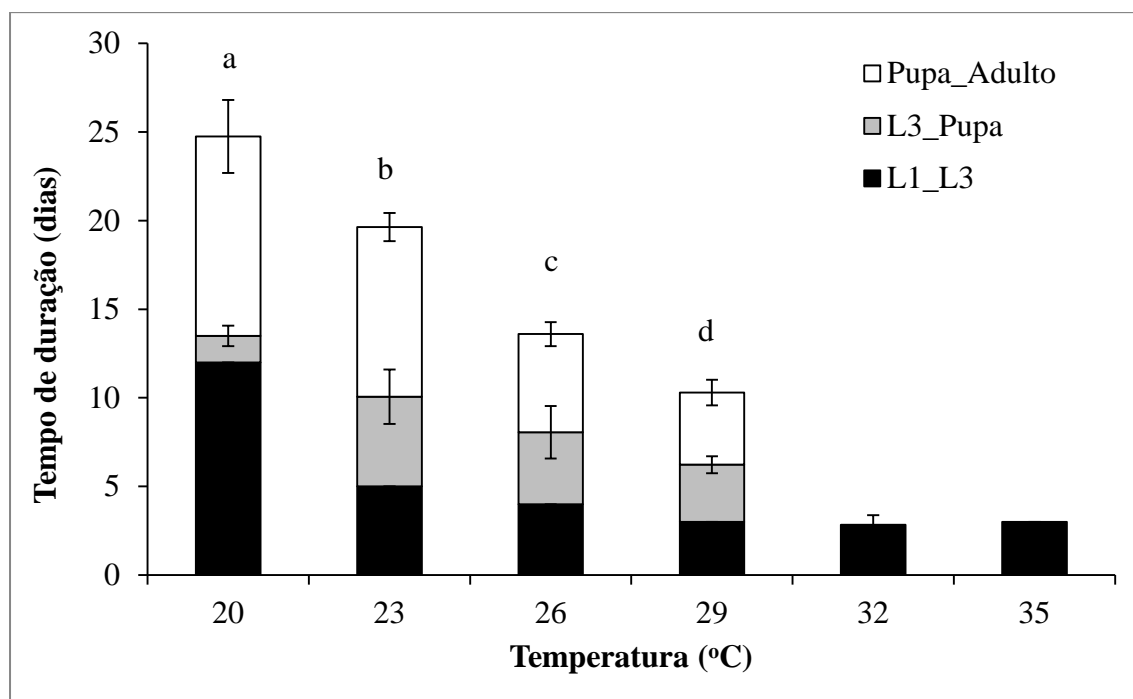


Figura 3. Tempo de desenvolvimento em relação as temperaturas de 20° a 35°C ($F_{3,108} = 81,36$; $p < 0,001$).

4.2. Razão Sexual

O menor número de indivíduos adultos foi obtido em 20°C (7 machos e 3 fêmeas) (Figura 4), sendo no total 10 indivíduos, com razão sexual foi de 0,3. Na temperatura de 23°C o total de adultos foi de 24 indivíduos (11 fêmeas e 13 machos)

com razão sexual de 0,45. Na temperatura de 26 °C foi verificada uma razão sexual de 0,5 com 21 fêmeas e 21 machos, totalizando 42 adultos. O maior número de indivíduos adultos foi registrado a 29°C com um total de 45 indivíduos sendo 27 fêmeas e 18 machos com razão sexual de 0,6. Nas temperaturas de 32 °C e 35 °C não houveram adultos pois os imaturos só se desenvolveram até o terceiro instar. Assim, foi observada uma relação positiva entre o número de fêmeas e machos e o aumento da temperatura.

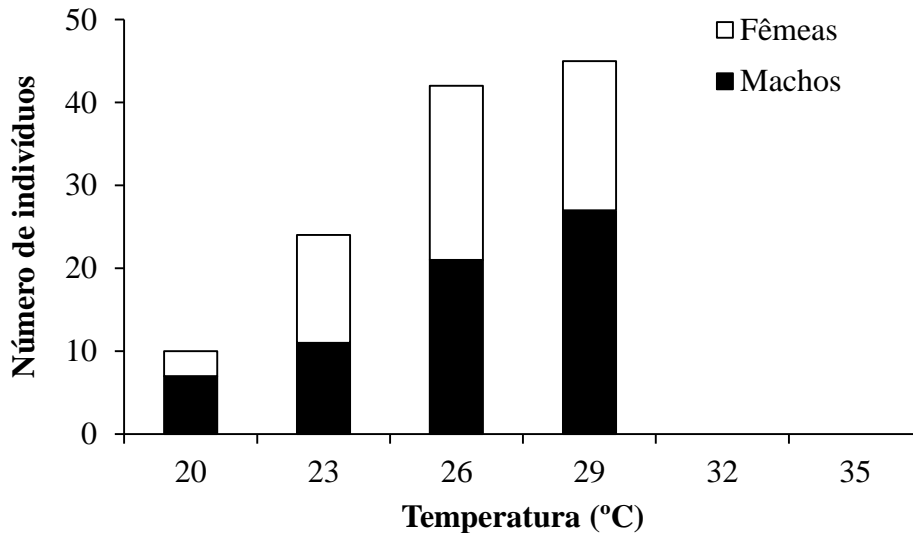


Figura 4. Razão sexual de machos e fêmeas de *Paralucilia fulvinota* entre as temperaturas de 20° a 35°C.

4.3. Comprimento e massa dos imaturos

O comprimento inicial (L1) foi semelhante em todas as temperaturas apresentando diferenças a partir de 24 horas de desenvolvimento, onde foram obtidas larvas (L2) maiores a 35°C, entretanto a partir de 48 horas quando atingiram L3 e começaram a abandonar a dieta as mesmas morreram e não alcançaram desenvolvimento completo. As maiores larvas foram obtidas em 32°C (Interação temperatura x Instar ($F_{10, 216} = 11,11$; $p < 0,001$) com comprimento médio de $19,15 \pm 1,03$ mm, entretanto as mesmas não atingiram desenvolvimento completo. As menores larvas foram obtidas a 20°C, em L3 com média de $11,22 \pm 1,6$ mm (Figura 5).

