

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

Morfologia e desenvolvimento de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e
de *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)

Karine Brenda Barros Cordeiro

Prof^a. Dra. Sônia Nair Bão
Orientadora

Brasília-DF
2014

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal

Morfologia e desenvolvimento de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e
de *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)

Karine Brenda Barros Cordeiro

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sônia Nair Bão.

Brasília, Fevereiro de 2014



Dissertação de Mestrado

KARINE BRENDA BARROS CORDEIRO

Título:

“Morfologia e desenvolvimento de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e de *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)”

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Sônia Nair Bão
Presidente / Orientadora
UnB

Profa. Dra. Rosana Tidon
Membro Titular Interna Vinculada ao Programa
UnB/IB

Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Ivone Rezende Diniz
Membro Suplente
Interno não Vinculado ao Programa
UnB/IB

Brasília, 25 de fevereiro de 2014.

A Suely Barros, minha mãe e aos meus avós (*in memoriam*) Andreino de Barros e Guilhermina de Barros, meu eterno respeito e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe Suely Barros por seu amor incondicional, por me aguentar rabugenta, chorona e ansiosa. Por ser companheira, me auxiliando em várias etapas da realização deste trabalho, coletando moscas, fazendo armadilhas etc. Obrigada!

A minha família Barros por seu amor, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

A Profa. Dra. Sônia Nair Bão, por acreditar no meu trabalho, pela orientação, paciência e pelos conselhos, sempre valiosos!

Ao Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz, pela amizade, por acreditar no meu trabalho pela colaboração, obrigada!

Aos Professores Dra. Cristiane Pujol, Dr. Kiniti Kitayama e Dr. Vítor Py-Daniel, obrigada pelos conselhos, paciência e amizade.

Aos meus grandes amigos Cristiane Sousa, Danilo Marques, Érica Harterreiten, Francimaria Nunes, Khesller Name, Marina Christie, Mônica Lemes, Ricardo Santos e Rodrigo Barros. Vocês são fantásticos! Receber como presente a amizade, o carinho e o amor de vocês foram essenciais nesse período. Com vocês compreendi o valor da amizade: na alegria e na tristeza!

A todos os colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica e do Núcleo de Entomologia Forense da UnB. Agradeço pela paciência, convivência, pelos conselhos, aprendizados e claro, pelos momentos de “ócio criativo”. Cada um de vocês têm parte nesse trabalho.

As mais que secretarias, parceiras: Ana Paula, Daniele, Kelly e Patrícia. Obrigada por sempre me auxiliarem, me aconselharem e pelos momentos de descontração.

A todos os parceiros e funcionários da UnB que contribuíram de modo direto ou indireto para a realização deste trabalho.

Aos amigos que de modo direto ou indireto sofreram com minha ausência, com minhas queixas, mas que sempre me ofereceram apoio.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, a CAPES pela concessão da bolsa e as agências de fomento: CAPES, CNPq, FAP/DF, FINEP.

There is nothing like looking, if you want to find something. You certainly usually find something, if you look, but it is not always quite the something you were after.

J.R.R. Tolkien

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 07 |
| ABSTRACT | 08 |
| CAPÍTULO 1. Introdução Geral..... | 09 |
| CAPÍTULO 2. Ultraestrutura de ovos de <i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius) e de <i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)..... | 12 |
| CAPÍTULO 3. Estágios imaturos de <i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae): ultraestrutura e tempo de desenvolvimento..... | 23 |
| CAPÍTULO 4. Estágios imaturos de <i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae): ultraestrutura e tempo de desenvolvimento..... | 53 |
| CAPÍTULO 5. Considerações Finais..... | 85 |
| GLOSSÁRIO | 87 |

RESUMO

Barros-Cordeiro. K.B. **Morfologia e desenvolvimento de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e de *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 2014. Dissertação de Mestrado.

As moscas varejeiras *Cochliomyia macellaria* e *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) por causarem miíases e serem vetores mecânicos de diversos patógenos que afetam o homem e outros animais ganham importância médica e veterinária. Também são relevantes para a entomologia forense, pois a presença de suas larvas em cadáveres humanos pode ser utilizada na estimativa do intervalo pós-morte. Para possibilitar uma concreta identificação das espécies, em especial nos estágios imaturos que apresentam poucos caracteres diagnósticos a anatomia dos ovos, das larvas e das pupas foi revisada e descrita utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz (ML). Os ovos das duas espécies apresentaram uma área micropilar definida e ambas apresentaram esculturas poligonais no cório. Entretanto, em *C. macellaria*, as esculturas só foram notadas em MEV. Com auxílio do MEV foi possível evidenciar estruturas e órgãos da região cefálica (sensilas do palpo maxilar, antena e máscara facial), da região torácica (espiráculo anterior, órgão de Keilin e sensilas celocônicas) e da região abdominal (espiráculo posterior com peritrema, rima, tufos peristigmáticos). No estágio pupal foi possível evidenciar e descrever quatro eventos contínuos, i) apólise larva pupa, ii) pupa criptocefálica, iii) pupa fanerocefálica, e iv) adulto farado. O tempo de desenvolvimento da oviposição até a emergência de *C. macellaria* foi de 241 horas (10,04 dias) e de *L. cuprina* foi de 354 horas (14,75 dias).

Palavras-chave: bionomia, entomologia forense, metamorfose de insetos, taxonomia.

ABSTRACT

Barros-Cordeiro. K.B. **Morphology and development of immature of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) and *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 2014. Dissertação de Mestrado.

The calliphorids blowfly *Lucilia cuprina* and *Cochliomyia macellaria* have a saprophagous feeding habit. They have a medical and veterinary importance and their larvae may cause myiasis in man and other animals and may also act as mechanical vectors for several pathogens of human and animal's diseases. They are also considered of important insects to forensic entomology and the presence of their larvae in human cadavers can be used to estimate the postmortem interval. Although the immature forms of these two species have been extensively studied, there were a few studies describing in detail the morphology of egg, larvae and pupae using the associated of the techniques of scanning light microscopy (SEM) and electron microscopy (LM). The eggs of the two species showed a distinct micropylar area. Both species presented polygonal sculptures in the corium, however in *C. macellaria* they were only noted in SEM. Was possible, in SEM, to observe the morphological structures and organs of the head (the sensilla of the maxillary palp, the antenna and the facial mask), in the thoracic (anterior spiracles, the Keilin's organ and the coeloconic sensilla) and in the abdominal region (posterior spiracle with peritrema, the rime and peristigmatics tufts). In pupal and intra-puparial stages four continuous events were observed and described, i) larval-pupa apolises, ii) criptocefalic pupa, iii) fanerocefalic pupa and iv) pharate adult. The total development time of the egg lying until the emergence of *C. macellaria* was 241 hours or 10.04 days, and *L. cuprina* was 354 hours or 14.75 days.

Keywords: bionomy, forensic entomology, insect metamorphose, taxonomy.

INTRODUÇÃO GERAL

Em Diptera o desenvolvimento do inseto passa por três fases até chegar à fase adulta: o estágio embrionário, o estágio larval e o estágio pupal. Cada estágio de desenvolvimento assume uma forma peculiar, que pode sofrer pequenas ou grandes modificações (Imms, 1957; Costa *et al.*, 2006).

A morfologia dos ovos pode ser globular, esférica, cônica, reniforme, pedunculada e, o mais comum em moscas, elipsoide. Há variações também na intensidade do brilho e na coloração, desde o branco até o preto (Imms, 1957; Costa *et al.*, 2006). Mesmo com tamanha diversidade, todos os ovos apresentam: cório, camada serosa, membrana vitelina, citoplasma e núcleo (Imms, 1957). O cório na maioria das vezes apresenta ornamentações, muitas vezes com áreas poligonais, costelas e retículos. E ainda apresentam uma área micropilar, em número de um para Diptera, podendo ter mais de uma em outras ordens (Costa *et al.*, 2006).

As larvas de Diptera são as mais variadas possíveis, sendo que a única característica comum para todas as espécies deste grupo é a completa ausência de pernas torácicas (Peterson, 1960; Costa *et al.*, 2006). Durante o desenvolvimento larval as mudanças de forma são sutis, quando comparadas ao desenvolvimento intrapupal. As mudanças drásticas geralmente dão lugar ao ganho de peso e crescimento, mas durante a passagem de cada instar larval não só a cutícula da larva é substituída, assim como muitas outras estruturas especializadas, tais como as sensilas do tórax (Imms, 1957; Costa & Ide, 2008).

O estágio pupal é o estágio intermediário entre a fase de larva e a fase adulta, sendo a pupa formada pelo tegumento do último instar larval, o pupário (Hinton, 1963; Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994). Aparentemente, a fase de pupa é um estágio quiescente, isto é o inseto não se alimenta e, na maioria dos casos, não se movimenta (Hinton, 1963; Costa & Vanin, 1985; Costa *et al.*, 2006). Contudo, internamente há alta atividade: ocorre uma reorganização de tecidos, evaginação da capsula cefálica e dos apêndices torácicos (Hinton, 1946, 1948, 1963; Denlinger & Ždárek, 1994). Tanto a formação do pupário como o grau de

reorganização celular que ocorre na pupa, e da forma ao adulto, variam para cada espécie (Hinton, 1948, 1963; Costa & Vanin, 1985; Costa *et al.*, 2006).

Embora as formas imaturas se mostrem como potenciais ferramentas para esclarecer questões taxonômicas e filogenéticas, ainda existem poucos trabalhos focando morfologia e tempo de desenvolvimento larval e intra-pupal. Alguns exemplos foram às interpretações feitas para Brachycera e Cyclorhapha com base em caracteres das mandíbulas e outras peças bucais das larvas feitas por Sinclair (1992) e Rotheray & Gilbert (2008) mostrando que quando se tem informações morfológicas dos imaturos é possível fazer uma interpretação filogenética.

Além disso, a determinação do tempo de desenvolvimento e a identificação das formas imaturas são de importância, por exemplo, para a saúde pública em casos de doenças causadas por larvas, para economia em casos de prejuízos para a pecuária e para a entomologia forense, nas estimativas de intervalo pós-morte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costa, C. & Vanin, S.A., 1985. On the concepts of “pre-pupa”, with special reference to the Coleoptera. *Rev Bras Zoo* 2(6): 339-345.
- Costa, C., Ide, S. Simonka, C.E., 2006. *Insetos Imaturos: metamorfose e identificação*. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 249p.
- Costa, C. & Ide, S., 2008. Importância e significado taxonômico e filogenético dos caracteres dos imaturos de Insecta em especial dos Coleoptera. In: *Contribuciones taxonômicas en órdenes de insectos hiperdiversos*. 1^a Ed. México, D.F.: UNAM, RIBES-CYTED, v.1, p. 37-55.
- Denlinger, D.L. & Ždárk, J., 1994. Metamorphosis behavior of flies. *Ann Rev Entomol* 39: 243-266.
- Fraenkel, G. & Bhaskaran, G., 1973. Pupariation and pupation in cyclorhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Ann Entomol Soc Am* 66: 418-422.
- Hinton, H.E., 1946. Concealed phases in the metamorphosis. *Nature* 157 (3991): 552-553.
- Hinton, H.E., 1948. On the origin and function of the pupal stage. *Trans R Ent Soc Lond* 99 (12): 395-409.
- Hinton, H.E., 1963. The origin and function of the pupal stage. *Proc R Ent Soc Lond (A)* 38: 4-6.

- Imms, A. D., 1957. A General Textbook of Entomology. 9^a Ed. London: Methuen & CO LTD. 886p.
- Peterson, A., 1960. Larvae of insects: Coleoptera, Diptera, Neuroptera, Siphonaptera, Mecoptera, Trichoptera. Part II. Ohio State University. Columbus 395p.
- Rotheray, G.E. & Gilbert, F., 2008. Phylogenetic relationships and the larval head of the lower Cyclorrhapha (Diptera). Zoo J Linn Soc 153: 287-323.
- Sinclair, B.J., 1992. A phylogenetic interpretation of the Brachycera (Diptera) based on the larval mandible and associated mouthpart structures. Syst Entomol 17 (3): 233-252.

**ULTRA ESTRUTURA DE OVOS DE *COCHLIOMYIA MACELLARIA*
(FABRICIUS) E *LUCILIA CUPRINA* (WIEDEMANN) (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE)**

Karine Brenda Barros-Cordeiro^{a,b}, José Roberto Pujol-Luz^a, Sônia Nair Báb^b

^a Núcleo de Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF. E-mail: Karine.brenda22@gmail.com

^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF.

Manuscrito a ser submetido em língua inglesa para publicação à Micron.

1. Introdução

Ovos, larvas, pupas e adultos de moscas varejeiras podem ser encontrados em cadáveres e ou em cenas de crime contra pessoas (e.g. Catts & Haskell, 1990; Greenberg, 1991). A presença dos insetos em diferentes estágios do desenvolvimento podem ser evidências em investigações criminais, e por isso são potenciais ferramentas nas estimativas de intervalo pós-morte (IPM) (Andrade et al., 2005; Biavati et al., 2010; Macedo et al., 2013).

A maioria das vezes, as estimativas de IPM são feitas com base na presença da larva madura e ou na pupa (Goff & Odom, 1987; Pujol-Luz et al, 2006). A utilização de ovos para esse fim vem se mostrando como potencial indicador de uma estimativa de IPM mínimo (Catts & Haskell, 1990; Huntington et al., 2007). Entretanto, a correta identificação das espécies é essencial para a veracidade dos resultados. A utilização de técnicas de coloração dos ovos para microscopia de luz e a utilização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem auxiliado nas descrições morfológicas dos ovos e na identificação das espécies (Sukontason et al., 2004, 2007; Grzywacz et al., 2012; Sribanditmongkol et al., 2013).

Tanto *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) como *Lucilia cuprina* (Wiedemann) já foram coletadas em carcaças em decomposição e / ou foram usadas para estimativas de IPM (Andrade et al., 2005; Huntington et al., 2007; Biavati et al., 2010). Essas espécies também são de importância medico-sanitária, por serem vetoras de diversos patógenos e ou por causarem miíases em humanos e outros animais (Greenberg, 1971, 1973; Guimarães & Papavero, 1999; Maldonado & Centeno, 2003).

Das quatro espécies do gênero *Cochliomyia* Townsend da região Neotropical, somente *Cochliomyia. hominivorax* (Coquerel) possui descrição morfológica de ovos utilizando o MEV (Peterson & Newman, 1991). Já entre as 17 espécies de *Lucilia* Robineau-Desvoidy, encontradas na região Neotropical, apenas quatro possuem algum tipo de descrição morfológica dos ovos (Sribanditmongkol et al., 2013). Embora existam alguns trabalhos de ovos de *L. cuprina* utilizando MEV, nem todas as estruturas foram mostradas e ou descritas, além de existirem algumas diferenças na descrição morfológicas entre os trabalhos (Sukontason et al., 2007; Mendonça et al., 2008).

A união de técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura tem possibilitado a melhor observação das estruturas do ovo e a sua

possível identificação a nível específico. Com base nas duas técnicas, este trabalho se propõe a apresentar a ultraestrutura de ovos de *C. macellaria* e *L. cuprina* para melhor entendimento e conhecimento destas espécies.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos ovos

Foram coletados espécimes selvagens de *Cochliomyia macellaria* e *Lucilia cuprina* na Estação Experimental de Biologia (EEB) e na Fazenda Água Limpa (FAL) da Universidade de Brasília. As fêmeas foram isoladas, alimentadas com uma mistura de leite em pó, levedo de cerveja, açúcar e água. Para estimular a oviposição, foi oferecida carne bovina moída em decomposição (cerca de 48 horas de exposição a temperatura ambiente). Os ovos obtidos foram individualizados, com auxílio de água destilada, pinças e pinceis.

2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Ovos das duas espécies (n = 40 para cada espécie) foram fixados em solução de Karnovsky (2.5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose 5 mM CaCl₂ tamponado com cacodilato de sódio 0.1 M e pH 7.2). As amostras foram removidas do tampão e imersas em tetróxido de ósmio por uma hora, lavadas em água destilada e desidratadas em diferentes concentrações de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 3 minutos em cada concentração; levadas ao processo de secagem ao ponto crítico com CO₂, montadas em *stubs*, metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 7001F.

2.3. Microscopia de Luz (ML)

Ovos das duas espécies (n = 40 para cada espécie) foram fixados em solução de Karnovsky e lavados em tampão de cacodilato de sódio 0.1 M. Os ovos foram envolvidos em papel filtro e imersos em solução de permanganato de potássio a 1% por 1 minuto, posteriormente foram desidratados em etanol, em uma série de diferentes concentrações (15, 70 e 95%) e diafanizados em xilol. Ficaram imersos em

cada solução por 1 minuto. As amostras foram montadas em lâmina permanente com Entellan[®]. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz Leica DM 2000 (método adaptado de Sukontason et al., 2004).

3. Resultados

Os ovos das duas espécies possuem forma alongada de uma extremidade a outra e ovalada em corte transversal (Fig. 1) A coloração é branco amarelado, mas próximo ao momento de eclosão da larva sua aparência fica acinzentada, devido a pigmentação da larva formada dentro do ovo. Apresenta no polo anterior uma micrópila. O polo posterior é arredondado. A superfície ventral do ovo é convexa e a dorsal côncava. Apresenta uma depressão transversal na região ventral, a área média, que sofre ora uma bifurcação na porção anterior do ovo formando um Y, ora um alargamento. A área média é delimitada pela linha lateral ou plano de eclosão. O plano de eclosão é formado pela linha de eclosão de origem na superfície interna, o plastron, e pela linha marginal da superfície externa do cório (Figs. 2F, 3E). A porção central da área média é formada pelo plastron, que tem função respiratória. O plastron por sua vez é formado por ilhas de diferentes formas na superfície, e forma hexagonal na base (anastomose). O exocório é formado por polígonos, que na maioria das vezes possui a forma de um hexágono (Figs, 2A, B, E e 3 A, B).