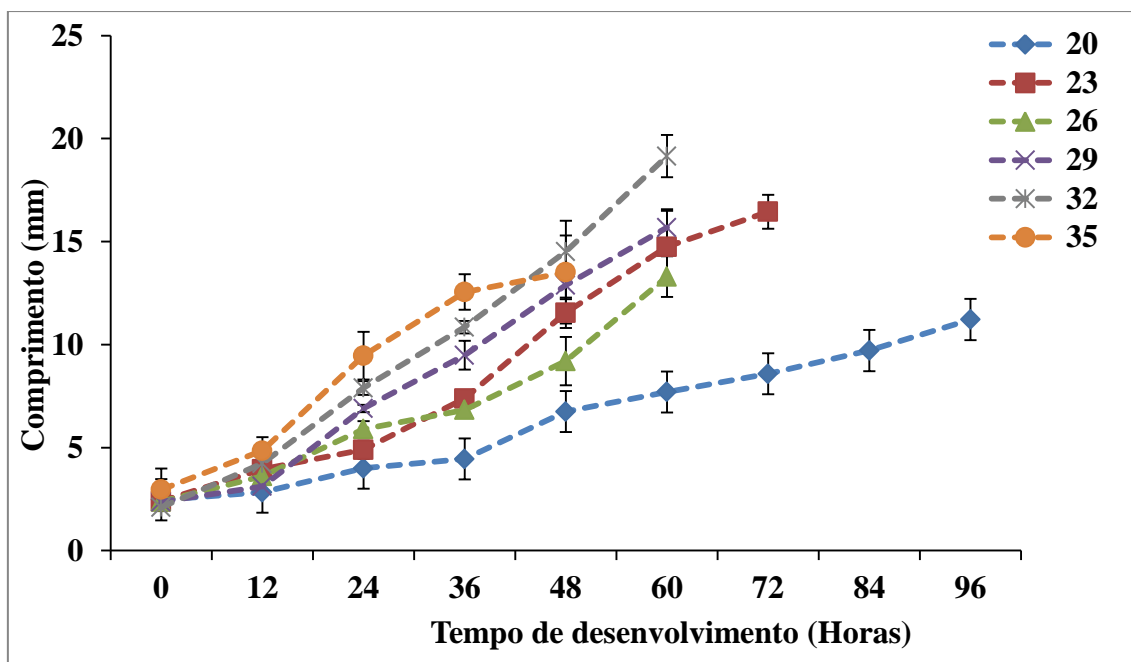


Figura 5. Média do comprimento (mm) dos imaturos de *Paralucilia fulvinota* ao longo do tempo de desenvolvimento em temperatura constante de 20° C a 35° C

Foi observado que houve maior ganho de comprimento de L1 para L2, entretanto esse ganho diminuiu de L2 para L3 ao longo do tempo, assim como ocorrido em temperatura ambiente, com excessão das temperaturas de 23 e 26°C onde houve aumento no ganho de comprimento de L2 para L3 (Figura 5).

O maior valor de ganho de comprimento foi a 29°C entre os ínstaes L1 e L2, sendo que o ganho de comprimento diminuiu a partir do L2 para L3 (Figura 6).

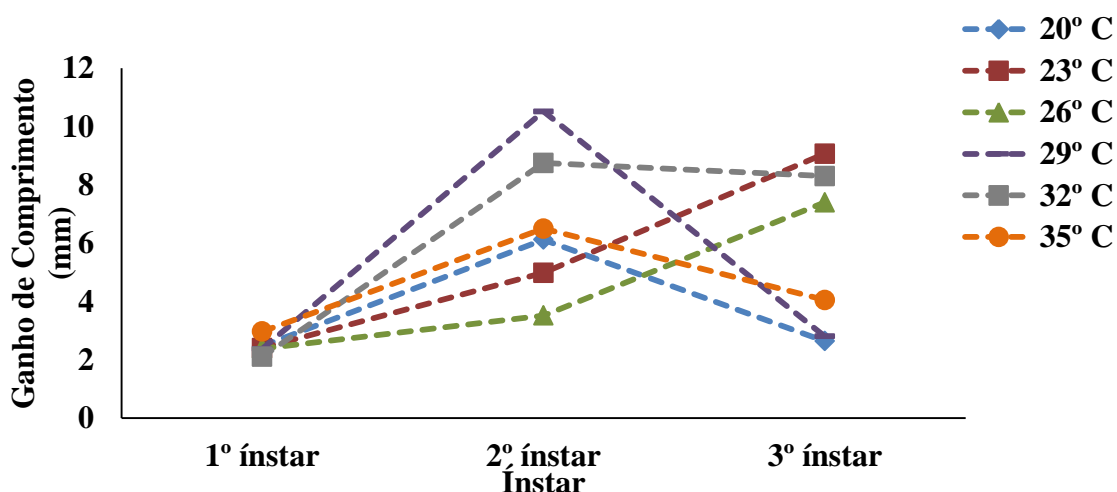


Figura 6. Ganho de comprimento (mm) dos imaturos de *Paralucilia fulvinota* ao longo do tempo de desenvolvimento em temperatura constante de 20° C a 35° C.

A 32°C foi verificada a maior média de massa larval em L3 ($76,6 \pm 2,3$ mg), sendo as maiores médias inicialmente observadas a 35°C. A 48 horas pós a eclosão das larvas as médias de massa foram semelhantes a de 32°C, com valor de $41,7 \pm 21,7$ mg (Interação Temperatura x Instar ($F_{10, 216} = 11,39$; $p < 0,001$)).

As menores médias de massa foram observadas a 20°C e essa média manteve-se baixa durante todo período de observação sendo a inicial de 0,06 mg após a eclosão e em L3 a média foi de $18,12 \pm 2,6$ mg. A segunda maior média de massa larval ($59,26 \pm 9,08$ mg) foi verificada a 23°C onde foram obtidas larvas com médias maiores que na temperatura de 29°C ($51,4 \pm 7,3$ mg) (Figura 7).

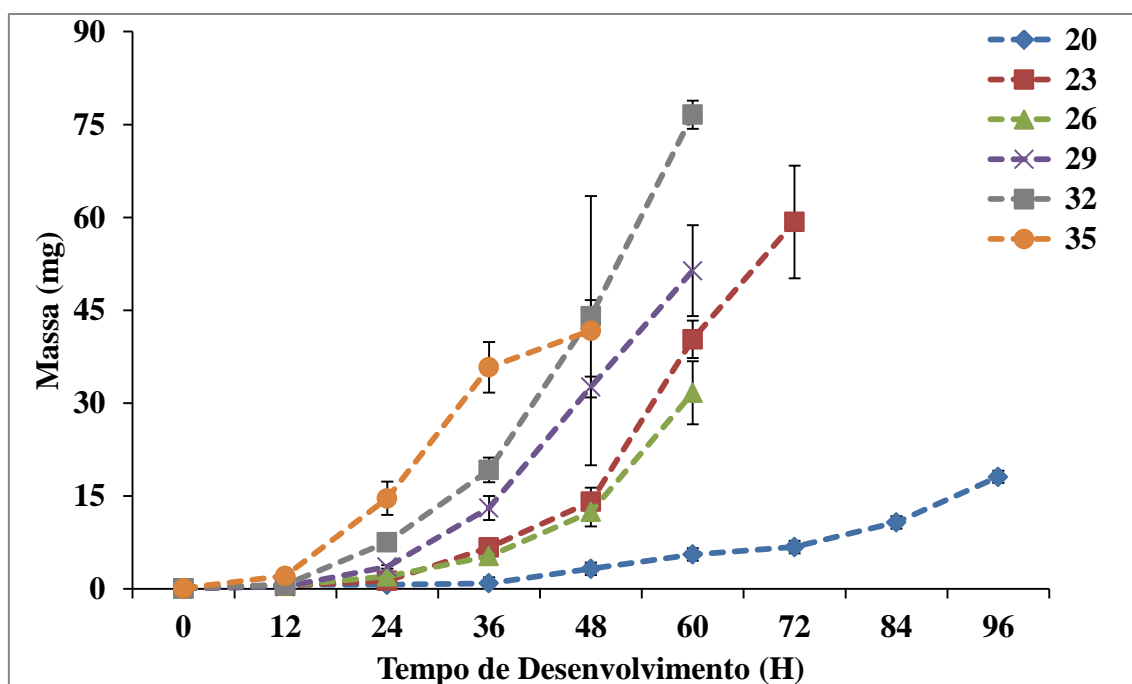


Figura 7. Média da massa corporal (mg) dos imaturos de *Parolucilia fulvinota* ao longo do tempo de desenvolvimento em temperatura constante de 20° a 35°C.

Houve ganho constante de massa todas as temperaturas analisadas com excessão da temperatura de 29 °C onde o ganho de massa diminuiu de L2 para L3 (Figura 8).

O menor ganho de massa foi obsevado a 20°C no terceiro ínstar e o maior a 32°C.

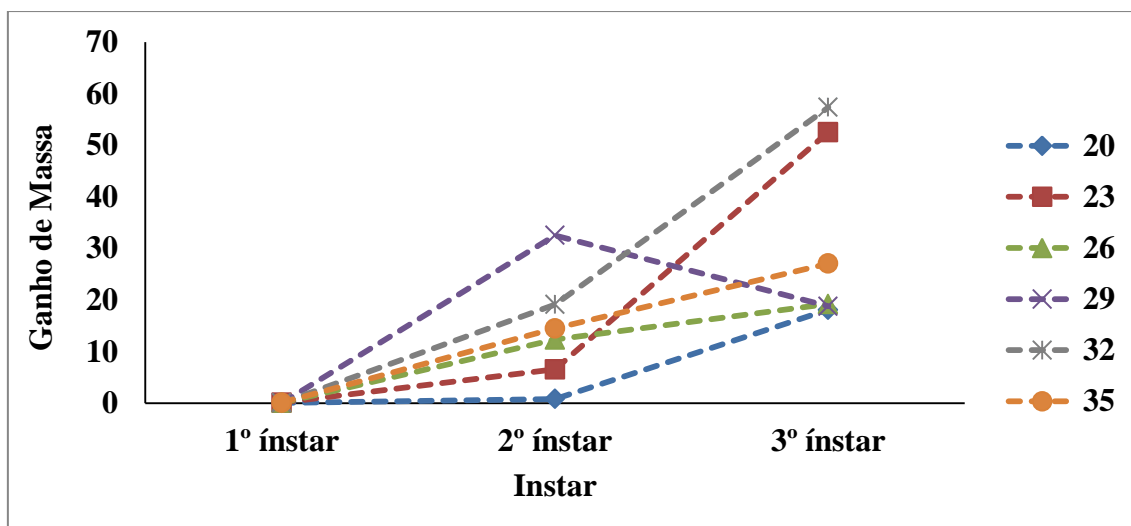


Figura 8. Ganho de Massa Corporal (mg) dos ínstaras larvais de *Paralucilia fulvinota* criados em temperatura constante de 20° a 35°C.

4.4. Grau-dia e Grau-hora Acumulados

Os valores de Grau-Hora acumulado (GHA) e Grau-Dia Acumulado (GDA) para *P. fulvinota* em temperatura controlada são descritos na Tabela 1

Tabela 1. Grau-dia e Grau-hora acumulados para os estágios de desenvolvimento de *Paralucilia fulvinota* coletados em cadáver de suíno na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. GHA = Grau-hora acumulado; GDA= Grau-dia acumulado. Obs.: valores calculados sobre temperatura constante e limiar mínimo de 10°C (Higley e Peterson, 1994)

TEMPERATURA	ESTÁGIOS				
		L1 - L3	L3 - PUPA	PUPA - ADULTO	TOTAL
20°C	GHA	1680	360	2700	5820
	GDA	70	15	112,5	242,5
23°C	GHA	1560	1578,72	2985,84	6105,84
	GDA	65	65,78	124,41	254,41
26°C	GHA	1536	1559,04	2123,52	5222,4
	GDA	64	64,96	88,48	217,6
29°C	GHA	1368	1468,32	1855,92	4696,8
	GDA	57	61,18	77,33	195,7
32°C	GHA	1499,52	-	-	-
	GDA	62,48	-	-	-
35°C	GHA	1800	-	-	-
	GDA	75	-	-	-

5. DISCUSSÃO

5.1. Tempo de desenvolvimento

Estudos de desenvolvimento pós embrionário de espécies de importância forense sob temperaturas controladas tem demonstrado a influência negativa desse fator ou seja o tempo desenvolvimento diminui conforme a temperatura aumenta.

Queiroz (1996), relata para *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) diferenças significativas entre os tratamentos com 18, 22, 27 e 32°C, aumentando a duração do ciclo de vida com a diminuição da temperatura, assim como na razão sexual onde se obteve maior número de fêmeas. Segundo Kruger *et al.* (2010) *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1756) e *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desoidy, 1830), sob temperatura ambiente aceleraram o tempo de desenvolvimento em relação a estudos com temperaturas controladas.