3.1. *Cochliomyia macellaria*

Cório com polígonos fracamente marcados em ML (Fig. 2A) e em relevo em MEV (Figs. 2B, E). A micrópila apresenta-se em forma de funil, com as paredes levemente levantadas e com ornamentação em volta da abertura central (Fig. 2C). A área média possui $1,211 \pm 0,073$ mm de comprimento e $0,011 \pm 0,009$ mm de largura, as linhas do plano de eclosão estão próximas entre si. As ilhas do plastron estão separadas, mas quando se unem formam ilhas semelhantes a colunas (Fig. 2F). Área em “Y” é bem demarcada, as alças da bifurcação da área média “Y” atingem $2/3$ do diâmetro do ovo (Fig. 2D). O ovo mede $1,167 \pm 0,047$ mm de comprimento.

3.2. *Lucilia cuprina*

Cório com polígonos fortemente marcados em ML e com poucas ramificações (Figs. 3A). Em MEV os polígonos são notados em forma de relevo (Figs. 3B). A micrópila exibe forma de funil, com as paredes fracamente levantadas (Fig. 3C). As ilhas da área média, que formam o plastron, estão muito próximas, mas poucas se unem formando ilhas maiores ou colunas (Figs. 3E, F). A área média não sofre bifurcação, mas fica mais larga na região anterior do ovo (Fig. 3D). A área média mede $0,948 \pm 0,146$ mm de comprimento e $0,051 \pm 0,009$ mm de largura. O ovo mede $1,025 \pm 0,018$ mm de comprimento.

4. Discussão

Os ovos de *L. cuprina* e *C. macellaria* apresentaram semelhanças morfológicas com os ovos de outras espécies de Calliphoridae (e.g. Sukontason et al., 2007; Thyssen & Linhares, 2007; Mendonça et al., 2008, 2010). Entretanto, as semelhanças são maiores entre espécies do mesmo gênero, conforme observado por Grzywacz et al. (2012) dentro do gênero *Pollenia*, o qual não possui representantes no Brasil, eles são comumente encontrados em vários países da Europa.

Nossa descrição da morfologia dos ovos de *L. cuprina* é semelhante ao que foi descrito por Sukontason et al. (2007), Mendonça et al. (2008) e Sribanditmongkol et al. (2013). As variações de medidas dos nossos resultados sobre o comprimento do ovo ($1,025 \pm 0,018$ mm) e área média (comprimento $0,948 \pm 0,146$ mm e largura $0,051 \pm 0,009$ mm) dos resultados obtidos por Sukontason et al. (2004) e Mendonça et al. (2008) sobre o comprimento do ovo ($1,027$ mm e $1,09 \pm 0,07$ mm) e da área média (comprimento $1,03 \pm 0,07$ mm $0,029 \pm 0,001$ mm), podem estar relacionadas as pequenas variações morfológicas intraespecíficas.

Esta é a primeira descrição de ovos de *C. macellaria*. E comparações feitas com base nos resultados de Peterson & Newman (1991) para ovos de *C. hominivorax*, revelaram que a morfologia da área média é semelhante para as duas espécies.

A forma acentuada da bifurcação da porção anterior da área média em *C. macellaria* também foi observada em outras espécies de Chrysomyinae, como *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius), *Chrysomya rufifacies* (Macquart) e *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Sukontason et al., 2004; Thyssen & Linhares, 2007; Mendonça et al., 2008, 2010). Já o alargamento que observamos em *L. cuprina* é diferente do que se observa para *Lucilia eximia*

(Wiedemann), que se apresentou fortemente bifurcada (Mendonça et al., 2008), mas é muito semelhante a bifurcação descrita para *L. seriata* e para espécies de *Pollenia* Robineau-Desvoidy (Erzinclioglu, 1989; Grzywacz et al., 2012).

As esculturas do cório, em formas poligonais, na maioria das vezes são observadas em forma de relevo, que pode ser delgado ou espesso. As imagens de *L. cuprina* e *C. macellaria* em MEV mostraram que as linhas dos polígonos são delgadas e em relevo, mas as imagens obtidas em ML mostraram uma discreta marcação dos polígonos em *C. macellaria* enquanto em *L. cuprina* observa-se uma forte demarcação. Em *Chrysomya putoria* (Wiedemann) e *Chrysomya nigripes* Aubertin, espécie não encontrada no Brasil, as linhas de relevo dos polígonos são espessas, mas em *L. eximia* e *C. albiceps* são delgadas (Sukontason, 2004; Mendonça et al., 2008, 2010). Em espécies de *Pollenia* as áreas poligonais apresentam depressão na região interna (Grzywacz et al., 2012), o que é diferente do que se observa para outros gêneros de Calliphoridae (Sukontason, 2004; Mendonça et al., 2008, 2010).

O conjunto de todas as estruturas morfológicas dos ovos: cório, micrópila, área média, formação em Y e o plastron, se mostraram de grande potencial para identificação de espécies de Calliphoridae em nível específico.

Em síntese, o cório de *C. macellaria* não apresentou ornamentações nas linhas que formam os polígonos, o contrário se observa para *L. cuprina* em ML. A micrópila das duas espécies apresentou forma de funil raso, mas apenas *C. macellaria* exibiu ornamentações. A área média de *L. cuprina* é mais larga da que observa da para *C. macellaria*. Na porção anterior do ovo a área média sofre bifurcação em *C. macellaria* e alargamento em *L. cuprina*.

5. Agradecimentos

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal e às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAP/DF, FINEP.

6. Referências

Andrade, H.T.A., Varela-Freire, A.A., Batista, M.J.A., Medeiros, J.F., 2005. Calliphoridae (Diptera) Coletados em Cadáveres Humanos no Rio Grande do Norte. Neotrop Entomol 34 (5), 855-856.

- Biavati, G.M., Santana, F.H.A., Pujol-Luz, J.R., 2010. A checklist of Calliphoridae blowflies (Insecta, Diptera) associated with a pig carrion in Central Brazil. *J For Sci* 55 (6), 1603-1606.
- Catts, E.P. & Haskell, N.H., 1990. *Entomology and death: a proedual guide*. Clemson: Joyce's Print Shop.
- Erzinclioglu, Y.Z., 1989. The value of chorionic structure and size in the diagnosis of blowfly eggs. *Med Vet Entomol* 3, 281-285.
- Goff, M.L., Odom, C.B., 1987. *Forensic Entomology in the Hawaiian Islands*. *Am J Forensic Med Pathol* 8 (1), 45-50.
- Greenberg, B., 1971. *Flies and disease: ecology, classification and biotic associations*. Vol. 1. Princeton University Press, New Jersey, 856 p.
- Greenberg, B., 1973. *Flies and disease: Biology and Disease Transmission*. Vol. II. Princeton University Press, New Jersey, 447p
- Greenberg, B., 1991. Flies as forensic indicators. *J Med Entomol* 28 (5), 565-577.
- Guimarães, J.H. & Papavero, N., 1999. *Myiasis in man and animals in the neotropical region- bibliographic database*. São Paulo: FAPESP and Editora Plêiade.
- Grzywacz, A., Szpila, K., Pape, T., 2012. Egg morphology of nine species of *Pollenia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). *Micros Res Tech* 75, 955-967.
- Huntington, T. E., Higley, L.G., Baxendale, F.P., 2007. Maggot development during morgue storage and its effect on estimating the post-mortem interval. *J For Sci* 52 (2), 453-458.
- Macedo, M.P., Kosmann, K. & Pujol-Luz, J.R., 2013. Origin of sample of *Cannabis sativa* through insect fragments associated with compacted hemp drug in South America. *Rev Bras Entomol* 57 (2), 197-201.
- Maldonado, M.A. & Centeno, N., 2003. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Mem Inst Osw Cruz* 98 (2): 213-216.
- Mendonça, P.M., Santos-Mallet, J.R., Mello, R.P., Gomes, L., Queiroz, M.M.C., 2008. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. *Micron* 39, 802-807.
- Mendonça, P.M., Santos-Mallet, J.R., Queiroz, M.M.C., 2010. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819)

- (Diptera: Calliphoridae), a fly specie of forensic importance. *Micros Res Tech* 73, 779-784.
- Peterson, R.D., Newman, Jr.S.M., 1991. Chorionic structure of the egg of the screwworm *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 28, 152-160.
- Pujol-Luz, J.R., Marques, H., Ururahy-Rodrigues, A., Rafael, J.A., Santana, F.H.A., Arantes, L.C., Constantino, R., 2006. A Forensic entomology case from the Amazon Rain Forest of Brazil. *J For Sci* 51 (5), 1151-1153
- Sribanditmongkol P. S.S., Sukontason, K.L., Moophayak, K., Klong-Klaew, T., Sukontason, K., 2013. Morphology and identification of fly eggs: application in forensic entomology. *Trop Biomed* 30 (2), 325-337.
- Sukontason, K., Sukontason, K.L., Piangjai, S., Boonchu, N., Kurahashi, H., Hope, M., Olson, J.K., 2004. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. *Micron* 35, 391-395.
- Sukontsson, K.L., N. Bunchu, N., Chaiwong, T., Kuntalue, B., Sukontason, K., 2007. Fine structure of the eggshell of the blow fly, *Lucilia cuprina*. *Micron* 7 (9), 1-8.
- Thyssen, P.J. Linhares, A.X., 2007. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). *Biol Res* 40, 271-280.

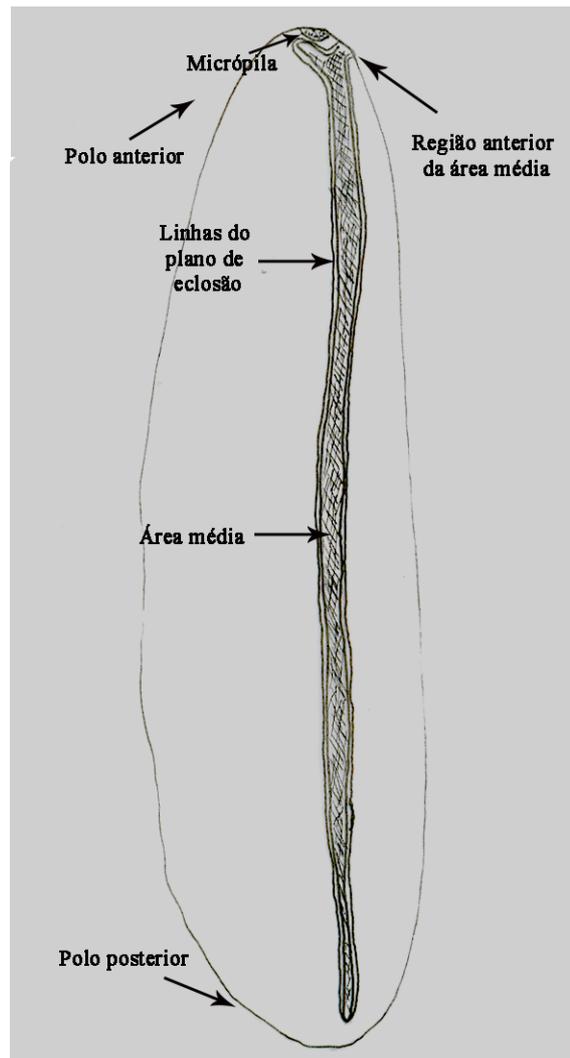


Figura 1. Esquema geral das estruturas morfológicas de ovos de Calliphoridae.

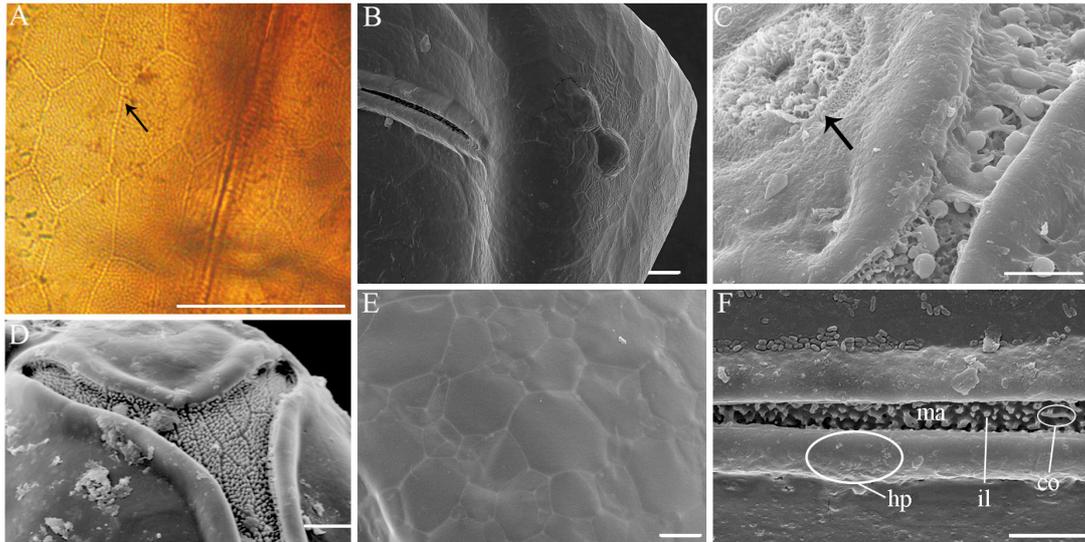


Figura 2. Estruturas morfológicas de ovos de *Cochliomyia macellaria*. (A) detalhes das estruturas do cório em microscopia de luz, linha de delimitação do polígono (seta); (B) esculturas em relevo do cório no polo posterior do ovo; (C) detalhe da micrópila (seta); (D) bifurcação da área média, formação em “Y”, polo anterior do ovo; (E) detalhes das esculturas, polígonos, do cório; (F) detalhe da área média. **Abreviaturas:** co, coluna formada pela união de ilhas do plastron; il, ilha do plastron; hp, plano de eclosão; ma, área média. **Escalas:** (A) 25 μm , (B-F) 10 μm .

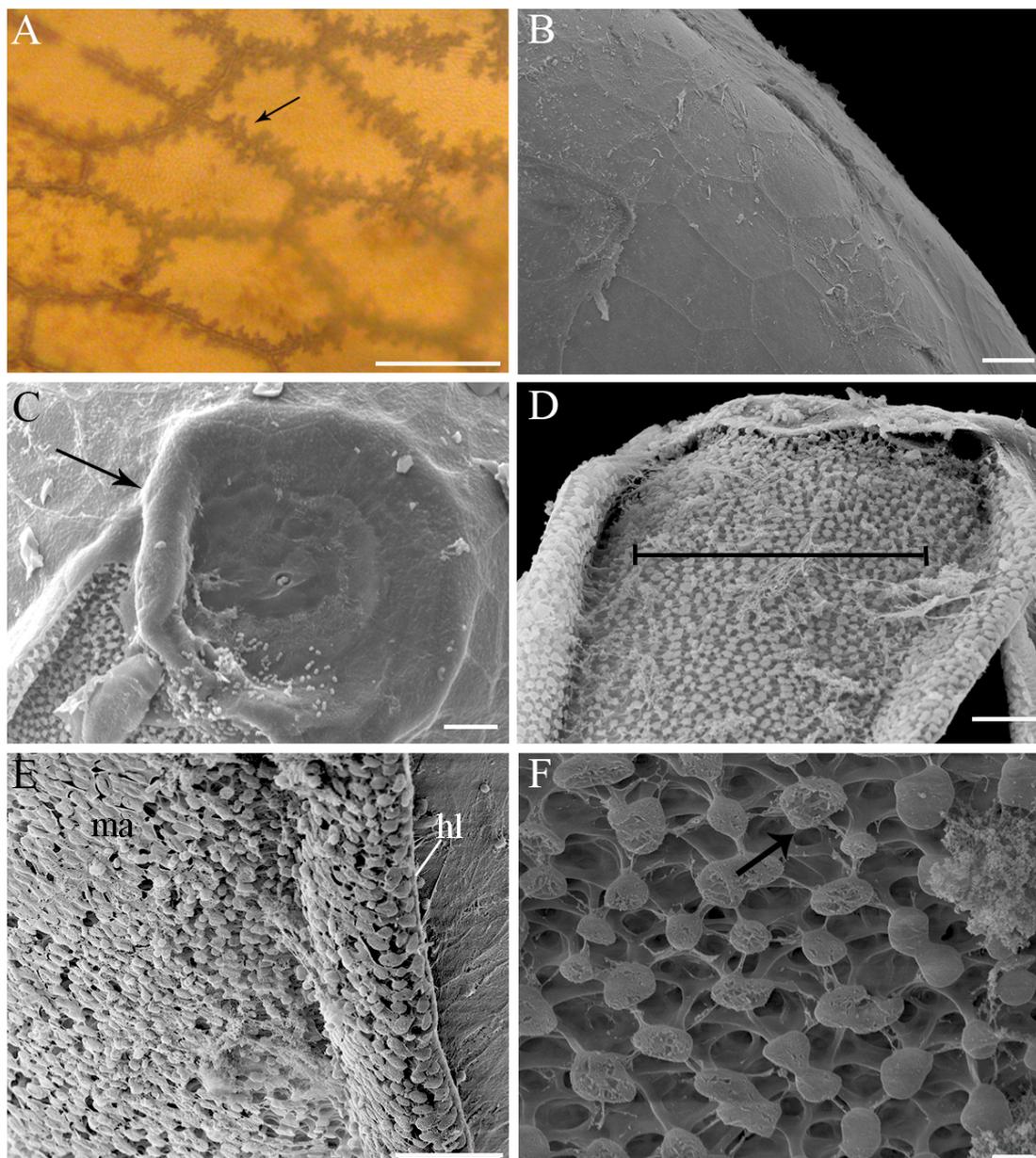


Figura 3. Estruturas morfológicas de ovos de *Lucilia cuprina*. (A) detalhes das estruturas do cório em microscopia de luz, linha de delimitação do polígono (seta); (B) esculturas em relevo do cório, polo posterior do ovo; (C) detalhe da micrópila (seta); (D) alargamento da área média “Y”, polo anterior do ovo (reta); (E) detalhes da área média, plastron; (F) ilhas do plastron (seta). **Abreviaturas:** hl, linha de eclosão; ma, área média; y, fraca bifurcação da área média. **Escalas:** (A) 25 μm , (B - E) 10 μm , (F) 1 μm

ESTÁGIOS IMATUROS DE *COCHLIOMYIA MACELLARIA* (FABRICIUS) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): ULTRAESTRUTURA E TEMPO DE DESENVOLVIMENTO

Karine Brenda Barros-Cordeiro^{a,b}, José Roberto Pujol-Luz^a, Sônia Nair Báb^b

^a Núcleo de Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF. E-mail: Karine.brenda22@gmail.com

^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF.

Manuscrito a ser submetido em língua inglesa para publicação à Acta Tropica

1. Introdução

Calliphoridae é um grupo formado por dípteros muscóides caliptrados de distribuição mundial com mais de 1000 espécies distribuídas em 150 gêneros (Shewell, 1987; Vargas & Wood, 2010). Os califorídeos são conhecidos por sua grande diversidade ecológica, ocupando diferentes habitats (Skevington & Dang, 2002). A maioria das larvas são saprófagas e com frequência são encontradas em excrementos humanos e de outros animais, depósitos de lixo urbano, fossas sépticas e carcaças (Greenberg, 1971, 1973; Queiroz & Carvalho, 1987). Devido ao seu hábito alimentar e por ocuparem diferentes habitats, espécies dessa família são de interesse para a saúde pública e para as ciências forenses. No último caso dados do ciclo de vida e da morfologia das espécies são usados para estimativas de intervalo pós-morte (Greenberg & Kunich, 2002; Marquez *et al.*, 2007; Pujol-Luz *et al.*, 2008; Ferraz, *et al.*, 2011).

Na região Neotropical são conhecidas 99 espécies de califorídeos distribuídas em 29 gêneros (Kosmann *et al.*, 2013). O gênero *Cochliomyia* Townsend, 1915 é composto por quatro espécies (Dear, 1985; Kosmann *et al.*, 2013).

Cochliomyia macellaria (Fabricius) destaca-se no Brasil e em vários outros países americanos por ser uma das principais espécies causadoras de miíase secundária, que é uma lesão causada por larvas histiófagas, o que agrava o quadro infeccioso preestabelecido, esta enfermidade atinge tanto o homem como outros animais, portanto se destaca pela importância médica (Greenberg, 1971, 1973; Guimaraes & Papavero, 1999; Figueiredo *et al.*, 2002; Maldonado & Centeno, 2003; Marquez *et al.*, 2007; Ferraz, *et al.*, 2011). Além disso, ela é reconhecida por ser potencial vetor de diversos enteropatógenos, que causam doenças em humanos e por ser veiculadora de *Dermatobia hominis* (Linnaeus), responsável pela miíase cutânea (Guimarães & Papavero, 1999; Moya-Borja, 2003).

Para a entomologia forense desperta interesse tanto por ter sido encontrada em cadáveres humanos e de outros animais, como por já ter sido usada como ferramenta auxiliar em estimativas de intervalo pós-morte (IPM) (Byrd & Butler, 1996; Byrd & Castner, 2001; Andrade *et al.*, 2005; Huntington *et al.*, 2007; Biavati *et al.* 2010).

Atualmente as informações sobre morfologia e tempo de desenvolvimento, dessa espécie, estão concentradas em trabalhos que utilizaram dados, especialmente do esqueleto cefalofaríngeo das larvas, e de outras estruturas utilizando microscopia

de luz (e.g. Greenberg & Sziska, 1984; Florez & Wolff, 2009). Não há registro de trabalhos com descrição morfológica dos três instares larvais utilizando microscopia eletrônica de varredura.

Este trabalho propôs-se descrever a morfologia externa das formas imaturas de *C. macellaria*, utilizando a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura, acompanhando as mudanças morfológicas e a cronologia dos eventos sofridos ao longo do desenvolvimento pós-embrionário e do desenvolvimento intra-pupal, desde a oviposição até a emergência do adulto.

2. Materiais e Métodos

2.1. Montagem e manutenção de colônia

Para a manutenção das colônias foi oferecido às moscas adultas proteína animal em decomposição. Os ovos adquiridos foram removidos para placas de Petri, forrada com papel filtro e umedecido com água destilada, incubados sob condições controladas a fim de ser observada à hora da eclosão das larvas. Após a eclosão as larvas foram colocadas em recipientes contendo carne moída bovina (1 larva/g de dieta), posteriormente foram acondicionadas em câmara climatizada (BOD) regulada para $23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR. e 12 horas de fotofase. Os adultos que emergiram no laboratório foram mantidos em gaiolas (150 pares/ gaiola) e oferecido dieta composta por água filtrada, leite em pó e levedo de cerveja e algodão embebido em água filtrada. Uma semana após as emergências foi oferecido carne bovina em decomposição (24 horas) para estimular o desenvolvimento das células germinativas e para aquisição dos ovos. As larvas foram colocadas em dieta artificial composta por: rúmen, leite em pó, agar, levedo de cerveja, água destilada, nipagin e caseína (Estrada et al., 2009).

2.2. Obtenção e fixação das amostras para estudo

O experimento foi mantido em câmara climatizada (BOD) regulada para $23,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 12 horas (L:D). Dez larvas (neolarvas) foram fixadas a intervalos de duas horas, desde o momento da eclosão (hora zero) até à 92 hora ($n = 470$), e a cada 12 horas até o início da pupariação ($n = 20$). As larvas foram fixadas em água aquecida à 80°C e posteriormente preservadas em etanol 70%. Todas

as larvas, fixadas após 24 horas da eclosão, foram pesadas, digitalizadas e medidas, da cápsula cefálica ao tubérculo anal, com auxílio do software imageJ©. O método de fixação e estudo adotado para as pupas foi adaptado de Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012) (adaptação no intervalo de fixação das amostras). Após o processo de pupariação, foram fixadas dez pupas a cada intervalo de três horas, nas primeiras 48 horas ($n = 170$), e posteriormente dez pupas a cada intervalo de seis horas, até as primeiras emergências ($n = 120$). As pupas foram fixadas em solução de Carnoy por 48 horas, depois colocadas em solução de ácido fórmico a 5% por 48 horas, e em seguida mantidas e preservadas em etanol 70%.

2.3. Preparo de amostras para Microscopia de Luz

Amostras de larvas dos três instares foram diafanizadas em ácido láctico, dissecadas e montadas em lâminas com Entellan®. As pupas foram dissecadas e mantidas em álcool 70%. Pupas de três e seis horas ($n = 20$) foram incluídas em parafina, posteriormente os cortes de 5 e 10 μm foram corados com hematoxilina de Harris e eosina ou com tricromo Mallory-Pantin. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio ótico Leica DM 2000 e estereomicroscópio Leica M 205C.

2.4. Preparo de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

Larvas dos três instares foram fixadas em Solução de Karnovisky (2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose 5 mM CaCl_2 tamponado com cacodilato de sódio 0.1 M e pH 7,2) por 24 horas. As amostras foram removidas do tampão e imersas em tetróxido de ósmio por uma hora, lavadas em água destilada e desidratadas em diferentes concentrações de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 3 minutos em cada concentração. A seguir o material foi submetido ao processo de secagem ao ponto crítico com CO_2 , montadas em *stubs*, metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 7001 F.

2.5. Terminologia

A terminologia usada para descrever a morfologia dos instares larvais foi adaptada de Imms (1957), McAlpine *et al* (1981) e Ubero-Pascal *et al* (2012). E a terminologia adotada para descrever a morfologia do pupario e as fases do desenvolvimento intra-pupal segue as de Fraenkel & Bhaskaran (1973), Costa *et al* (2006), Cepeda-Palacios & Sholl (2000), Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012).

3. Resultados

Larvas dos três instares apresentaram 12 segmentos: região cefálica (lobo cefálico), três segmentos torácicos (do II ao IV segmento) e oito segmentos abdominais (do V ao XII segmento) (Figs 1A, 2A e 3A). O último segmento abdominal é conhecido como segmento anal.

3.1. Primeiro instar larval (L1)

Comprimento médio de $2,34 \pm 0,64$ mm (Tabela II, IV), os segmentos do corpo são separados por fileiras (grupos) de espinhos de uma ponta e de forma e tamanho variável. Do II ao IX segmento a volta de espinhos é completa, e nos segmentos seguintes a volta de espinhos é incompleta, atinge 2/3 no X e XI segmento. Apresenta área lateral fusiforme do V ao IX segmento. O lobo cefálico apresenta um par de antenas dispostas dorsalmente aos palpos maxilares e antero-lateralmente ao corpo (Fig. 1B). A antena é composta por duas estruturas, um anel basal e um domo apical; entre as duas estruturas da antena observa-se uma sensila (Fig. 1C). Um par de palpos maxilares é observado, formados por um conjunto de sensilas basicônicas e celocônicas, dispostas de forma intercalar na região central do palpo maxilar (Fig. 1D). Próximo ao conjunto de sensilas observa-se duas sensilas acessórias (antenal ou mandibular). Na porção inferior da região pseudocefálica observa-se a crista oral (= máscara facial), o órgão ventral, com quatro sensilas localizadas no meio de uma papila (Fig. 1E), e o lobo labial (Fig. 1B). Os dentes suprabucais estão presentes. O esqueleto cefalofaríngeo é pouco pigmentado e esclerotizado, na região do arco dorsal e nas porções distais do corno dorsal e ventral. A maxila é composta por um par de peças simétricas, articuladas na base, apresentando na extremidade um par de dentes, cada um com mais de uma ponta no ápice, orientado na direção ventral (Fig 4A). A mandíbula é larga, esclerotizada e pigmentada, como a maxila, que é formada por um

par de peças simétricas e ápice arredondado. O esclerito dental está fusionado com a maxila. O esclerito hipostomal é soldado ao hipofaríngeo. O esclerito hipofaríngeo é o mais pigmentado e esclerotizado da região intermediária, com prolongamento lateral que corresponde a trave mediana e apresenta uma forma de H quando em vista dorsal ou ventral. O esclerito infrafaríngeo, apresenta-se unido ao ramo ventral, pouco visível, formando os canais da face ventral da luz faríngeana. O esclerito faríngeo é esclerotizado e com maior grau de pigmentação na região interna do que nas bordas e ápices. A farínge e o arco clipeal estão completos. Cornos dorsal e ventral são aproximadamente do mesmo tamanho (Fig. 4A). Apresenta um par de órgãos de Keilin na porção média de cada segmento torácico, e de cada fenda do órgão saem três sensilas (Fig. 1F). Próximo ao órgão de Keilin observa-se um par de sensilas celocônicas. Apresenta papilas no último segmento abdominal (= tubérculos), sendo três pares de tubérculos dorsais, três pares de tubérculos ventrais e um par interno. O espiráculo posterior apresenta duas fendas e peritrema indefinido (Fig. 1G e 5A). Na região central, circular, observam-se quatro tufos peristigmáticos (Fig. 1G). O tempo mínimo de duração do instar foi de 18 horas (Tabela I).

3.2. Farado 1º/2º instar larval

Comprimento médio de $3,51 \pm 0,36$ mm (Tabela II, IV). Cornos dorsal e ventral estão em desenvolvimento. Maxila, mandíbula e esclerito hipofaríngeo apresentam-se maiores e em desenvolvimento. Já se pode observar o espiráculo anterior. Espiráculo posterior do instar seguinte em formação, este com duas aberturas (Fig. 5B). O tempo de duração mínima para a transição do instar foi de quatro horas (Tabela I).

3.3. Segundo instar larval (L2)

Comprimento médio de $6,07 \pm 1,08$ mm e peso médio de $2,80 \pm 2,11$ mg (Tabela II-V). Os segmentos são separados por grupos de fileiras de espinhos de diferentes tamanhos e formas, podendo apresentar de uma a três pontas. Do II ao IX segmento a volta de espinhos é completa, nos segmentos seguintes é incompleta, atingindo cerca de 2/3 da volta. No anel de espinhos, da região ventral do corpo, existem grupamentos de espinhos que formam espaços entre eles, esses espaços

ocorrem do V ao XI segmento, dividindo o anel em porção anterior e posterior. A área lateral fusiforme está presente do V ao IX segmento. Observa-se o pseudocefalo com dois lobos cefálicos e em posição latero-dorsal (Fig. 2B). Apresenta uma antena em cada lobo, disposta dorsalmente ao palpo maxilar. A antena é composta por duas estruturas, um anel basal e um domo, sendo o domo menor que o anel basal (Fig. 2C). Exibe uma sensila na parte externa do anel basal e entre as duas estruturas da antena. Observa-se um par de palpos maxilares formados por um conjunto de sensilas basicônicas e celocônicas, dispostas de forma intercalar (Fig. 2F). Também se faz presente um par de sensilas acessórias. Na região inferior do pseudocéfalo observa-se a crista oral (= máscara facial), um lobo labial e o órgão ventral que é formado por quatro pequenos dígitos sobre uma papila (Fig. 2D). Os dentes suprabucais estão presentes (Fig. 4C). A maxila é fortemente esclerotizada e pigmentada, com a curva pronunciada e o ápice arredondado. A mandíbula está fusionada a maxila. O esclerito dental está presente, pouco pigmentado e esclerotizado. O esclerito labial é pouco pronunciado e pigmentado, e está fusionado a maxila. O esclerito hipostomal é largo, fortemente esclerotizado e pigmentado, possui a forma de uma barra, ligado ao esclerito faringeano e surge logo abaixo da depressão ocular. A depressão ocular é esclerotizada, pigmentada e pronunciada, acima do esclerito hipostomal. Apresenta arco clipeal pouco pigmentado e esclerotizado. O corno dorsal está pigmentado e esclerotizado. O corno ventral apresenta extremidade posterior pouco pronunciada, esclerotizado e pigmentada. A incisão média, entre os cornos, é fortemente esclerotizada, pigmentada e pronunciada (Fig. 4C). Observa-se no primeiro segmento torácico um par de espiráculos (protorácicos), em forma de leque, a extremidade apresenta de oito a dez papilas lisas que lembram uma ferradura (Fig. 2E). Apresenta em cada um dos segmentos torácicos, na região ventral, um par de órgãos de Keilin, de cada fenda do órgão saem três sensila (Fig. 2G). Observa-se uma sensila celocônica próxima de cada órgão de Keilin (Fig. 2G). Apresenta na região posterior do último segmento abdominal, três pares de papilas (= tubérculos) dorsal, três pares ventrais e um par interno. Exibe um par de espiráculos posterior, com peritrema indefinido, afilado e incompleto, observa-se em cada espiráculo duas aberturas (rima = fendas), de cada abertura saem dois tufos peristigmáticos (Figs. 2H-I e 5C). O botão espiracular não é visível. O tempo mínimo de duração do instar foi de 16 horas (Tabela I).

3.4. *Farado 2º/3º instar larval*

Comprimento médio de $8,17 \pm 0,98$ mm e peso médio de $7,90 \pm 2,52$ mg (Tabela II-V). O esqueleto cefalofaríngeo é semelhante ao do segundo instar, mas apresenta a formação da maxila, mandíbula e cornos dorsal e ventral, que caracterizam o instar seguinte (Fig. 4D). Apresenta a formação do espiráculo anterior de terceiro instar, com três aberturas espiraculares (Fig. 5D). O tempo de duração mínima para a transição do instar foi de quatro horas (Tabela I).

3.5. *Terceiro instar larval (L3)*

Comprimento médio de $14,88 \pm 2,31$ mm e peso médio de $45,70 \pm 19,23$ mg (Tabelas II-V). Segmentos do corpo separados por fileiras de espinhos de diferentes tamanhos e formas, podendo apresentar de uma a três pontas, raramente quatro pontas (Fig. 3F). Apresenta do X ao XII segmento espinhos menores que nos segmentos anteriores. A volta de espinhos do II ao IX segmento é completa, nos segmentos seguintes é incompleta, atinge cerca de 2/3 da volta no IX segmento e 1/2 nos segmentos X-XII. Na região ventral, no anel de espinhos, há espaços sem espinhos, separando a fileira de espinhos em porção anterior e posterior, essa separação ocorre do VII ao XI segmento. A área lateral fusiforme está presente do V ao X segmento. Observa-se o pseudocefalo com dois lobos cefálicos, e em posição latero-dorsal (Fig. 3B). A região antero-lateral do corpo, apresenta uma antena em cada lobo, disposta dorsalmente ao palpo maxilar. A antena é composta por duas estruturas, um anel basal e um domo, sendo o anel basal maior que o domo (Fig. 3D). Na superfície do anel e entre as duas estruturas, observa-se uma sensila. Os palpos maxilares são diferentes do que se observam nos instares anteriores, o conjunto de sensilas basicônica e celocônica estão cercadas por estruturas lisas e em dobras, semelhante a cristas, o par de sensilas acessórias está presente e entre as cristas (Fig. 3C). Observa-se na porção inferior do pseudocéfalo a crista oral (= máscara facial), lobo labial e órgão ventral (Fig. 3E), em forma lenticular, na maioria das vezes, algumas larvas podem apresentar uma depressão na região mediana interna. Os dentes suprabucais estão presentes (Fig. 4E). A maxila é fracamente curvada, robusta, fortemente esclerotizada e pigmentada, apresenta na região anterior ápice arredondado e na região posterior mais largo. A mandíbula está fusionada à maxila e com o ápice posterior em ponta. O

esclerito dental é semelhante a um L invertido e robusto. O esclerito labial é bem constituído, esclerotizado e pigmentado. Os escleritos hipostomal e infrafaríngeo estão unidos ao esclerito faríngeo. Esclerito faríngeo e arco clipeal apresentam-se pigmentados e fortemente esclerotizados. A margem externa do corno dorsal é menos esclerotizada e pigmentada que a região interna, o mesmo ocorre com o corno ventral. O corno dorsal apresenta ápice em ponta e corno ventral com extremidades arredondadas. A incisão média é fortemente pronunciada, com curvatura mais fechada que no instar anterior (Fig. 4E). O primeiro segmento torácico apresenta um par de espiráculos em forma de leque, com a extremidade composta de dez a doze papilas lisas, onde a forma lembra uma ferradura (Fig. 3H). Exibe em cada um dos segmentos torácicos, na região ventral, um par de órgãos de Keilin (Fig. 3G). De cada fenda do órgão saem três sensilas, e próximo ao órgão observa-se um par de sensilas celocônicas (Fig. 3G). Observam-se sensilas placodeas distribuídas de modo regular e em todos os segmentos do tórax, desde a região ventral até a região lateral (Fig. 3F, G). Na região posterior do último segmento abdominal, as papilas (= tubérculos) são mais desenvolvidas que nos instares anteriores, com três pares dorsais, três pares ventrais e um par interno (Fig. 3I). É observado um par de espiráculos posteriores, com peritrema definido, sendo na maioria das vezes grosso (Fig. 5F), mas há casos em que se apresenta delgado (Fig. 5E). Em cada peritrema observa-se três aberturas (rima = fenda), cada rima está associada a um tufo peristigmático (Fig. 3J). O botão espiracular não é visível, na maioria das larvas, mas em alguns casos pode ser visto em um ou nos dois peritremas. O tempo mínimo de duração do instar foi de 50 horas (Tabela I).