Nos invertebrados há uma temperatura ótima onde são resgistradas as maiores taxas de consumo de alimento, tendendo a diminuir acima ou abaixo desse ótimo Begon *et al.*, 2008). O mesmo pode ter ocorrido com os imaturos de *P. fulvinota* a 20° C, onde o tempo de desenvolvimento foi maior e massa e comprimento menor. E a 32 e 35°C não foi registrado desenvolvimento completo. Isso pode estar relacionado ao nível ótimo de desenvolvimento do indivíduo, onde ele exibe um desempenho máximo e sua atividade diminui nos níveis abaixo e acima do ótimo.

Informações do tempo de desenvolvimento de *P. fulvinota* foram fornecidas por Greenberger e Szyska (1984) com exemplares coletados no Peru entre 21,7°C e 26°C com tempo de ovo a adulto de 13,6 dias. Sob condições naturais Pujol-Luz *et al.* (2006) coletaram em cadáveres humanos no estado de Rondônia entre 23,4 e 28,8°C, com tempo de ovo a adulto de 12,7 dias. Esses valores foram semelhantes ao observado na temperatura de 26°C onde foi registrado um tempo de 13,6 dias nessa temperatura.

Tempo de desenvolvimento de *P. paraensis* ocorrente em área urbana e rural na mesma região, mostram diferenças sob temperatura ambiente. Em mata Sales *et al.* (2013) registrou a 26°C, um tempo total de ovo a adulto de 9 dias. Em área urbana Barros-Souza (2011) com 28, 03°C obteve de ovo adulto 11,87 dias. Os valores do tempo de desenvolvimento foram próximos aos observado na temperatura de 29°C para *P. fulvinota* cujo tempo de desenvolvimento foi de 9,5 dias. Mostrando que diferentes

espécies respondem as variações de temperatura, assim como as diferenças entre áreas onde os imaturos foram criados.

Tabela 2. Efeito da temperatura sobre desenvolvimento de espécies de *Paralucilia* coletadas neste e em outros trabalhos demonstrando a diferença entre os instares larvais de espécies morfológicamente semelhantes.

	Duração Média do Tempo de Desenvolvimento (Horas)					
	Temperatura	L1	L2	L3	Pupa	Total
Referências						
Greenberger e Szyska (1984) <i>Paralucilia fulvinota</i>	21,7- 26° C	22	16,3	144	124	336
Pujol-Luz et al. (2006) <i>Paralucilia fulvinota</i>	26 °C	18	30	117	141	304,8
Barros-Souza et al. (2011) <i>Paralucilia paraensis</i>	25,8 °C	11,4	13	81,1	144,14	268,5
Sales et al. (2013) <i>Paralucilia paraensis</i>	26 °C	13	18	46	96	216
Dados deste estudo <i>Paralucilia fulvinota</i>	20 °C	36	24	36	270	582
	23 °C	12	12	120	228	468
	26 °C	12	36	97,5	133	326
	29 °C	12	24	77,3	96	247,2
	32 °C	12	24	72	0	0
	35 °C	12	12	72	0	0

5.2. Razão sexual

P. fulvinota foi coletada em suínos parcialmente submersos juntamente a outras espécies do mesmo gênero, como *P. paraensis* e *P. pseudolyrcea* (Oliveira-da-Silva, 2011), onde foi obtido maior número de fêmeas em relação a machos. Nesse trabalho assim como em Barros-Souza (2009) o número de machos e fêmeas foram muito similares, fato ocorrido com *P. paraensis* em área urbana onde foi obtido metade da prole de macho e metade de fêmeas.

No presente estudo foi observado elevada mortalidade resultando em poucos adultos, o mesmo aconteceu com Souza et al. (2014) onde ao utilizar *Hemilucilia segmentaria* para um laudo pericial dos 108 exemplares criados foram obtidos apenas 20 adultos. A razão sexual foi muito semelhante ao observado por Barros-Souza (2009) onde foram obtida metade dos exemplares de machos e metade de fêmeas para *P. paraensis* em área urbana.

5.3. Comprimento e Massa Larval

O comprimento é o parâmetro mais comum para estimar a idade das larvas (Day e Wallman 2006), pois existem poucos trabalhos que discutem a massa. Neste trabalho o comprimento e a massa foram avaliados conforme aconteceria em um caso real, com as amostras sacrificadas e preservadas em álcool 70%. Greenberg e Kunich (2002) afirma que as larvas de Calliphoridae podem ter e média de 2,5 a 4 mm de comprimento no primeiro instar, 8 mm em média no segundo e de 15 a 22 mm no terceiro. No atual trabalho as larvas estiveram dentro desses valores no primeiro instar (2,5 - 4 mm). A partir do segundo instar o tamanho das larvas mudou com o aumento das temperaturas ao que foram submetidas ficando acima da média de 8 mm. No terceiro instar as larvas estiveram dentro da média indicada por Greenberg e Kunich (2002) de 15 a 22 mm.

Oliveira *et al.* (2007) estudou o tempo de desenvolvimento e morfologia de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) com temperatura controlada 27°C e fotoperíodo de 14 horas em câmara de climatização onde registrou um tempo de desenvolvimento de total de 92 horas também forneceu dados do comprimento larval ao longo dos ínstaros sendo a média do primeiro instar de 2,61mm, semelhante ao observado neste trabalho para todas as temperaturas analisadas, no terceiro a média foi de 13,48mm, valor também observado nas temperaturas de 26°C (13,3 ± 0,98 mm). Lecheta (2012) estudou a influência da temperatura na massa e comprimento de *Sarconesia chlogaster* criados em temperaturas entre 10 e 35°C, as médias de comprimento no primeiro instar foram semelhantes as observados nesse trabalho em todas as temperaturas, entretanto Lecheta (2012) não observou diferenças significativas no comprimento no terceiro instar e neste trabalho as médias de comprimento foram bastante diferenciadas no mesmo instar mostrando que a temperatura é um fator que altera o comprimento das larvas.

A massa é outro fator influenciado pela temperatura, entretanto não existem muitos trabalhos com medidas de massa, sendo importante que se conheça esses valores para determinação do intervalo pós-morte. Oliveira-Costa (2011) afirma que o peso úmido não deve ser utilizado pois não há padrões publicados para convertê-lo no peso da larva viva. Neste trabalho entretanto utilizou-se o peso úmido das larvas pois é a metodologia mais próxima de um caso real onde as larvas coletadas por um perito seriam preservadas em álcool, havendo também a necessidade de obter resultados rápidos em uma investigação forense, algo que seria mais demorado ao usar o peso seco. No presente trabalho, a temperatura afetou a massa das larvas, no trabalho de

Lecheta (2012) os valores foram próximos ou semelhantes. No ganho de massa observado por Lecheta (2012) houve um aumento constante para cada temperatura, o mesmo foi observado neste trabalho com exceção da temperatura de 29°C onde o ganho de massa diminuiu. Com exceção da temperatura de 29°C foi observado que as larvas ganham muito mais em volume (massa) do que em comprimento, assim como em temperatura ambiente, sendo assim informações sobre massa larval podem ser tão importantes quanto o comprimento para a determinação da idade larval em temperatura constante e na determinação do IPM (Intervalo pós-morte). Essa comparação demonstra que diferentes espécies se comportam de maneira diferenciada a variação de temperatura.

5.4. Grau dia acumulado (GDA) e Grau hora acumulado (GHA)

Com *P. paraensis* (Barros-Souza, 2009) registrou os valores de 4841,06 para GDA e 201,71 para GHA. Esses valores estiveram mais próximos aos valores observados em temperatura constante de 29° C, apresentando assim diferenças que mostram que os valores calculados para uma espécie não podem ser utilizada para outras morfológicamente semelhantes.

6. CONCLUSÃO GERAL

O estudo apresenta o primeiro registro bionômico de *P. fulvinota* no Amazonas sobre condições naturais e em temperatura controlada, fornecendo dados que servirão no auxílio da determinação do IPM.

A temperatura exerce influência no tempo de desenvolvimento e é importante ferramenta de estudo para entomologia forense e determinação do Intervalo pós-morte (IPM).

Estudos em temperaturas controladas e ambiente, são importantes para que se possa obter um resultado mais preciso para o cálculo do IPM.

É possível usar os dados deste trabalho em outras localidades no Amazonas, que não tenham informações disponíveis da biologia e bionomia de *P. fulvinota* dentro das condições de temperatura estabelecidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amat, E. 2009. Contribuição al conocimiento de las Chrysominae y Toxotarsinae (Diptera: Calliphoridae) de Colômbia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80: 693-708.
- Amendt, J.; Campobasso, C.P.; Gaudry, E.; Reiter, C.; Leblanc, H.N.; Hall, M.J.R. 2007. Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine*, 121: 90-104.
- Amendt, J.; Campobasso, C.P.; Zehner, R.; Hall M.J.R. 2011. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine and Phatology*, DOI: 10.1007/s12024-010-9209-2.
- Ames, C; Turner, B. 2003. Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Medical and Veterinary Entomology*, 17:178–186.
- Amorin, D.S.; Silva, V.C.; Balbi, M.I.P.A. 2002. Estado do conhecimento dos Dipteras neotropicais, p. 29 – 36. In: Costa, C.; Vanin, S.A.; Lobo, J.M.; Melic, A. (Eds). *Proyecto de Red IberoAmericana de Biogeografia y Entomologia Sistemática PrIBES*. M3m Monografias Tercer Milênio, vol. 2. Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA) & Cytod Zaragoza, 329 p.
- Anjos, C.R. 2001. *Entomofauna decompositora de carcaças de porcos na região de Belém, Pará, Brasil, com ênfase na família Calliphoridae (Diptera)*. Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Zoologia do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 122p.
- Archer, M.S. 2003 Annual variation in arrival and departure times of carrion insects at carcasses: implications for succession studies in forensic entomology. *Australian Journal of Zoology*, 51: 569-576.
- Atkinson, D. 1994 Temperature and organism size: a biological law for ectotherms? *Advance in Ecological Research*, 25, 1 - 58.

- Atkinson, D.; Sibley, R.M. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends in Ecology and Evolution*, 12: 235 – 239.
- Barbosa, R.R.; Mello-Patiu, C.A.; Mello, R.P.; Queiroz, M.M.C. 2009. New records of calyptrate dipterans (Fanniidae, Muscidae and Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 923-926.
- Barbosa, R.R.; Mello-Patiu, C.A.; Ururahy-Rodrigues, A.; Barbosa, C. G., Queiroz, M. M.C. 2010. Temporal distribution of ten calyptrate dipteran species of medicolegal importance in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2): 191-198.
- Barros-Souza, A.S.B. 2009. *Calliphoridae (Diptera) associados a cadáver de porco doméstico Sus scrofa (Linnaeus) na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Programa Integrado de Pós-Graduação INPA/UFAM Manaus Amazonas. 55p.
- Barros-Souza, A. S.; Ferreira-Keppler, R. L. 2009. Sobrevivência de pupas de *Lucilia eximia* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) após submersão em laboratório. *Revista Brasileira de entomologia*, 53(3): 490 – 492.
- Barros-Souza, A.S.; Ferreira-Keppler, R.L.; Agra, D.B. 2011. Development Period of Forensic Importance Calliphoridae (Diptera: Brachycera) in Urban Área Under Natural Conditions in Manaus, Amazonas, Brasil. *EntomoBrasilis*, 5(2): 99-105.
- Benecke, M. 2001. A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 120: 2-14.
- Begon, M.; Townsend, C.R.; Harper, J.L. 2006. Ecology: From individuals to ecosystems. Blackwell Publishing, Oxford.
- Belfort-Mattos, W. 1919. As Sarcophagas de S. Paulo. Doctoral Thesis, Faculdade e Medicina e Cirurgia de São Paulo, Brazil.

- Bonatto, S.R.; Carvalho, C.J.B. 1996. Análise morfológica das formas imaturas de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae). *Revista brasileira de Zoologia*, 13(3):707-726.
- Bornemissza, G.F. 1957. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal of Zoology*. 5: 1 – 12.
- Byrd, J.H.; Butler, J.F. 1998. Effects of temperature on *Sacophaga haemorrhoidalis* (Diptera: Sarcophagidae) development. *Journal of Medical Entomology*, 35:694-698.
- Byrd, J.H.; Allen, J.C. 2001. The development of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *Forensic Science International*, 120: 79-88.
- Carvalho, L.M.L.; Thyssen, P.J.; Linhares, A.X.; Palhares, F.B. 2000. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 135-138.
- Carvalho, L.M.L.; Linhares, A.X. 2001. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural Forest area in southeastern Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, 46(3): 604-608.
- Carvalho, L.M.L., Thyssen, P.J., Linhares, A.X. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine Toxicology*, 5: 33-39.
- Carvalho, C. J. B.; Mello-Patiu, C. A. 2008. Keys to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52: 390–406.
- Catts, E.P.; Haskell, N.H. 1991. Entomology and death: a procedural guide. Clemson, SC: Joyce's Print Shop. 180p.
- Catts, E.P; Goff, M.L. 1992. Forensic Entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 37: 253-272.