3.6. *Pupariação (pré-pupa)*

Após abandonar a dieta, a larva fica em atividade sobre a vermiculita por algumas horas. Aos poucos elas começam a se enterrar no substrato e reduzir a mobilidade. Durante esse processo ocorre a retração dos segmentos; o primeiro segmento sofre invaginação em relação ao segundo segmento. A cutícula progressivamente fica mais esclerotizada e pigmentada (do amarelo escuro ao marrom escuro). O espiráculo posterior entra em colapso e se funde com o tubérculo anal. A pupa assume a forma de um barril. Seu comprimento médio é cerca de 40% menor que o comprimento médio da larva em terceiro instar. O comprimento médio das

pupas foi de $8,87 \pm 0,47$ mm o peso médio foi de $48,60 \pm 5,20$ mg (Tabelas II-V). O tempo mínimo de duração desse processo foi de 12 horas (Tabela I).

3.7. Apólise Larva-pupa

O pupário foi formado pelo tegumento do último instar larval (L3). Em *C. macellaria* a separação das cutículas ocorre inicialmente da porção média do pupário para as extremidades e da região ventral para a dorsal. As extremidades, inicialmente, ficam aderidas ao pupário, na região anterior pela maxila e mandíbula e na posterior pelos espiráculos e intestino. O tempo mínimo para que se complete o processo de apólise foi de três horas (Tabela I).

3.8. Pupa criptocefálica

Iniciado logo após a apólise completa, o pupário “solto” se torna mais pigmentado e esclerotizado. A mandíbula e a maxila se desprendem do restante do esqueleto cefalofaríngeo e ficam aderidas ao pupário. A pupa nesse momento possui forma indefinida e está envolvida por uma fina membrana (Figs. 6A, B). Esse estágio teve duração mínima de seis horas (Tabela I).

3.9. Pupa fanerocefálica

Corresponde ao processo de evaginação da capsula cefálica e dos apêndices torácicos. Nesse período é possível distinguir cabeça, tórax e abdômen do imago. O par de espiráculos protorácicos forma uma projeção lateral, semelhante a uma trompa cilíndrica, que se liga ao pupário (Fig. 6C). Esse processo é rápido e dura no mínimo três horas (Tabela I).

3.10. Adulto farado

Corresponde a etapa de maturação do adulto e pode ser dividida em quatro fases de acordo com a pigmentação dos olhos compostos (definição adotada por Cepeda-Palacios & Sholl, 2000). (1) olhos-transparentes: cabeça, tórax e abdômen definidos, pernas e asas não membranosas (Figs. 6D, 7A). Esse período durou no mínimo três

horas. (2) olhos-amarelos: suturas do tórax e abdômen definidas, a terminália é visível, início da pigmentação de pelos e cerdas (Figs. 6E-F, 7B). Esse período durou no mínimo 27 horas. (3) olhos-rosados: maior pigmentação de pelos, cerdas, nervuras das asas e pernas; proboscidade e antenas nítidas (Fig. 7C). Essa etapa durou no mínimo 54 horas. (4) olhos-vermelhos: corpo completamente formado, antenas, palpos e ocelos bem definidos; asas membranosas e veias enegrecidas; genitália externa visível; escleritos definidos e delimitados; saco pitilíneo formado (Figs. 6G-H, 7D). Esse período durou 24 horas (Tabela I).

Seguindo a mudança da coloração dos olhos compostos, as estruturas do corpo gradualmente ficaram pigmentadas e esclerotizadas.

4. Discussão

A característica e a disposição dos espinhos, em larvas de terceiro instar, do último segmento abdominal podem ser usadas para distinguir larvas de *C. macellaria* de larvas de *C. hominivorax*, mas essas espécies também podem ser separadas pela pigmentação do tronco traqueal do espiráculo posterior, em *C. hominivorax* a pigmentação se estende até o décimo ou nono segmento, já em *C. macellaria* a não ultrapassa o décimo primeiro segmento (Erzinclioglu, 1987; Guimarães & Papavero, 1999; Florez & Wolff, 2009).

Em nossas amostras, larvas de primeiro instar de *C. macellaria* apresentaram espinhos de ponta única, volta completa do II ao IX segmento e área fusiforme presente do V ao IX segmento. Outros trabalhos descreveram de modo semelhante essas estruturas relacionadas com espinhos (Greenberg & Szyska, 1984; Florez & Wolff, 2009). Entretanto, Greenberg & Szyska (1984) apontaram que larvas desse instar possuíam espinhos com mais de uma ponta, o que diferem, portanto, dos nossos resultados.

Larvas de segundo e terceiro instar apresentam espinhos de uma a três pontas, raramente quatro, volta completa de espinhos até o IX segmento, e a área fusiforme podendo ocorrer até o X segmento. Essas características também foram observadas por Greenberg & Szyska (1984) e Florez & Wolff (2009). Esses autores perceberam espinhos com mais de uma ponta e área fusiforme variável.

As estruturas da antena, anel basal e domo, são proporcionalmente do mesmo comprimento no primeiro e segundo instar larval, já no terceiro instar o anel basal se

apresentou maior que o domo, comparado com os instares anteriores. A sensila da antena é maior em comprimento no primeiro instar, mas no segundo e terceiro instar, ela é maior em largura e menor em comprimento, além de serem muito semelhantes nos dois últimos instares. Para outras espécies como *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya nigripes* Aubertin (não encontrada no Brasil), o comprimento dessas estruturas, em larvas de primeiro instar, é proporcional ao que observamos para *C. macellaria*, mas o domo de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy é maior que o anel basal (Sukontason *et al.*, 2005; Szpila *et al.*, 2012; Ubero-Pascal *et al.*, 2012).

O palpo maxilar das larvas de primeiro instar é o mais simples dos três instares; a presença de cristas em volta dessa estrutura é maior no terceiro instar, sendo o segundo instar de complexidade intermediária. Talvez pela presença das cristas, a área ocupada pelo palpo do terceiro instar seja menor que nos instares anteriores. Devido a modificação em complexidade do palpo maxilar segundo a variação do instar, ele possa auxiliar na identificação da idade larval, o mesmo foi observado por Ubero-Pascal *et al.* (2012) para *C. vicina*. Nós concordamos com outros trabalhos de que a disposição das sensilas acessórias (celocônicas) são potenciais ferramentas para uso taxonômico (Szpila *et al.*, 2008; Ubero-Pascal *et al.*, 2012).

O esqueleto cefalofaríngeo de larvas em primeiro instar de *C. macellaria* é fracamente pigmentado e esclerotizado quando comparado com os instares seguintes. A descrição do esqueleto cefalofaríngeo dos três instares para *C. macellaria* é muito semelhante ao que foi proposto por Florez & Wolff (2009). Entretanto, não observamos semelhanças na descrição da maxila e mandíbula para larvas em primeiro instar, pois, Florez & Wolff (2009) não apresentaram maiores detalhes dessas estruturas. Além disso, observa-se divergência no esclerito hipofaríngeo de larvas de segundo instar, nossas amostras eram mais robustas e não apresentaram depressão na região dorsal dessa estrutura, quando comparado com os desenhos de Florez & Wolff (2009).

Greenberg & Szyska (1984) também descreveram o esqueleto cefalofaríngeo para os três instares larvais de *C. macellaria*. A falta de detalhe nos seus desenhos e descrições dificultou a comparação entre os trabalhos, não é possível definir, por exemplo, como é o ápice da maxila de primeiro instar, se em ponta ou serrilhado, além disso, abaixo da maxila, nesse instar eles desenharam uma estrutura que não

conseguimos identificar. Para larvas de segundo instar eles desenharam um ângulo pronunciado entre a maxila e a mandíbula e um esclerito hipofaríngeo menos robusto e fusionado a mandíbula e ao esclerito infaríngeo. Em larvas de terceiro instar, nossas amostras, a maxila é mais robusta do que havia sido descrito por eles.

O espiráculo anterior de segundo instar de *C. macellaria* apresenta de 8-9 papilas, nesse instar outras espécies dessa família apresentam de 10-12 papilas para *C. albiceps*, 8-9 papilas para *C. megacephala*, 10-11 papilas para *Chrysomya putoria* (Wiedemann), 11-13 papilas para *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Queiroz *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2007; Thyssen & Linhares, 2007; Florez & Wolff, 2009; Barros-Cordeiro & Pujol-Luz, 2010).

O espiráculo anterior de terceiro instar de *C. macellaria* apresenta de 9-11 papilas, outros trabalhos realizados com essa espécie, observaram resultados similares com variação de 8-12 papilas (Greenberg & Szyska 1984; Florez & Wolff, 2009). Para outras espécies, desta família, já foram observadas de 10-12 papilas para *C. albiceps* e *C. megacephala*, 10-11 papilas para *C. putoria*, 10-13 papilas para *H. segmentaria* e 9 papilas para *C. hominivorax* (Greenberg & Szyska 1984; Queiroz *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2007; Thyssen & Linhares, 2007; Florez & Wolff, 2009; Barros-Cordeiro & Pujol-Luz, 2010).

Espiráculo posterior em larvas de terceiro instar de *C. macellaria* é descrito geralmente com peritrema robusto e ausência do botão espiracular (*e. g.* Greenberg & Szyska 1984; Florez & Wolff, 2009) Entretanto, algumas de nossas amostras apresentaram peritrema delgado e em alguns casos a presença do botão espiracular, em um dos espiráculos ou no par. Acreditamos que a presença do botão espiracular possa estar associada a uma possível falha no processo de apólise, entre larvas de segundo e terceiro instar.

O tempo de desenvolvimento de *C. macellaria*, sob temperatura constante (23°C), do momento da oviposição até as primeiras emergências da mosca adulta foi de 241 horas (10,04 dias), sendo o tempo de desenvolvimento embrionário, larval e pupal de 17, 104 e 120 horas, respectivamente (Tabela I). Em uma temperatura constante de 30°C o tempo de desenvolvimento embrionário foi de 12,4 horas (Cunha-e-Silva & Milward-de-Azevedo, 1992). Sob condições controladas com temperatura constante de 30°C dia e 28°C noite, 12 horas de fotofase o tempo de desenvolvimento larval foi de 4,17 dias, pupal 4,04 dias e da neolarva até o adulto foi de 8,16 dias (Silva *et al.*, 2012)

O tempo de desenvolvimento pode variar de acordo com as condições ambientais, como por exemplo, em floresta onde as temperaturas médias máximas e mínimas diárias foram de $26 \pm 3,1^{\circ}\text{C}$ e $21,7 \pm 1,9^{\circ}\text{C}$ e altitude de 1000m o tempo de desenvolvimento de ovo até adulto foi de 240-278,4 horas, e os estágios de desenvolvimento embrionário, larval e pupal, nessas condições foram de 14-22,5 horas, 106,8-127,4 horas e 120-144 horas, respectivamente (modificados de dias para horas de Greenberg & Sziska, 1984).

Neste trabalho, o tempo de desenvolvimento de larvas em primeiro instar foi de 22 horas (L1 + Farado 1^o/2^o instar), para larvas de segundo instar foi de 20 horas (L2 + Farado 2^o/3^o) e para larvas de terceiro instar foi de 62 horas (L3 + pré-pupa). Somamos os resultados para ser possível a comparação com outros trabalhos, visto que a maioria não observa o farado e não separa a pré-pupa das larvas de terceiro instar. Em outros estudos, com temperatura média de $21,1^{\circ}\text{C}$ e oscilação de $5,5^{\circ}\text{C}$ o tempo de desenvolvimento embrionário foi de 12 horas e larvas de primeiro, segundo e terceiro instar se desenvolveram em 32, 28 e 100 horas, respectivamente, e as pupas em 125 horas. Em temperatura constante de $25 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e luz constante o tempo de desenvolvimento embrionário foi de 12 horas, larvas de primeiro, segundo e terceiro instar se desenvolveram em 18, 24 e 62 horas, respectivamente, e as pupas em 124 horas (Byrd & Butler, 1996).

Sob condições semi-controladas em área de floresta, acima de 1080 m do nível do mar, com 80% de umidade e temperatura média de $25,30 \pm 3,26^{\circ}\text{C}$, o tempo de desenvolvimento *C. macellaria* de ovo até adulto foi de 257-332 horas. Nessas condições, o tempo de desenvolvimento embrionário foi de 15,82 horas, larvas de primeiro instar 22,24 horas, larvas de segundo instar 44,48 horas, larvas de terceiro instar 78,03 horas, pré-pupas 111,25 horas e pupas 116-206 horas (Vélez & Wolff, 2008).

Embora os resultados obtidos por alguns trabalhos apresentados se aproximem dos resultados desse estudo, existem algumas diferenças, que podem ser explicadas, em parte, pelas diferentes formas de criação. Outras possíveis explicações podem estar relacionadas ao desenvolvimento precoce dos ovos ainda no corpo das fêmeas, antes da oviposição (Wells & King, 2001) e ou as diferenças (abióticas) em que cada indivíduo estava submetido (Richards *et al.*, 2008; Barros-Cordeiro & Pujol-Luz, 2010).

O desenvolvimento intra-pupal de *C. macellaria* ocorreu de modo semelhante ao que se observa para outros dípteros (Cyclorrhapa), por exemplo, *C. albiceps*, *Oestrus ovis* Linneaus, *Sarcophaga bullata* (Parker) (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

A apólise completa de *C. macellaria*, em nossos resultados à 23°C foi completa com 2,5% (3 horas) do tempo de pupa, segundo Barrit & Birt (1971) à 30°C a apólise de *Lucilia cuprina* (Wiedemann) foi completa com 2,8% (4 horas) do tempo de pupa. Para outras espécies como *C. albiceps*, *Musca domestica* Linneaus e *O. ovis* a apólise foi completa, respectivamente, com 3,4% (3 horas), 4,2% (4 horas) e 3,4% (18 horas) do tempo de pupa (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

As pupas criptocefálica e fanerocefálica de *C. macellaria* à 23°C ocorream com 5% (6 horas) e 10% (12 horas) da fase de pupa. Os mesmos eventos foram registrados, respectivamente, para: *L. cuprina*, 5,6% (8 horas) e 16,7% (24 horas), *C. albiceps* 6,7% (6 horas) e 10% (9 horas), *M. domestica* 6,2-9,4% (6-9 horas) e 16,7-18,7% (16-18 horas), *S. bullata* 13,6% (36 horas) e 18,2% (48 horas) e *O. ovis* 9,1% (48 horas) e 22,7% (120 horas) (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Barrit & Birt, 1983; Sivasubramanian & Biagi, 1983; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

A pupa farada é a etapa mais longa da fase de pupa, ela corresponde ao período de maturação do adulto. Neste trabalho à 23°C essa fase durou, para *C. macellaria*, 90% (108 horas) do tempo de pupa. Em outras espécies como: *C. albiceps*, *L. cuprina*, *M. domestica* *S. bullata* e *O. ovis* essa etapa durou 86,7% (78 horas), 88,9% (128 horas), 70,8% (68 horas), 45,5% (120 horas) e 68,2% (360 horas), respectivamente (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Barrit & Birt, 1983; Sivasubramanian & Biagi, 1983; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

Algumas diferenças no tempo de desenvolvimento das espécies, além de serem naturais por ser uma comparação interespecífica, também podem estar associadas à temperatura de criação, ao tipo e quantidade de dieta oferecida na fase larval e ou a própria metodologia adotada nos trabalhos, que nem sempre são semelhantes.

A pupa farada pode ser separada em quatro eventos, segundo a mudança progressiva de coloração dos olhos compostos. Nesse período *C. macellaria* permaneceu por no mínimo 3 horas (2,8%) com olhos transparentes, 27 horas (25%)

com olhos amarelos, 54 horas (50%) com olhos rosa e 24 horas (22,2%) com olhos vermelhos. Outra espécie da mesma família, *C. albiceps*, permaneceu por no mínimo 12 horas (15,4%) com olhos transparentes, 39 horas (50%) com olhos amarelos, 6 horas (7,7%) com olhos rosa e 24 horas (30,8%) com olhos vermelhos (Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

Larvas em processo de apólise (farado 1º/2º e 2º/3º) tendem a reduzir ligeiramente seu comprimento (Tabela II, IV), e esta redução esta associada à reorganização celular que permite a continuidade do crescimento. Larvas de *C. macellaria*, nesse estudo, mediram em média 2,34 mm (L1), 6,07 mm (L2), 14,82 mm (L3) e pré-pupas 14,72 mm; sob condições semi-controladas de criação em uma floresta, larvas dessa espécie mediram em média 2,10 mm (L1), 4,27 mm (L2) e 9,85 mm (L3) e pré-puas 11,76 mm (Vélez & Wolff, 2008). A diferença nos comprimentos das larvas, pode estar relacionado diretamente com as diferentes formas de criação.