- Costa, A.C.L.; Junior, J.A.S.; Cunha, A.C.; Feitosa, J.R.P.; Portela, B.T.T.; Silva, G.G.C.; Costa, R.F. 2013. Índices de conforto térmico e suas variações sazonais em cidades de diferentes dimensões na Região Amazônica. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 06 (3): 478-487.
- Davies, L.; Ratcliffe, G.G. 1994. Rate of developments of some pre-adult stages in blowflies with reference to low temperatures. *Medical and Veterinary Entomology* 8: 245–254.
- Day, D.M.; Wallman, J.F. 2006. Influence of Substrate Tissue Type on Larval Growth in *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic Sciences*, 51 (3): 657 – 663.
- D’Almeida, J.M. 1988. Substratos utilizados para a criação de dípteros calíptros em uma área urbana do município do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 83: 201-206.
- D’Almeida, J.M.; Mello, R.P. 1995. Eficiência de variadas dietas na criação de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1774) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae), sob condições de laboratório. *Entomologia y Vectores* 2: 95 – 106.
- Donovan, S.E.; Hall, M.J.R.; Tuner, B.D.; Moncrieff, C.B. 2006. Larval growth of the blowfly, *Calliphoravicina* over a range of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 106 – 114.
- Ferreira, M.J.M. 1978. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I: Calliphoridae. *Revista Brasileira de Biologia*, 38: 445-454.
- Ferreira, M.J.M. 1983. Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. *Revista Brasileira de Biologia*, 43: 199-210.
- Fraga, N.J. 2004. *Comportamento de oviposição de adultos, tempo de desenvolvimento e morfologia dos imaturos de Hemilucilia segmentaria (Fabricius), H. semidiaphana (Rondoni) e Lucilia eximia (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)*

na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM. Brasil. Dissertação de Mestrado em Entomologia. INPA/UFAM. 73p.

Freire, O. 1914a. Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. *Gazeta Médica da Bahia*, 46: 110-125.

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

Freire, O. 1923. Fauna cadavérica brasileira. *Revista de Medicina*, 3(4): 15-40.

Goff, M.L. 1991. Use of Acari in establishing a postmortem interval in a homicide case on the island of Oahu, Hawaii. In: Dusabek, F.; Bukva, V. (Eds.). *Modern Acarology*: The Hague, Netherlands; p 439.

Goff, M.L.; Miller, M.L.; Paulson, J.D.; Lord W.D.; Richards, E.; Omori, A.I. 1997. Effects of 3,4-methylendioxyamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. *Journal of Forensic Science*, 42: 276–280

Gotelli, N.J. 2007. Ecologia. Editora Planta. Londrina, Paraná, 3ªEd. 260p.

Grassberger, M.; Reiter, C. 2002. Effect of temperature on development of the forensically important holartic blow fly *Protophormia terranova* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 128: 177-182.

Greenberg, B.; Szyska, L.M. 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae. *Annals of the Entomological Society of América*, 77(5): 488-515.

Greenberg, B. 1991. Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, 28: 565-577.

Greenberg, G.; Kunich, J.C. 2002. *Entomology and the law, flies as forensic indicators*. Cambridge, University Press, USA. 356p.

- Higley, L. G.; Haskell, N. H. 2010. Insect development and forensic entomology, p. 389–406. In: Byrd, J. H.; Castner, J. L. (Eds.). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton, CRC Press, 681 p.
- Higley, L.G.; Haskell, N.H. 2003. Insect Development an Forensic Entomology. In: Byrd, J.H. e J.L. Castner (Eds.). *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 287-302.
- Higley, L.G.; Haskell, N.H. 2000. Insect development and forensic entomology, p 287–302. In: Byrd, J. H. e J. L. Castner JL (Eds.). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton, CRC Press, 437p.
- Higley, L.G.; Peterson, R.K.D. 1994. Initiating sampling programs. In: Pedigo, L.P.; Buntin. G.D. (Eds.). 1994. *Handbook of samplig methods for arthropods in investigations*. Boca Ranton: CRC; p 120-136.
- Horenstein, M.B.; Linhares, A.X.; De Ferradas, B.R.; García, D. 2010. Decomposition and dipteran succession in pig carrion in central Argentina: ecological aspects and their importance in forensic science. *Medical and Veterinary Entomology*, 24:16-25.
- Ikemoto, T.; Takai, K. 2000. A New Linearized Formula for the Law of Total Effective Temperature and the Evaluation of Line-Fitting Methods with Both Variables Subject to Error. *Environtal Entomology*, 29(4): 671-682.
- Irion, G.; Junk, W.J.; Mello, J.A.S.N. 1997. The large Central Amazonian river floodplains near Manaus: Geological, Climatological, hydrological and geomorfological aspects. In: Junk, W.J. (Ed.). *The Central Amazon Floodplain: Ecology of a Pulsing System*. Ecological Studies. V. 126. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 23-46.
- Keh, B. 1985. Scope and applications of forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, 30: 137-154.
- Kumara, T.K.; Abu Hassan, A.; CheSalmah, M.R.; Bhupinder, S. 2009. Larval growth of the muscid fly, *Synthesiomyia nudiseta* (Wulp), a fly of forensic importance, in

- the indoor fluctuating temperatures of Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 26(2): 200–205.
- Kruger, R.F.; Kirst, F.D.; Souza A.S.B. 2010. Rate of development of forensically-important Diptera in southern Brazil. *Revsita Brasileira de Entomologia*, 54 (4): 624 - 629.
- Kruger, R.F.; Ribeiro, P.B.; Carvalho, C.J.B. 2003. Desenvolvimento de *Ophyra albuquerquei* Lopes (Diptera, Muscidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia* 47(4) 643 – 648.
- Leccese, A. 2004. Insects as forensic indicators: methodological aspects. *Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 5 (1): 26-32.
- Lecheta, M.C. 2012. *Efeitos da temperatura no desenvolvimento de Sarconesia chlorogaster (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) e sua possível utilização na entomologia forense*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 77p.
- Lenko, K.; Papavero, N. 1996. *Insetos no folclore*. Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas, Sao Paulo, Brasil, 446pp.
- Liu, D.; Greenberg, B. 1989. Immature stages of some flies of forensic importance. *Annals of the Entomological Society of America*, 82: 80–93.
- Lord, W.D.; Stevenson, J.R. 1986. *Directory of forensic entomologists*. 2 ed. Misc. Publ. Armed Forces Pest Mgt. Board, Washington, D.C, 42p.
- Lüderwaldt, G. 1911. Os insetos necrófagos paulistas. *Revista do Museu Paulista*, 8: 414-433.
- Marchenko, M.I. 2001. Medicolegal relevance of cadáver entomofauna for the determination of the time of death. *Forensic Science International*, 120: 89 – 109.
- Mavárez-Cardozo, M.G.; Espina-de-Ferreira, A.L.; Barrios-Ferrer, F.A.; Ferreira-Paz, J.L. 2005. La entomología forense y el Neotrópico. *Cuaderno de Medicina Forense*, 11(39): 23-33.

- Mello, R.P. 1996. Revisão das espécies sul americanas de *Paralucilia* Brauer e Bergestamm (Diptera: Calliphoridae). *Entomologia y Vectores*, 3(5): 137-143.
- Mello, R.P. 2003. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) encontrados no Brasil. *Entomologia y Vectores*, 10: 255-268.
- Mendonça, F.P.; Magnusson, W.E.; Zuanon, J. 2005. Relationships Between habitat Characteristics and Fish Assemblages in Small Streams of Central Amazonia. *Copeia*, 4: 751-754.
- Mise, K.M.; Barros-Souza, A.S.; Campos, C.M; Ferreira-Keppler, R.; Almeida, L.M. 2010. Coleoptera associated with pig carcass exposed in a forest reserve, Manaus, Amazonas, Brazil. *Biota Neotropica*, 10 (1): 321-324.
- Monteiro-Filho, E.L.A.; Peneireiro J.L. 1987. Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 47: 289 -295.
- Moura, M.O.; Carvalho C.J.B.; Monteiro-Filho, E.L.A. 1997. A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, state of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 269-274.
- Moura, M.O.; Monteiro-Filho, E.L.A.; Carvalho C.J.B. 2005. Heterotrophic succession in carrion arthropod assemblages. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 473-482.
- Nabity, P.D.; Higley, L.G.; Heng-Moss, T.M. 2006. Effects of Temperature on Development of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) and Use of Developmental Data in Determining Time Intervals in Forensic Entomology. *Entomological Society of America*. 1276 – 1286. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/43.6.1276>.
- Nishida, K. 1984. Experimental studies on estimation of postmortem interval by means of fly larvae infesting human cadavers. *Nippon-Hoigaku-Zasshi*, 38: 24-41

- Norris, K. R. 1965. The Bionomics of Blow Flies. *Annual Review of Entomology*, 10: 47 – 68. DOI: 10.1146/annurev.en.10.010165.000403
- Nuorteva, P. 1977. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. *In: Tedeschi et al.* Eds. *Forensic medicine, a study in trauma and environmental hazards*. V. II. W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. p. 1072-1095.
- Oliveira-Costa, J.; Mello-Patiu, C.A.; Lopes, S.M. 2001. Dípteros muscóides, associados com cadáveres humanos no local da morte, no Estado do Rio de Janeiro. *Boletim do Museu Nacional, Zoologia*, CDLXIV: 1-6.
- Oliveira-Costa, J. 2008. A entomologia forense e suas aplicações. *In: Oliveira- Costa, J.* (Ed). *Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios*. Campinas. Millennium Editora. p. 39.
- Oliveira-Costa, J. 2011. *Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios*. 3° Ed. Campinas. Millennium Editora, 502p.
- Oliveira M.S.; Mello, R.P.; Queiroz, M.M.C. 2007. Morfologia e duração dos instares larvais de *Chrysomya putoria*(Wiedmann) (Diptera, Calliphoridae), em laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, 51(2): 239 – 245.
- Oliveira-da-Silva, A.; Ale-Rocha, R.; Rafael, J.A. 2006. Bionomia dos estágios imaturos de duas espécies de *Peckia* (Diptera, Sarcophagidae) em suíno em decomposição em áreas de floresta no Norte do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 50 (4): 524-527.
- Oliveira-da-Silva, A. 2011. *Ecologia de comunidades de insetos associados à decomposição de Sus scrofa (Linnaeus) (Suidae) expostos em igarapé de terra firme na Reserva Florestal Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil*. Tese de Doutorado INPA/UFAM, Manaus, Amazonas, 114p.
- Oosterbroek, P., 2006. The European Families of the Diptera. Identification, diagnosis, biology. KNNV Publishing. Utrecht. 205 p.
- Payne, J.A. 1965. A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology*, 46:592–602.

- Paraluppi, N.D.; Castellon, E.G. 1993. Calliphoridae (Diptera) em Manaus: II. Padrão de atividade de vôo em cinco espécies. *Revista Brasileira de Entomologia*, 34: 661-668.
- Paraluppi, N.D.; Castellon, E.G. 1994. Calliphoridae (Diptera) em Manaus: I Levantamento taxonômico e sazonalidade. *Revista brasileira de Entomologia*, 34: 661-668.
- Pessoa, S; Lane, F. 1941. Coleópteros de interesse médico-legal. Ensaio monográfico sobre a família Scarabaeidae de São Paulo e regiões vizinhas. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, 2: 389-504.
- Pinheiro, J.; Bates, D.; DebRoy, S.; Sarkar, D.; R-Core Team. 2015. Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1- 122, <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Pujol-Luz, J.R.; Marques, H.; Ururahy-Rodrigues, A.; Rafael, J.A.; Santana, F.H.; Arantes, L.C.; Constantino, R. 2006. A forensic entomology case from the Amazon rain forest of Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, 51: 1151-1153.
- Pujol-Luz, J.R.; Pablo Costa Francez, A.; Ururahy-Rodrigues, A; Constantino, R. 2008. The Black Soldier-fly, *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae), Used to Estimate the Postmortem Interval in a Case in Amapa State, Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2): 476-478.
- Queiroz, M.M.C. 1995. Estudo Morfo-biológicos e Comportamentais de diferentes linhagens de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae), em laboratório. Dissertação de Doutorado. Universidade Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. Brasil.
- Queiroz, M.M.C. 1996. Temperature Requirements of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) under Laboratory Conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(6): 785-788