O ganho de peso de *C. macellaria* foi crescente até a 58ª hora (após a eclosão das larvas) e ficou instável até o final da pupariação (Tabela III, V). O estágio larval é a principal fase em que a limitação do recurso pode afetar o desenvolvimento e sobrevivência do indivíduo. Para que este possa completar seu ciclo de desenvolvimento e gerar adultos viáveis é necessário que no processo de pupariação ele tenha atingido um peso mínimo, que é espécie específico. Nesse estudo as larvas abandonaram a dieta com peso médio de 54 mg. Testes feitos com algumas dietas alternativas revelaram que o peso mínimo larval para pupação e viabilidade das pupas de *C. macellaria* foi de 44 mg (Cunha-e-Silva & Milward-de-Azevedo, 1994). Para espécies da mesma subfamília, o peso mínimo das pré-pupas para se obter adultos viáveis foi de 42 mg para *C. albiceps* e de 30-32 mg para *C. megacephala* (Queiroz & Milward-de-Azevedo, 1991; Von Zuben, 1998).

5. Agradecimentos

A Érica S. Harterreiten-Sousa por auxiliar em diversas etapas do trabalho, a Ana Carolina Francoe e a Caroline Demo, pelo auxílio na coleta das moscas adultas. Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal e às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAP/DF, FINEP.

6. Referências

- Andrade, H.T.A., Varela-Freire A.A., Batista M.J.A., Medeiros J.F., 2005. Calliphoridae (Diptera) coletados em cadáveres humanos no Rio Grande do Norte. *Neotrop Entomol* 34 (5): 855-856.
- Barritt, L.C. & Birt, L.M., 1971. Development of *Lucilia cuprina*: correlation of biochemical and morphological events. *J Insect Physiol* 17: 1169-1983.
- Barros-Cordeiro, K.B. & Pujol-Luz, J.R., 2010. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. *Pap Av Zool* 50 (47): 709-717.
- Biavati, G.M., Santana, F.H.A., Pujol-Luz, J.R., 2010. A checklist of Calliphoridae blowflies (Insecta, Diptera) associated with a pig carrion in Central Brazil. *J For Sci* 55 (6), 1603-1606.
- Byrd, J.H. & Butler, J.F., 1996. Effects of temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) development. *J. Med. Entomol.* 33 (6): 901-905.
- Cepeda- Palacios, R. & Scholl, P.J., 2000. Intra-puparial development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *J Med Entomol* 37: 239-245.
- Costa, C., Ide, S. Simonka, C.E., 2006. *Insetos Imaturos: metamorfose e identificação*. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 249p.
- Cunha-e-Silva, S.L. & Milward-de-Azevedo, E.M.V., 1992. Estudo comparado do desenvolvimento de dois morfotipos larvais de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). *Revta Bras Zoo.* 9 (3/4): 181-186.
- Estrada, D.A., Grella, M.D., Thyssen, P.J. & Linhares, A.X., 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotrop Entomol* 38 (2): 203-207.
- Erzinclioglu, Y.E., 1987. The larvae of some blowflies of medical and veterinary importance. *Med Vet Entomol* 1: 121-125
- Ferraz, A.C.P., Almeida, V.R.G., Jesus, D.M., Rotatori, G.N., Nunes, R., Aguiar-Coelho, V.M. & Lessa, C.S.S., 2011. Epidemiological study of myiasis in the hospital do Andaraí, Rio de Janeiro, including reference to an exotic etiological agente. *Neotrop Entomol* 40 (3):393-397.
- Figueiredo, R.R., Dorf, S., Couri, M.S., Azevedo, A.A., Mossumez, F., 2002. Corpos estranhos animados em otorrinolaringologia. *Rev Bras Otorrinolaringol* 68 (5): 722-728.

- Florez, E. & Wolff, M., 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales espécies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense em Colombia. *Neotrop Entomol* 38 (3): 418-429.
- Fraenkel, G. & Bhaskaran, G., 1973. Pupariation and pupation in cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Ann Entomol Soc Am* 66: 418-422.
- Greenberg, B. 1971. Flies and disease: ecology, classification and biotic associations. Vol. 1. Princeton University Press, New Jersey, 856p.
- Greenberg, B. 1973. Flies and disease: biology and disease transmission. Vol. II. Princeton University Press, New Jersey, 447p.
- Greenberg, B. & Szyska, M.L., 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). *Ann Entomol Soc Am* 77:488-517.
- Greenberg, B. & Kunich, J.C., 2002. Entomology and the law: flies as forensic indicators. University press, Cambridge, 306p.
- Guimarães, J.H. & Papavero, N., 1999. Myiasis in man and animals in the neotropical region- bibliographic database. São Paulo: FAPESP and Editora Plêiade.
- Huntington, T.E., Higley, L.G. & Baxendale, F.P., 2007. Maggot development during morgue storage and its effect on estimating the post-mortem interval. *J For Sci.* 52 (2): 453-458.
- Imms, A.D., 1957. A general textbook of entomology. 9a Ed. London: Methuen & CO LTD. 886p.
- Kosmann, C., Mello, R.P., Harterreiten-Souza, E.S., Pujol-Luz, J.R., 2013. A list of current valid blow fly name (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with key to the Brazilian species. *Entomobrasilis* 6 (1), 74-85.
- Maldonado, M.A. & Centeno N., 2003. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Mem I Oswaldo Cruz* 98 (2): 213-216.
- Marquez, A.T., Mattos, M.S. & Nascimento, S.B., 2007. Miíases associadas com alguns fatores sócio-econômicos em cinco áreas urbanas do Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 40 (2): 175-180.
- McAlpine, J.F., Peterson, V.B., Shewell, G.E., Teskey, J.H., Vockeroth, J.R., & Wood, D.N., 1981. Manual of Nearctic Diptera. Research Branch Agriculture Canada, Monograph, 1. 674p.
- Moya-Borja, G.E., 2003. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas. *Pesqui Vet Brasil* 23: 131-138.

- Oliveira, M.S., Mello, R.P. & Queiroz, M.M.C., 2007. Morfologia e duração dos instares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em laboratório. *Rev Bras Entomol* 51 (2): 239-245.
- Pujol-Luz, J.R., Arantes, L.C., & Constantino, R., 2008. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Rev Bras Entomol* 52(4): 485-492.
- Pujol-Luz, J.R. & Barros-Cordeiro, K.B., 2012. Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 56 (3): 269-272.
- Queiroz, S.M.P. & Carvalho, C.J.B., 1987. Chave pictórica e descrição de larvas de 3º instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em vazadouros de resíduos sólidos domésticos em Curitiba, Paraná. *An Soc Entomol Bras* 16(2): 265-288.
- Queiroz, M.M.C. & Milward-de-Azevedo, E.M.V., 1991. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Rev Bras Zoo* 8: 75-84.
- 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. *Mem I Oswaldo Cruz* 92: 187-196.
- Richards, C.S., Paterson, I.D. & Villet, M.H., 2008. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. *In J Legal Med* 122: 271-279
- Shewell, G.E., 1987. Calliphoridae, 1113-1145 p. *In: McAlpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, H.J., Vockeroth, J.R., & Wood, D.M. (Eds). Manual of Nearctic Diptera. Vol 2. Ottawa, Monograph/Agriculture Canada, 657p.*
- Silva, D.C., Aguiar-Coelho, V.M., Silva, S.L.C., Carvalho, R.P., Moya-Borja, G.E., 2012. Desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), criada em duas dietas naturais, sob condições controladas. *Biotemas* 25 (4): 131-137.
- Sivasubramanian, P. & Biagi, M., 1983. Scientific note morphology of the pupal stage of the fleshfly, *Sarcophaga bullata* (Parker) (Diptera: Sarcophagidae). *In J Insect Morpho Embryol* 12 (5/6): 355-359.
- Skevington, J.H. & Dang P.T., 2002. Exploring the diversity of flies (Diptera). *Biodiversity* 3 (4): 3-27

- Sukontason, K.L., Vogtsberger, R.C., Boonchu, N., Chaiwong, T., Sripakdee, D., Ngern-Klun, R., Piangjai, S., & Sukontason, K., 2005. Larval morphology of *Chrysomya nigripes* (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance. *J Med Entomol* 42 (3): 233-240.
- Szpila, K., Pape, T. & Rusinek, A., 2008. Morphology of the first instar of *Calliphora vicina*, *Phormia regina* and *Lucilia illustris* (Diptera, Calliphoridae). *Med Vet Entomol* 22: 16-25.
- Szipla, K., Hall, M.J.R., Sukontason, K.L., & Tantawi, T.I., 2012. Morphology and identification of first instars of the European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part I: Chrysomyinae. *Med Vet Entomol*: 1-13.
- Thyssen, P.J. & Linhares, A.X., 2007. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). *Biol Res* 40: 271-280.
- Ubero-Pascal, N., López-Esclapez, R., María-Dolores, G. & María-Isabel, A., 2012. Morphology of preimaginal stages of *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy 1830 (Diptera: Calliphoridae): A comparative study. *Forensic Sci Int* 219: 228-243.
- Vargas, J. & Wood, D.M., 2010. Calliphoridae, p. 1297-1304. In: Brown, B.V., Borkent, A., Vumming, J.M., Wood, D.M., Woodley, N.E. & Zumbado, M.A, (eds). *Manual of Central American Diptera*. Vol. 2. Canada, ontario, NCR Research Press, 728p.
- Vélez, M.C. & Wolff, M., 2008. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. *Pap Av Zoo* 48: 41-47.
- Von Zuben, C., 1998. Comportamento de oviposturas individuais, percentage de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F). *An Soc Entomol Brasil* 27 (4): 525-533.
- Wells, J.D. & King, J., 2001. Incidence of precocious egg development in flies of forensic importance (Calliphoridae). *Pan-Pacific Entomol* 77 (4): 235-239.

Tabela I. Tempo de desenvolvimento mínimo de *Cochliomyia macellaria*, em horas (h), para cada estágio do desenvolvimento a $23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

| Estágio | Evento | Tempo (h) | Media(h) | DP | Variação (h) | n | |
|--------------|-----------------------------|-----------|----------|----|--------------|------------|------|
| Ovo | Embrionário | 17 | 17,08 | ± | 0,45 | (17 - 18) | 1257 |
| | Larva 1º instar | 18 | 8,43 | ± | 5,44 | (*00 - 18) | 94 |
| Larva | Farado 1º/ 2º instar | 04 | 19,41 | ± | 1,14 | (18 - 22) | 17 |
| | Larva 2º instar | 16 | 29,49 | ± | 4,89 | (22 - 44) | 83 |
| | Farado 2º/ 3º instar | 04 | 40,21 | ± | 2,09 | (36 - 44) | 28 |
| | Larva 3º instar | 50 | 68,2 | ± | 14,31 | (42 - 92) | 248 |
| | Pré-pupa | 12 | 98,00 | ± | 6,00 | (92- 104) | 20 |
| Pupa | Apolise | 03 | 8,45 | ± | 6,75 | (*00 - 27) | 55 |
| | Criptocefálica | 06 | 12,60 | ± | 10,37 | (06 - 42) | 10 |
| | Fanerocefálica | 03 | 28,20 | ± | 25,00 | (12 - 78) | 05 |
| | Transparente | 03 | 28,57 | ± | 7,61 | (15 - 45) | 65 |
| | Amarelo | 27 | 54,85 | ± | 15,09 | (30 - 46) | 85 |
| | Rosa | 54 | 83,05 | ± | 4,02 | (78 - 90) | 19 |
| | Vermelho | 24 | 107,32 | ± | 10,72 | (90 - 120) | 44 |

Tempo (h); refere-se ao tempo de duração mínima de cada evento. Média (h): refere-se à média de tempo em que ocorre cada evento. DP: Desvio Padrão; Variação: Intervalo em que ocorre cada evento; n: número de amostras; * início de cada estágio

Tabela II. Comprimento médio em mm das larvas de *Cochliomyia macellaria*, para cada instar larval e estágio de desenvolvimento.

| Instar | Média (mm) | DP | Variação (mm) | n | |
|----------------------------|------------|----|---------------|-----------------|-----|
| Larva 1º instar | 2,34 | ± | 0,64 | (1,04 - 3,84) | 94 |
| Farado 1º/2º instar | 3,51 | ± | 0,36 | (2,82 - 4,58) | 17 |
| Larva 2º instar | 6,07 | ± | 1,08 | (3,15 - 9,60) | 83 |
| Farado 2º/3º instar | 8,17 | ± | 0,98 | (6,10 - 10,52) | 28 |
| Larva 3º instar | 14,88 | ± | 2,31 | (7,76 - 18,58) | 248 |
| Pré-pupa | 14,72 | ± | 1,53 | (11,51 - 18,10) | 20 |
| Pupa | 8,87 | ± | 0,47 | (7,91 - 9,47) | 10 |

DP: Desvio Padrão; Variação: Intervalo de Variação; n: número de amostras

Tabela III. Peso médio em mg das larvas de *Cochliomyia macellaria*, para cada instar larval e estágio de desenvolvimento.

| Instar | Média (mg) | DP | Variação (mg) | n | |
|----------------------------|------------|----|---------------|-----------------|-----|
| Larva 2º instar | 2,80 | ± | 2,11 | (0,10 - 13,10) | 74 |
| Farado 2º/3º instar | 7,90 | ± | 2,52 | (4,60 - 14,60) | 28 |
| Larva 3º instar | 45,70 | ± | 19,23 | (6,50 - 77,10) | 248 |
| Pré-pupa | 54,00 | ± | 8,28 | (42,50 - 69,50) | 20 |
| Pupa | 48,60 | ± | 5,20 | (42,60 - 59,70) | 10 |

DP: Desvio Padrão; Variação: Intervalo de Variação; n: número de amostra

Tabela IV. Comprimento médio em mm das larvas de *Cochliomyia macellaria* a cada duas horas, desde a hora de eclosão até a formação da pupa.

| Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max |
|------------------------|-------|--------|------|------|------------------------|-------|--------|-------|-------|-------------------------|-------|--------|-------|-------|
| ^a 00 | 1,33 | ± 0,34 | 1,04 | 2,15 | 32 | 6,69 | ± 0,64 | 5,54 | 7,38 | 64 | 17,12 | ± 0,63 | 16,06 | 18,15 |
| 02 | 1,72 | ± 0,33 | 1,05 | 2,26 | 34 | 6,18 | ± 0,52 | 5,52 | 6,90 | 66 | 17,05 | ± 0,72 | 16,11 | 18,53 |
| 04 | 2,08 | ± 0,32 | 1,42 | 2,46 | ^d 36 | 7,22 | ± 0,66 | 6,10 | 8,45 | 68 | 16,09 | ± 0,72 | 14,98 | 17,53 |
| 06 | 2,56 | ± 0,26 | 1,95 | 3,0 | 38 | 7,67 | ± 0,70 | 6,43 | 8,75 | 70 | 17,03 | ± 0,89 | 15,71 | 18,58 |
| 08 | 2,75 | ± 0,27 | 2,26 | 3,27 | 40 | 8,04 | ± 0,78 | 7,06 | 9,53 | 72 | 17,36 | ± 0,80 | 15,79 | 18,47 |
| 10 | 2,32 | ± 0,28 | 1,89 | 2,72 | ^e 42 | 8,61 | ± 0,78 | 6,99 | 9,42 | 74 | 17,52 | ± 0,85 | 15,94 | 18,41 |
| 12 | 2,83 | ± 0,42 | 2,13 | 3,52 | 44 | 9,31 | ± 1,01 | 7,56 | 10,73 | 76 | 16,32 | ± 1,06 | 14,06 | 18,06 |
| 14 | 2,14 | ± 0,58 | 1,40 | 2,94 | 46 | 10,63 | ± 1,40 | 8,58 | 12,80 | 78 | 16,82 | ± 0,62 | 15,81 | 17,86 |
| 16 | 3,10 | ± 0,39 | 2,43 | 3,84 | 48 | 12,14 | ± 1,24 | 9,55 | 13,60 | 80 | 15,20 | ± 2,07 | 13,02 | 18,17 |
| ^b 18 | 3,20 | ± 0,37 | 2,36 | 3,64 | 50 | 12,83 | ± 1,18 | 11,01 | 14,39 | 82 | 14,60 | ± 2,58 | 8,34 | 16,73 |
| 20 | 3,52 | ± 0,20 | 3,22 | 3,91 | 52 | 13,59 | ± 0,62 | 12,21 | 14,22 | 84 | 15,12 | ± 1,25 | 13,43 | 17,53 |
| ^c 22 | 4,40 | ± 0,57 | 3,15 | 5,12 | 54 | 14,68 | ± 1,21 | 13,55 | 17,15 | 86 | 14,04 | ± 0,71 | 12,97 | 15,56 |
| 24 | 5,34 | ± 0,47 | 4,54 | 5,81 | 56 | 14,42 | ± 1,16 | 11,46 | 15,44 | 88 | 14,37 | ± 2,02 | 10,54 | 16,66 |
| 26 | 5,71 | ± 0,55 | 4,84 | 6,64 | 58 | 14,29 | ± 1,19 | 12,19 | 16,05 | 90 | 14,40 | ± 1,80 | 11,51 | 18,10 |
| 28 | 5,72 | ± 0,32 | 5,17 | 6,30 | 60 | 15,04 | ± 1,06 | 13,41 | 16,81 | ^f 92 | 15,05 | ± 1,31 | 13,10 | 17,01 |
| 30 | 6,19 | ± 0,42 | 5,19 | 6,63 | 62 | 16,06 | ± 1,03 | 14,55 | 17,55 | ^g 104 | 8,87 | ± 0,50 | 7,91 | 9,47 |

DP:Desvio Padrão; Min: menor comprimento; Max: maior comprimento. ^a eclosão das larvas (L1); ^b visualizada o primeiro farado 1^o/2^o instar; ^c visualizada a larva de 2^o instar; ^d visualizada o primeiro farado de 2^o/3^o instar; ^e visualizada a primeira larva de 3^o instar; ^f pré-pupas; ^g pupas.

Tabela V. Peso médio em mg das larvas de *Cochliomyia macellaria* a cada duas horas, desde a 24^a hora de eclosão até a formação da pupa.

| Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max |
|-----------------|-------|--------|-------|-------|-----------|-------|--------|-------|-------|------------------|-------|---------|-------|-------|
| ^a 24 | 0,99 | ± 0,27 | 0,60 | 1,60 | 48 | 18,19 | ± 3,20 | 11,50 | 21,50 | 72 | 60,89 | ± 7,31 | 49,40 | 69,10 |
| 26 | 1,22 | ± 0,37 | 0,80 | 1,80 | 50 | 22,95 | ± 4,07 | 17,20 | 27,40 | 74 | 69,31 | ± 8,04 | 58,00 | 77,10 |
| 28 | 1,53 | ± 0,29 | 1,10 | 2,00 | 52 | 28,10 | ± 3,60 | 22,70 | 32,20 | 76 | 61,69 | ± 6,87 | 46,70 | 71,70 |
| 30 | 2,46 | ± 0,40 | 2,10 | 3,20 | 54 | 31,19 | ± 5,25 | 23,70 | 37,10 | 78 | 68,74 | ± 4,79 | 60,30 | 72,70 |
| 32 | 3,72 | ± 0,80 | 1,80 | 4,80 | 56 | 32,27 | ± 7,81 | 12,60 | 38,10 | 80 | 52,58 | ± 8,85 | 36,70 | 65,90 |
| 34 | 4,10 | ± 1,00 | 2,00 | 5,40 | 58 | 31,91 | ± 6,58 | 21,00 | 37,90 | 82 | 52,93 | ± 18,56 | 12,40 | 67,30 |
| ^b 36 | 5,07 | ± 0,79 | 3,10 | 5,80 | 60 | 35,91 | ± 6,18 | 23,00 | 42,70 | 84 | 59,24 | ± 6,48 | 50,00 | 68,30 |
| 38 | 5,60 | ± 1,13 | 3,30 | 7,30 | 62 | 50,06 | ± 9,17 | 28,70 | 62,20 | 86 | 59,24 | ± 4,67 | 52,10 | 66,30 |
| 40 | 7,66 | ± 1,53 | 6,40 | 10,70 | 64 | 60,18 | ± 4,34 | 51,00 | 64,10 | 88 | 53,21 | ± 14,16 | 24,10 | 67,70 |
| ^c 42 | 8,79 | ± 2,55 | 5,10 | 12,30 | 66 | 55,27 | ± 9,14 | 36,40 | 64,60 | 90 | 55,19 | ± 10,02 | 32,20 | 73,00 |
| 44 | 11,52 | ± 3,19 | 6,50 | 16,50 | 68 | 50,03 | ± 9,65 | 29,50 | 58,50 | ^d 92 | 59,39 | ± 7,57 | 48,50 | 69,50 |
| 46 | 15,05 | ± 2,96 | 11,90 | 19,00 | 70 | 67,64 | ± 3,70 | 64,20 | 74,60 | ^e 104 | 48,57 | ± 5,48 | 42,50 | 59,70 |

DP: Desvio Padrão; Min: menor peso; Max: maior peso. ^a larva de 2º instar; ^b visualizada o primeiro farado de 2º/3º instar; ^c visualizada a primeira larva de 3º instar; ^d pré-pupas; ^e pupas.

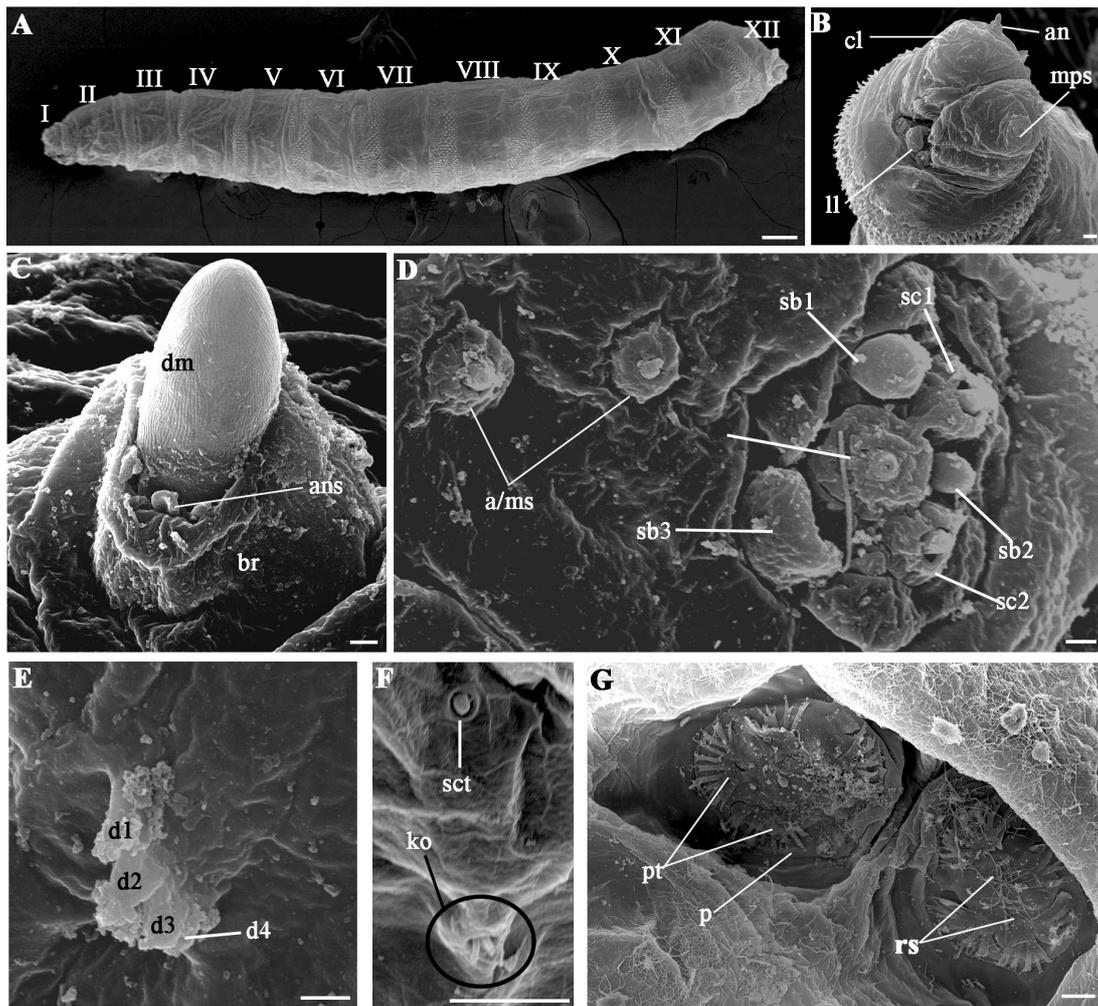


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de primeiro instar de *Cochliomyia macellaria*. (A) corpo da larva composto por doze segmentos; (B) região cefálica; (C) antena e detalhe da sensila da antena; (D) detalhe das sensilas do palpo maxilar; (E) detalhe do órgão ventral; (F) órgão de Keilin e sensila celocônica do tórax; (G) detalhe do espiráculo posterior. **Abreviaturas:** I-XII, segmentos do corpo; an, antena; ans, sensila da antena; a/ms, sensila da antena ou mandíbula; br, anel basal; cl, lobo cefálico; d1-4, pequenos dígitos do órgão ventral; dm, domo da antena; ko, órgão de Keilin; ll, lobo labial; mps, sensila do palpo maxilar; p, peritrema; pt, tufo peristigmático; rs, fenda respiratória; sb1-3, sensila basicônica do palpo maxilar; sc1-3, sensila celocônica do palpo maxilar; sct, sensila celocônica do tórax. **Ecalas:** (A) 100 μ m; (B, F, G) 10 μ m; (C, D, E) 1 μ m.

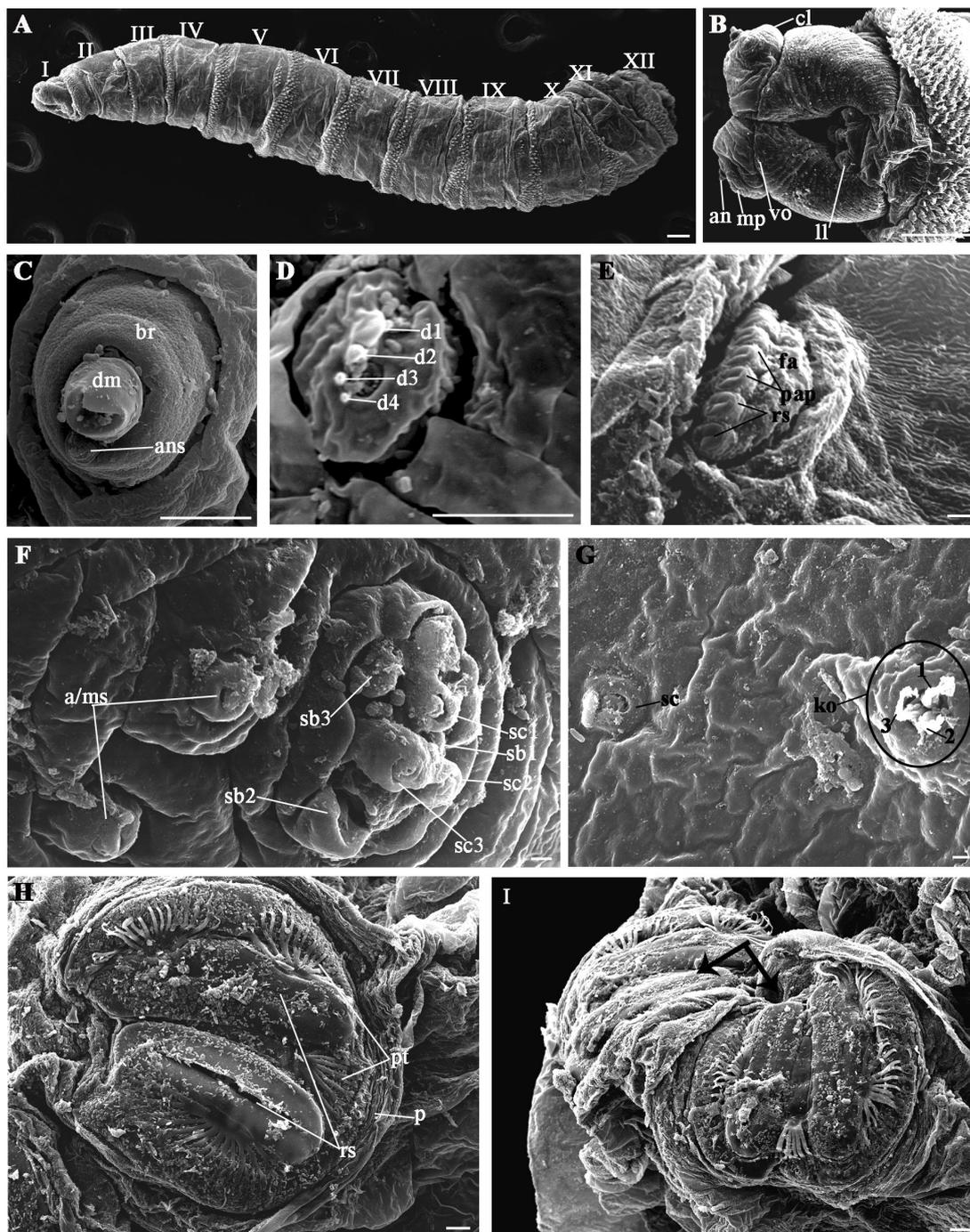


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de segundo instar de *Cochliomyia macellaria*. (A) corpo da larva composto por doze segmentos; (B) região cefálica; (C) antena e detalhe da sensila da antena; (D) detalhe do órgão ventral; (E) espiráculo anterior; (F) detalhe das sensilas do palpo maxilar; (G) detalhe do órgão de Keilin com três sensilas e da sensilas celocônicas; (H) detalhe do espiráculo posterior; (I) par de espiráculos, posterior (setas). **Abreviaturas:** I-XII, segmentos do corpo; an, antena; ans, sensila da antena; a/ms, sensila da antena ou mandíbula; br, anel basal; cl, lobo cefálico; d1-4, pequenos dígitos do órgão ventral; dm, domo da antena; fa, estrutura em forma de leque; ko, órgão de Keilin com três sensilas (1-3); ll, lobo labial; mp, palpo maxilar; p, peritrema; pap, papila; pt, tufo peristigmático; rs, fenda respiratória; sb1-3, sensila basicônica do palpo maxilar; sc, sensila celocônica; sc1-3, sensila celocônica do palpo maxilar; vo, órgão ventral. **Ecalas:** (A, B) 100 μ m; (C, D, E, H, I) 10 μ m; (F, G) 1 μ m.

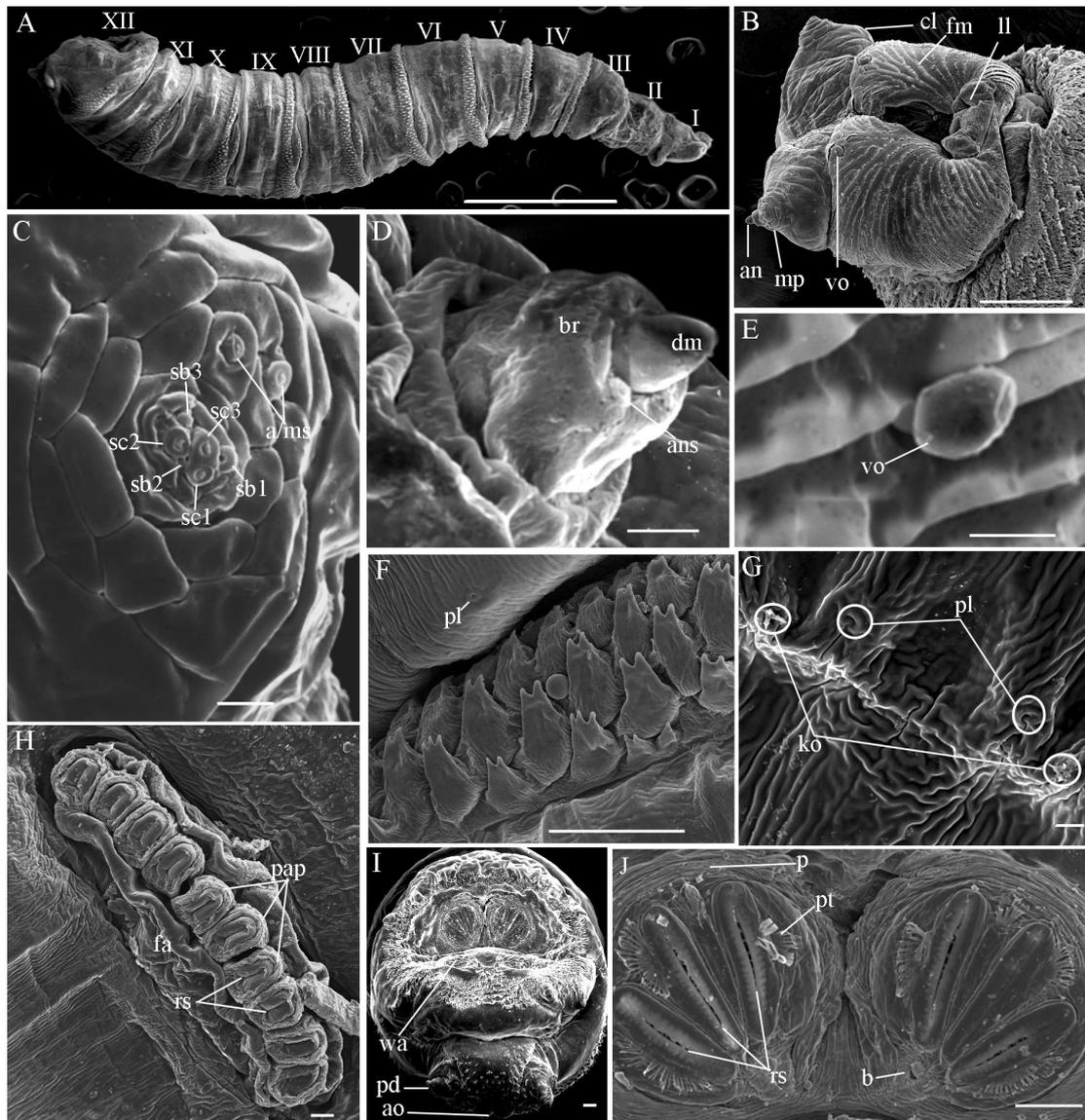


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de terceiro instar de *Cochliomyia macellaria*. (A) corpo da larva composto por doze segmentos; (B) região cefálica; (C) detalhe da sensila do palpo maxilar; (D) detalhe da antena e da sensila da antena; (E) detalhe do órgão ventral; (F) detalhe dos espinhos do tórax; (G) detalhe do órgão de Keilin com três sensilas e das sensilas placodea; (H) detalhe do espiráculo anterior; (I) vista posterior da larva; (J) detalhe do espiráculo posterior. **Abreviaturas:** I-XII, segmentos do corpo; an, antena; ans, sensila da antena; a/ms, sensila da antena ou mandíbula; ao, abertura anal; b, botão espiracular; br, anel basal; cl, lobo cefálico; dm, domo da antena; fa, estrutura em forma de leque; fm, máscara facial; ko, órgão de Keilin; ll, lobo labial; mp, palpo maxilar; p, peritrema; pd, tubérculo anal; pl, sensilas placodea; pap, papila; pt, tufo peristigmático; rs, fenda respiratória; sb1-3, sensila basicônica do palpo maxilar; sc1-3, sensila celocônica do palpo maxilar; vo, órgão ventral; wa, área enrugada. **Ecalas:** (A) 1 mm; (B, F, I, J) 100 μ m; (C, D, E, G, H) 10 μ m.