- Queiroz, M.M.C; Mello, R.P.; Lima, M.M. 1997. Morphological Aspects of the Larval Instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) Reared in the laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(2): 187-196.
- Reibe, S; Doetinchem, P.; Madea, B. 2010. A new simulation-based model for calculating post-mortem intervals using developmental data for *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Available at: http://arxiv.org/PS_cache/arxiv/pdf/0904/0904.0376v3.pdf.
- Reiter, C. 1984. Zum Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeißfliege *Calliphora vicina*. *Z Rechtsmed*, 91: 295 – 308.
- Ribeiro da Silva, J.E.L.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothres, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito J.M.; Martins; L.H.P.; Lohmann L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira E.C.; Silva C.F.; Mesquita M.R.; Procópio L.C. 1999. *Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Manaus. INPA, 790p.
- Richards, C.S.; Crous, K.L.; Villet, M.H. 2009. Models of development for blowfly sister species *Chrysomya chloropyga* and *Chrysomya putoria*. *Medical and Veterinary Entomology*, 23: 56 – 61.
- Ricahrds, C.S.; Paterson, I.D.; Villet, M.H. 2008. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. *International Journal of Legal Medicine*, 122(4): 271 – 279.
- Roquette-Pinto, E. 1908. Nota sobre a fauna cadavérica do Rio de Janeiro. *A Tribuna Médica*, 21: 413–417
- Salviano, R.J.B.; Mello, R.P.; Beck, L.C.N.H.; d'Almeida, J.M. 1996. Aspectos bionômicos de *Squamatoides trivittatus* (Diptera, Sarcophagidae) sob condições de laboratório. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 249 – 254.
- Salvadori, J.R.; Parra, J.R.P. 1990. Efeito da temperatura na biologia e exigências térmicas de *Pseudaletia sequax* (Lep.:Noctuidae), em dieta artificial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 25: 1693-1700.

- Sanders, C.J. 1975. Factors affecting adult emergence and mating behavior of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*(Lepidoptera: Tortricidae). *Canadian Entomologist*, 107: 967 – 977.
- Sales, T.; Ferreira-Keppler, R.L.; Oliveira-Da-Silva, A.; Souza, A.S.B. 2013. Description of Immature Stages and Development Time of *Paralucilia paraensis* (Mello) (Diptera: Calliphoridae) Associated with the Decomposition of a Partially Submerged Swine Carcass. *Neotropical Entomology*, 42 (2): 211-215.
- Serra, H.; W. A. C. Godoy.; F. J. Von-Zuben.; C. J. Von-Zuben e S. F. Reis. 2007. Sex ratio and dynamic behavior in populations of the exotic blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). *Brazilian Journal of Biology*, 67(2): 347-353.
- Shewell, G. 1987. Sarcophagidae. p. 1159-1186. In: J. P. McAlpine; B. V. Paterson; G. E. Shewell; H. J. Teskey; J. R. Vockeroth & D. M. Wood (Eds.). Manual of Nearctic Diptera Research Branch, Agriculture Canada, Monograph 28. Volume II+657 p.
- Silveira-Neto, S.; Nakano, O.;Barbin, D.; Villa-Nova, N.M. 1976. *Manual de Ecologia de Insetos*. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 419p.
- Smith, K.G.V. 1986. *A manual of forensic entomology*. Oxford: University Printing House. 205p.
- Souza, A.M; Linhares, A.X. 1997. Diptera and Coleoptera of potencial forensic importance in southeastern Brasil: relative abundance and seasonality. *Medical and Veterinary Entomology*, 11: 8 – 12.
- Souza, E.R.; Rafael,J.A.; Xavier Filho,F.F.; Da-Silva-FreitasJ.O.; Oliveira-Costa, J.; Ururahy-Rodrigues, A. 2014. First Medicolegal Forensic Entomology Case of Central Amazon: A Suicide by Hanging with Incomplete Suspension. *EntomoBrasilis*, 7 (1): 12-15.
- Swiger, S.L.; Hogsette, J.A. Butler, J.F. 2014. Larval Distribution and Behavior of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) Relative to Other Species

- on Florida Black Bear (Carnivora: Ursidae) Decomposing Carcasses. *Neotropical Entomology*, 43: 21 – 26.
- Tavares, H.C.M. 2003. *Sucessão Faunística de Populações de Insetos Associados à Decomposição de Carcaças de Suínos Expostas em diferentes Altitudes e Condições Pluviométricas na Reserva Florestal da Sera do Japi, Jundiaí, SP*. Tese de Doutorado em Parasitologia na Universidade Estadual de Campinas.
- Thompson, F.C. 2008. The Diptera site. The biosystematic database of world Diptera. Nomenclator status statistics. Version 10.5. <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwstat.htm>. Acesso: Jun/2013
- Thyssen, J.P. 2005. *Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense*. Campinas-SP. Universidade de Estadual de Campinas, São Paulo, Tese de Doutorado, 116p.
- Tobin, E.; Koreeda, M.; Nakanishi, K.; Stoffolano, J.G. 1971. Extraction and isolation of a Blue Pigment from third-stage larvae and pupae of the fly *Orthellia caesarion* (Diptera: Muscidae). *Annals of the Entomological Society of America.*, 64: 1459–1460.
- Turner, B.D.; Howard, T. 1992. Metabolic heat generation in dipteran larval aggregations: a consideration for forensic entomology. *Medical and Veterinary Entomology*, 6: 179-181.
- Ururahy-Rodrigues, A. 2008. *Distribuição Temporal dos Calliphoridae (Diptera) associados à decomposição de Sus scrofa Linnaeus (Suidae) na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas*. Tese de Doutorado, INPA/UFAM, Manaus, AM, 107p.
- Ururahy-Rodrigues, A.; Rafael, J.A.; Wanderley, R.F.; Marques, H. Pujol-Luz, J.R. 2008. *Coprophanaeus lancifer* (Linnaeus, 1767) (Coleoptera, Scarabaeidae) activity moves a man-size pig carcass: Relevant data for forensic taphonomy. *Forensic Science International*, 182: 19 – 22.
- Ururahy-Rodrigues, A.; Rafael, J.A.; Pujol-Luz, J.R.; Henriques, A.L.; Queiroz, M.M.C; Barbosa, R.R.; Baroni M.N. 2010. Association of *Oxelytrum cayennense*

(Silphidae, Coleoptera) with Pig Carcasses (*Sus scrofa* Suidae) in Terra Firme Areas in Manaus, Amazonas, Brazil. *EntomoBrasilis*, 3(2): 44 – 48.

Vanlaerhoven, S.L.; Anderson, G.S. 1999. Insect succession on buried carrion in two biogeoclimatic zones of British Columbia. *Journal of Forensic Sciences*, 44: 31 – 41.

Von Zuben, C.J.; Bassanezi, R.C.; Reis, S.F.; Godoy, W.A.C.; Zuben, F.J.V. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. *Journal of Applied Entomology*, 120:379 – 382.

Wigglesworth, V.B. 1972. The principles of Insect Physiology, Chapman and Hall, London. p. 663 – 669.