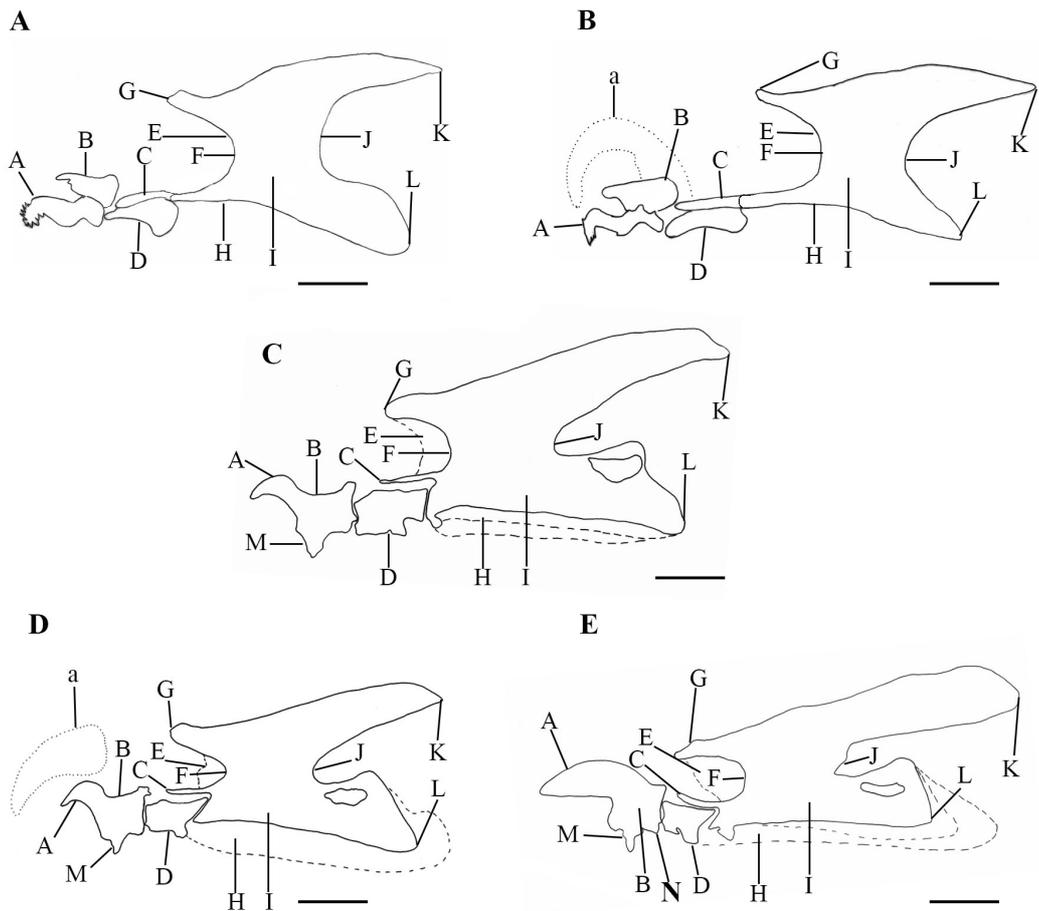


Figura 4. Esqueleto cefalofaríngeo de *Cochliomyia macellaria*, vista lateral. **(A)** Larva em Primeiro instar; **(B)** Farado 1^o/2^o instar; **(C)** Larva em segundo instar; **(D)** Farado 2^o/3^o instar; **(E)** Larva em terceiro instar. **Abreviaturas:** A, maxila; B, mandíbula; C, esclerito hipostomal; D, esclerito hipofaríngeo; E, depressão ocular; F, clipeo; G, arco clipeal; H, esclerito infrafaríngeo; I, esclerito faríngeo; J, incisão média; K, corno dorsal; L, corno ventral; M, esclerito dental; N, esclerito labial; a, maxila e mandíbula em formação. **Escala:** (A, B) 50 μ m; (C, D) 100 μ m; (E) 200 μ m.

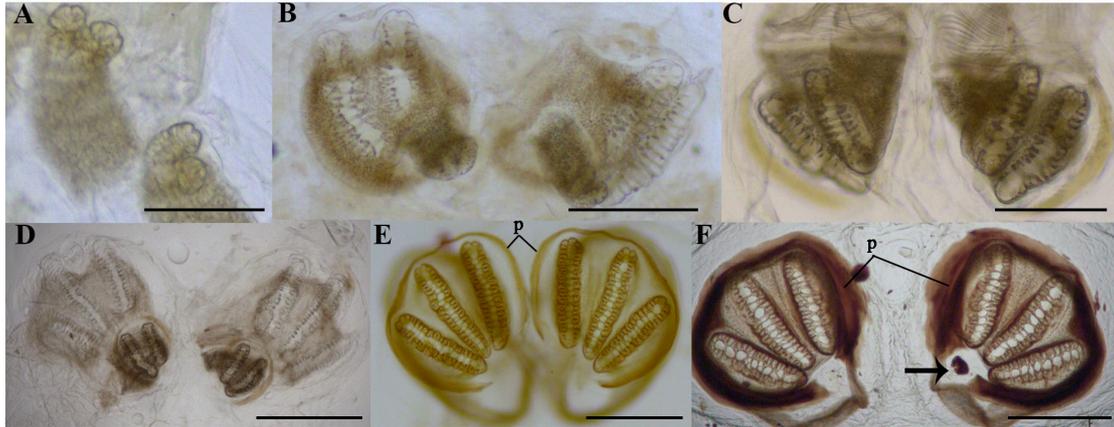


Figura 5. Espiráculo respiratório posterior de *Cochliomyia macellaria*. (A) larva em primeiro instar; (B) farado 1^o/2^o instar; (C) segundo instar; (D) farado 2^o/3^o instar; (E) terceiro instar, peritrema (p) delgado; (F) terceiro instar, peritrema (p) grosso e presença do botão espiracular (seta). **Escala:** (A) 50 μ m; (B, C) 100 μ m; (D, E, F) 200 μ m.



Figure 6. Sequência morfológica do desenvolvimento intra-pupal de *Cochliomyia macellaria*. (A) vista ventral e (B) vista dorsal da pupa criptocefálica; (C) vista ventral da pupa fanerocefálica; (D, E) vista dorsal e (F) vista ventral do adulto farado; (G) vista dorsal do adulto formado, sequencia de pigmentação dos pelos, cerdas e estruturas do corpo; (H) vista ventral do adulto formado e formação do saco ptilineal em vista dorsa. **Abreviaturas:** setas, espiráculo anterior da pupa (asp) **Escalas:** 1 mm.

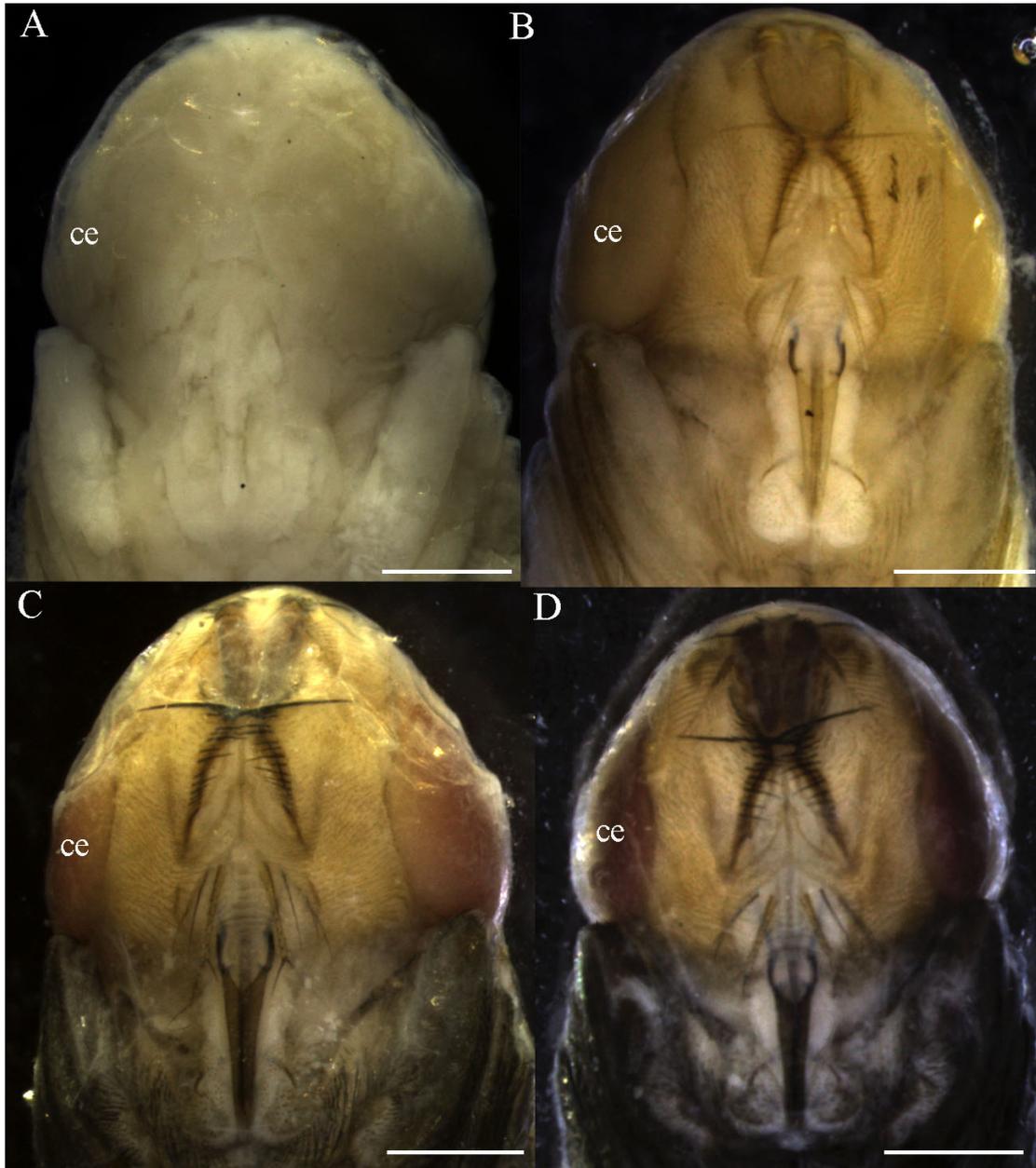


Figura 7. Sequencia de maturação do adulto farado de *Cochliomyia macellaria*, de acordo com a coloração dos olhos compostos. (A) olhos transparentes; (B) olhos amarelos; (C) olhos rosa; (D) olhos vermelhos. **Abreviaturas:** ce, olhos compostos. **Escala:** (A) 0,5 mm; (B, C, D) 1 mm.

ESTÁGIOS IMATUROS DE *LUCILIA CUPRINA* (WIEDEMANN) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): ULTRAESTRUTURA E TEMPO DE DESENVOLVIMENTO

Karine Brenda Barros-Cordeiro^{a,b}, Khesller Patrícia Olazia Name^c,
José Roberto Pujol-Luz^a, Sônia Nair Báb^b

^a Núcleo de Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF. E-mail: Karine.brenda22@gmail.com

^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70.910-900, Brasília, DF.

^c Universidade Paulista, UNIP.

Manuscrito a ser submetido em língua inglesa para publicação à Acta Tropica

1.Introdução

Os califorídeos são na sua maioria sarcosaprófagos, ou seja, podem se alimentar de uma grande variedade de substratos formados de matéria orgânica animal e ou vegetal (Teskey, 1976; Skevington & Dang, 2002). Representantes dessa família podem ser encontrados ocupando diferentes habitats, como fezes, depósitos de lixo urbano, fossas sépticas e carcaças de animais em decomposição (Greenberg, 1971; Queiroz & Carvalho, 1987). Devido seu comportamento alimentar e de habitat, espécies dessa família apresentam interesse para diferentes áreas do conhecimento, como as ciências forense, que se utilizam de informações da morfologia e do ciclo de vida dessas moscas, para auxiliar na estimativa de intervalo de morte (Greenberg & Kunich, 2002; Pujol-Luz *et al.*, 2008).

Para tanto, é necessário fazer a identificação das larvas, o que é difícil tanto pelas espécies serem semelhantes morfologicamente como pela falta de informação detalhada dos estágios imaturos. Atualmente, as descrições morfológicas têm sido feitas com base na microscopia eletrônica de varredura (MEV), entretanto as descrições ou priorizam um dos estágios de desenvolvimento do imaturo ou descrevem superficialmente as espécies (*e.g.* Sukontason, *et al.*, 2003, 2005; Mendonça *et al.*, 2010, 2013; Szpila & Villet, 2011; Szpila *et al.*, 2012;). Poucos trabalhos descreveram a morfologia de todos os estágios imaturos e o tempo de desenvolvimento (*eg.* Queiroz *et al.*, 1997; Barros-Cordeiro & Pujol-Luz, 2010; Ubero-Pascal *et al.*, 2012).

O gênero *Lucilia* Robineau-Desvoidy 1830, possui 17 espécies conhecidas na região Neotropical (Kosmann *et al.*, 2013), entre elas, *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830). Esta é uma espécie invasora com larga distribuição mundial, comumente encontrada em ambiente urbano e florestado no Brasil. É uma espécie de interesse para a entomologia forense e já foi registrada colonizando cadáveres e carcaças de animais nos estágios iniciais da decomposição (Byrd & Castner, 2001; Andrade *et al.*, 2005; Biavati *et al.* 2010). Também possui importância médico-sanitária e na saúde pública por ser potencial vetor de patógenos e por causar miíases em humanos e outros animais (Greenberg 1971, 1973; Lukin, 1989; Guimarães & Papavero, 1999; Maldonado & Centeno, 2003).

Do ponto de vista sócio-econômico, essa espécie é uma das principais causadoras de miíase primária em ovinos na Austrália e na Nova Zelândia, sendo responsável pela perda de milhões de dólares anuais pela indústria da lã e da carne (Sackett *et al.*, 2006; Wall, 2012). No Brasil, a espécie foi registrada como causadora de miíase secundária em ovinos (Moreira-Lima & Moya-Borja, 1997). Assim, o estudo da bionomia dessa espécie pode auxiliar também para seu controle em regiões onde causa grandes prejuízos (Foster *et al.*, 1985; Concha *et al.*, 2011

Até o presente não há descrições de estruturas das larvas dessa espécie utilizando o MEV. Além disso, as informações morfológicas existentes com base em microscopia de luz são insuficientes ou priorizam um único instar do estágio larval (*e.g.* Zumpt, 1965; Ishijima 1967; Greenberg & Sziska, 1984; Szpila & Villet, 2011).

Este trabalho se propôs redescrever e descrever as formas imaturas de *L. cuprina*, utilizando a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura, acompanhando as mudanças morfológicas e a cronologia dos eventos sofridos ao longo do desenvolvimento pós-embrionário e do desenvolvimento intra-pupal desde a oviposição até a emergência do adulto.

2. Materiais e Métodos

2.1. Montagem e manutenção de colônia

Para a manutenção das colônias foi oferecido às moscas adultas proteína animal em decomposição. Os ovos adquiridos forão removidos para placas de Petri, forrada com papel filtro e umedecido com água destilada, incubados sob condições controladas a fim de ser observada à hora da eclosão das larvas. Após a eclosão as larvas forão colocadas em recipientes contendo carne moída bovina (1 larva/g de dieta), posteriormente forão acondicionadas em câmara climatizada (BOD) regulada para $23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR. e 12 horas de fotofase. Os adultos que emergiram no laboratório forão mantido em gaiolas (150 pares/ gaiola) e oferecido dieta composta por água filtrada, leite em pó e levedo de cerveja e algodão embebido em água filtrada. Uma semana após as emergências foi oferecido carne bovina em decomposição (24 horas) para estimular o desenvolvimento das células germinativas e para aquisição dos ovos. As larvas foram colocadas em dieta artificial composta por: rúmen, leite em pó, agar, levedo de cerveja, água destilada, nipagin e caseína (Estrada *et al.*, 2009).

2.2. Obtenção e fixação das amostras para estudo

O experimento foi mantido em câmara climatizada (BOD) regulada para $23,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 12 horas (L:D). Dez larvas foram fixadas a intervalos de duas horas, desde o momento da eclosão (hora zero) até à 92^a hora ($n = 470$), e a cada 12 horas até o início da pupariação ($n = 30$). As larvas foram fixadas em água aquecida à 80°C e posteriormente preservadas em etanol 70%. Todas as larvas, fixadas após 24 horas da eclosão, foram pesadas, digitalizadas e medidas, da capsula cefálica ao tubérculo anal, com auxílio do software imageJ[®]. O método de fixação e estudo adotado para as pupas foi adaptado de Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012) (adaptação no intervalo de fixação das amostras). Após o processo de pupariação, foram fixadas dez pupas a cada intervalo de três horas, nas primeiras 48 horas ($n = 170$) e posteriormente dez pupas a cada intervalo de seis horas, até as primeiras emergências ($n = 270$). As pupas foram fixadas em solução de Carnoy por 48 horas, depois colocadas em solução de ácido fórmico a 5% por 48 horas e em seguida mantidas e preservadas em etanol 70%.

2.3. Preparo de amostras para Microscopia de Luz

Amostras de larvas dos três instares foram diafanizadas em ácido láctico dissecadas e montadas em lâminas com Entellan[®]. As pupas foram dissecadas e mantidas em álcool 70%. Pupas de três e seis horas ($n = 20$) foram incluídas em parafina. Posteriormente cortes de 5 e 10 μm foram corados com hematoxilina de Harris e eosina ou com tricromo Mallory-Pantin. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio ótico Leica DM 2000 estereomicroscópio Leica M 205C.

2.4. Preparo de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

Larvas dos três instares foram fixadas em solução de Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 3% sacarose 5 mM CaCl_2 tamponado em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por 24 horas. As amostras foram removidas do tampão e imersas em tetroxido de ósmio por uma hora; lavadas em água destilada, desidratadas em diferentes concentrações de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%)

por 3 minutos em cada concentração. O material foi submetido ao processo de secagem ao ponto crítico com CO₂, montadas em *stubs*, metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 7001 F.

2.5. Terminologia

A terminologia usada para descrever a morfologia dos instares larvais foi adaptada de Imms (1957), McAlpine *et al* (1981) e Ubero-Pascal *et al* (2012). E a terminologia adotada para descrever a morfologia do pupario e as fases do desenvolvimento intra-pupal segue as de Fraenkel & Bhaskaran (1973), Costa *et al* (2006), Cepeda-Palacios & Sholl (2000), Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012).

3. Resultados

Larvas dos três instares apresentaram 12 segmentos: região cefálica (lobo cefálico), três segmentos torácicos (do II ao IV segmento) e oito segmentos abdominais (do V ao XII segmento) (Figs. 1A, 2A e 3A). O último segmento abdominal é conhecido como segmento anal.

3.1 Primeiro instar larval (L1)

Comprimento médio de $1,9 \pm 0,4$ mm (Tabela II, IV), os segmentos do corpo são separados por fileiras (grupos) de espinhos de uma ponta e de forma e tamanho variável (Fig. 1L). Do II ao VI segmento a volta de espinhos é completa, nos segmentos seguintes a volta de espinhos é incompleta, atinge 2/3 no VII ao VIII segmento, 1/3 no IX e X segmento e 2/3 do XI segmento. O lobo cefálico apresenta um par de antenas dispostas dorsalmente aos palpos maxilares e antero-lateralmente ao corpo (Fig. 1B). A antena é composta por duas estruturas, um anel basal e um domo apical; entre as duas estruturas da antena observa-se uma pequena sensila (Figs. 1C-D). Foi observado um par de palpos maxilares, formados por um conjunto de sensilas basicônica e celocônica, dispostas de forma intercalar na região central do palpo maxilar (Fig. 1F). Próximo ao conjunto de sensilas observa-se duas sensilas acessórias (antenal ou mandibular) (Fig. 1E). Na porção inferior da região pseudocefálica observa-se a crista oral (= máscara facial) o órgão ventral, com três

sensilas localizadas no meio de uma papila (Fig. 1K), e o lobo labial. Foram observados dentes suprabuciais e esqueleto cefalofaríngeo, pouco pigmentado e esclerotizado, na região do arco dorsal e nas porções distais do corno dorsal e ventral. A maxila é composta por um par de peças simétricas, articuladas na base, apresentando na extremidade um par de dentes pontiagudos, orientado em direção ventral (Fig. 4A). A mandíbula é larga e tão esclerotizada e pigmentada quanto à maxila, a mesma é formada por um par de peças simétricas e ápice pontiagudo. O esclerito dental é fusionado com a maxila e o esclerito hipostomal aparece soldado ao hipofaríngeo. O esclerito hipofaríngeo é o mais pigmentado e esclerotizado da região intermediária, com prolongamento lateral que corresponde à trave mediana, apresenta uma forma de H em vista dorsal ou ventral. O esclerito infrafaríngeo é unido ao ramo ventral, pouco visível, formando os canais da face ventral da luz faríngrana. Já o esclerito faríngeo é esclerotizado e apresenta maior grau de pigmentação na região interna, sendo menos pigmentado nas bordas e ápices. A faringe e o arco clipeal são completos. Os cornos dorsal e ventral apresentaram aproximadamente o mesmo tamanho (Fig. 4A). O primeiro segmento torácico apresenta um átrio espiracular simples, perpendicular ao eixo do corpo, na posição dorso-lateral e próximo ao final do segmento (Fig. 1G). Observa-se um par de órgãos de Keilin na porção média do segmento torácico, e de cada fenda do órgão saem três sensilas (Figs. 1H-I). Foram observadas papilas no último segmento abdominal (= tubérculos), sendo três pares de tubérculos dorsais, três pares de tubérculos ventrais e um par interno, e de cada tubérculo emerge uma sensila. O espiráculo posterior apresenta duas fendas e peritrema não definido; sendo que a região central circular está associada com quatro tufos peristigmaticos (Figs. 1J e 5A). O tempo mínimo observado de duração do instar foi de 16 horas (Tabela I).

3.2. Farado 1º/2º instar larval

Comprimento médio de $3,1 \pm 0,7$ mm (Tabela II, IV). O corno dorsal e ventral estão em desenvolvimento. Maxila, mandíbula e esclerito hipofaríngeo, aparecem maiores e em desenvolvimento (Fig. 4B). Já se pode observar o espiráculo anterior. Espiráculo posterior do instar seguinte em formação está em formação e apresenta duas aberturas (Fig. 5B). Tempo mínimo para a transição do instar foi de quatro horas (Tabela I).

3.3. Segundo instar larval (L2)

Comprimento médio de $4,9 \pm 0,8$ mm e peso médio de $3,3 \pm 1,2$ mg (Tabela II-V). Segmentos separados por grupos de fileiras de espinhos de diferentes tamanhos e formas, podendo apresentar de uma a três pontas. Do II ao VI segmento a volta de espinhos é completa, nos segmentos seguintes é incompleta, atinge 2/3 da volta no VII, VIII e XI segmento e 1/3 da volta no IX e X segmento. No anel de espinhos, da região ventral do corpo, existem grupamentos de espinhos que formam espaços entre eles. O espaço presente no IV e V segmento divide o anel em uma porção anterior e outra posterior. Nos segmentos seguintes, observa-se dois espaços, que dividem o anel em região anterior, central e posterior. O pseudocefalo com dois lobos cefálicos está localizado em posição latero-dorsal (Fig. 2B). Observa-se uma antena em cada lobo, disposta dorsalmente ao palpo maxilar. A antena é composta por duas estruturas, um anel basal e um domo, de mesmo tamanho e apresenta na parte externa do anel, entre as duas estruturas, uma sensila (Figs. 2C, F). O par de palpos maxilares é formado por um conjunto de sensilas basicônica e celocônica, que estão dispostas de forma intercalar, além de uma par de sensilas acessórias (Fig. 2D). Na região inferior do pseudocéfalo observa-se a crista oral (= máscara facial), o órgão ventral, que é formado por uma protuberância esférica em dobra com pequenos dígitos (Fig. 2G) e o lobo labial. Os dentes suprabucais estão presentes (Fig. 4C). A maxila é fortemente esclerotizada e pigmentada, com a curva pronunciada e o ápice pontiagudo. A mandíbula é fusionada à maxila. O esclerito dental está presente, pouco pigmentado e esclerotizado. O esclerito labial é pouco pronunciado e pigmentado e está fusionado a maxila. Já o esclerito hipostomal é largo, fortemente esclerotizado e pigmentado, possui a forma de uma barra, ligado ao esclerito faringeano, se originando logo abaixo da depressão ocular. A depressão ocular é esclerotizada, pigmentada e pronunciada, se origina logo acima do esclerito hipostomal. O arco clipeal é pouco pigmentado e esclerotizado. O corno dorsal é parcialmente pigmentado e esclerotizado e o corno ventral apresenta extremidade posterior pouco pronunciada, esclerotizado e pigmentado. A incisão média ocorre entre os cornos e é fortemente esclerotizada, pigmentada e muito pronunciada (Fig. 4C). O primeiro segmento torácico apresenta um par de espiráculos (protorácicos), em forma de leque, a extremidade apresenta de cinco a seis papilas lisas que lembram uma ferradura (Figs. 2I e 5F). Na região ventral

do tórax com um par de órgãos de Keilin, de cada fenda saem três sensila (Fig. 2E). Apresenta na região posterior do último segmento abdominal três pares de papilas (= tubérculos) dorsal, três pares ventrais e um par interno. Um par de espiráculos posterior faz-se presente com peritrema definido, afilado e incompleto (Figs. 2H e 5C). Observa-se em cada espiráculo duas aberturas (rima = fenda), de cada abertura saem dois tufos peristigmáticos (Fig. 2H). O botão espiracular é fracamente visível. O tempo mínimo de duração do instar foi de 20 horas (Tabela I).

3.4. Farado 2º/3º instar larval

Comprimento médio de $7,2 \pm 1,0$ mm e peso médio de $9,0 \pm 2,1$ mg (Tabela II-V). O esqueleto cefalofaríngeo é semelhante ao do segundo instar, mas apresenta a formação da maxila, mandíbula e corno dorsal e ventral, que caracterizam o instar seguinte (Fig. 4D). Observa-se a formação do espiráculo anterior de terceiro instar, este com três aberturas espiraculares (Fig. 5D). O tempo de duração mínima para a transição do instar foi de duas horas (Tabela I).

3.5. Terceiro instar larval (L3)

Comprimento médio de $11,0 \pm 1,5$ mm e peso médio de $26,6 \pm 10,7$ mg (Tabelas II-V). Os segmentos do corpo são separados por fileiras de grupos de espinhos de diferentes tamanhos e formas, podendo apresentar de uma a três pontas, raramente quatro pontas. A volta de espinhos do II ao VII segmento é completa, nos segmentos seguintes é incompleta, atinge 2/3 da volta no VIII segmento e 1/3 nos segmentos IX-XII. Na região ventral, no anel de espinhos, há espaços sem espinhos, caracterizando o grupamento da fileira de espinhos em porção anterior e posterior. A área lateral fusiforme está ausente. Pseudocéfalo é observado com dois lobos cefálicos, em posição latero-dorsal e na região antero-lateral do corpo, com uma antena em cada lobo, disposta dorsalmente ao palpo maxilar (Fig. 3B). A antena é composta por duas estruturas, um anel basal e um domo, na superfície do anel e entre as duas estruturas, observa-se uma sensila menos desenvolvida que nos instares anteriores (Fig. 3D). Os palpos maxilares são diferentes do que se observa nos instares anteriores, o conjunto de sensilas basicônica e celocônica estão cercadas por estruturas lisas e em dobras, semelhante a cristas (Fig. 3C). O par de sensilas acessórias está presente e no meio

das cristas. Observa-se na porção inferior do pseudocéfalo a crista oral (= máscara facial), órgão ventral, em forma lenticular, e o lobo labial. Os dentes suprabucais estão presentes (Fig. 4E). A maxila apresenta-se parcialmente curvada, robusta, fortemente esclerotizada e pigmentada; a região anterior apresenta ápice em ponta e a região posterior aparece mais larga. A mandíbula está fusionada a maxila. O esclerito dental e o labial estão bem constituídos, esclerotizado e pigmentados. Os escleritos hipostomal e o infrafaríngeo estão unidos ao esclerito faríngeo. O esclerito faríngeo e o arco clipeal apresentam-se pigmentados e fortemente esclerotizados. A margem externa do corno dorsal é menos esclerotizada e pigmentada que a região interna, o mesmo ocorre com o corno ventral. O corno dorsal apresenta ápice em ponta e no corno ventral as extremidades são arredondadas. A incisão média é pronunciada, com a curvatura mais fechada que no instar anterior (Fig. 4E). Observa-se no primeiro segmento torácico um par de espiráculos em forma de leque, com a extremidade composta por seis ou sete papilas lisas, onde a forma lembra uma ferradura (Fig. 3F). A região ventral do tórax apresenta um par de órgãos de Keilin, de cada fenda do órgão saem três sensilas (Fig. 3E). A região posterior do último segmento abdominal exhibe papilas (= tubérculos) mais desenvolvidos que nos instares anteriores, sendo três pares dorsais, três pares ventrais e um par interno (Fig. 3H). Observa-se um par de espiráculos posteriores, com peritrema definido e bem demarcado; cada peritrema apresenta três aberturas (rima = fenda), sendo que cada rima está associada a um tufo peristigmático (Figs. 3G e 5E). O botão espiracular é visível. O tempo mínimo de duração do instar foi de 40 horas (Tabela I).

3.6. *Pupariação (pré-pupa)*

Após abandonar a dieta, a larva fica em atividade sobre a vermiculita por algumas horas. Aos poucos ela começa a se enterrar no substrato e a reduzir sua mobilidade. Durante esse processo ocorre a retração dos segmentos; o primeiro segmento sofre invaginação em relação ao segundo segmento. A cutícula progressivamente fica mais esclerotizada e pigmentada (do amarelo escuro ao marrom escuro). O espiráculo posterior entra em colapso e se funde parcialmente com o tubérculo anal. A pupa assume a forma de um barril (Fig. 3I-J). Seu comprimento médio é cerca de 38% menor que o comprimento médio da larva em terceiro instar. O comprimento médio das pupas foi de $7,1 \pm 0,2$ mm e seu peso médio foi de $28,4 \pm 1,7$

mg (Tabelas II-V). O tempo mínimo de duração desse processo foi de 46 horas (Tabela I).

3.7. Apólise Larva-pupa

O pupário foi formado pelo tegumento do último instar larval (L3) (Fig. 3I-J). Em *L. cuprina* a separação das cutículas (Fig. 6) ocorre inicialmente da porção média para as extremidades e da região ventral para a dorsal. As extremidades inicialmente ficam aderidas ao pupário, na região anterior pela maxila e mandíbula e na posterior pelos espiráculos e intestino. O tempo mínimo para que se complete o processo de apólise foi de três horas (Tabela I).

3.8. Pupa criptocefálica

Iniciado logo após a apólise completa (Fig. 6C-D), o pupário “solto” se torna mais pigmentado e esclerotizado. A mandíbula e a maxila se desprendem do restante do esqueleto cefalofaríngeo e ficam aderidas ao pupário. A pupa nesse momento possui forma indefinida e esta envolvida por uma fina membrana (Fig. 7A). Essa fase durou no mínimo nove horas (Tabela I).

3.9. Pupa fanerocefálica

Corresponde ao processo de evaginação da cápsula cefálica e dos apêndices torácicos. Nesse período é possível distinguir cabeça, tórax e abdômen do imago (Figs. 7B-C). O par de espiráculos protorácicos forma uma projeção lateral, em forma de uma trompa cilíndrica, que se liga ao pupário. Esse processo é rápido e dura cerca de três horas (Tabela I).

3.10. Adulto farado

Corresponde a etapa de maturação do adulto e pode ser dividida em quatro fases de acordo com a pigmentação dos olhos compostos (definição adotada por Cepeda-Palacios & Sholl, 2000) (Figs. 7-8): (1) olhos-transparentes: cabeça, tórax e abdômen definidos, pernas e asas não membranosas (Figs. 7D, 8A). Esse período dura no

mínimo nove horas. (2) olhos-amarelos: suturas do tórax e abdômen definidas, a terminália é visível, início da pigmentação de pelos e cerdas (Figs. 7E-F, 8B). Esse período dura no mínimo 129 horas sendo o período mais longo do desenvolvimento. (3) olhos-rosa: maior pigmentação de pelos, cerdas, nervuras das asas e pernas (Fig. 8C). Proboscide e antenas nítidas. Essa etapa dura no mínimo 18 horas. (4) olhos-vermelhos: corpo completamente formado, antenas, palpos e ocelos bem definidos; asas membranosas e veias enegrecidas; genitália externa visível; escleritos definidos e delimitados; saco pitilíneo formado (Figs. 7G-H, 8D). Esse período durou 36 horas (Tabela I).

Seguindo a mudança da coloração dos olhos compostos, as estruturas do corpo gradualmente ficaram pigmentadas e esclerotizadas.

4. Discussão

Larvas de *L. cuprina* são facilmente confundidas com larvas de *Lucilia sericata* (Meigen), principalmente nos dois primeiros instares. Em nossas amostras, larvas de primeiro instar, apresentam espinhos de ponta única e nos instares seguintes variam entre duas e três pontas, podendo chegar a quatro no terceiro instar. Portanto, diverge do que foi observado por Greenberg & Sziska (1984), segundo os autores, a morfologia dos espinhos é a mesma em todos os instares, provavelmente houve uma falha na observação dos espinhos segundo a variação morfológica do instar larval. De acordo com Zumpt (1965), larvas de *L. sericata* podem ser diferenciadas das larvas de *L. cuprina* no terceiro instar pela volta de espinhos, que é completa nos segmentos X e XI para *L. cuprina* e incompleta para *L. sericata*. Para Ishijima (1967) a volta de espinhos de *L. cuprina* só é completa de II ao X segmento, em nossas amostras a volta de espinhos só é completa do I ao VII segmentos. E essa distribuição é diferente entre os instares.

A antena de *L. cuprina* mostra uma redução da área basal com relação a área apical do primeiro para o terceiro instar e a sensila da antena aparentemente, reduziu seu tamanho do primeiro para o terceiro instar larval. Outras espécies de Calliphoridae como *Chrysomya nigripes* Aubertin (não encontrada no Brasil), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (não encontrada no Brasil) também apresentaram diferenças na proporção

das duas estruturas da antena e de sua sensila (Sukontason *et al.*, 2005; Szpila *et al.*, 2012; Ubero-Pascal *et al.*, 2012).

As sensilas dos palpos maxilares de *L. cuprina* exibiram maior complexidade quando comparado os instares larvais, sendo as de primeiro instar as menos complexas. Segundo Courtney *et al.* (2000) as sensilas do palpo podem ter diferentes origens embriológicas. As sensilas e sua complexidade também foi observada para *C. nigripes* e *C. vicina* (Sukontason *et al.*, 2005; Ubero-Pascal *et al.*, 2012). Segundo Ubero-Pascal *et al.* (2012), as sensilas do palpo maxilar podem auxiliar na diferenciação do instar larval e poderiam ser usadas para fins taxonômicos usando a disposição das sensilas em larvas de terceiro instar. Os autores perceberam que essa disposição é diferente para *C. vicina* e *C. nigripes*. A disposição das sensilas, dessas espécies, é diferente do que se observa em *L. cuprina*, mas nada se pode afirmar, pois, não se sabe qual dos lados (direito ou esquerdo) a imagem foi adquirida. Concordamos com Ubero-Pascal *et al.* (2012) e Szpila *et al.* (2012), de que essa estrutura, melhor estudada, pode ser útil para a taxonomia.

No esqueleto cefalofaríngeo, o complexo maxila, mandíbula e esclerito infrafaríngeo são de dimensões menores do que os ilustrados por Greenberg & Szyska (1984), mas é semelhante às ilustrações dos esqueletos de *Lucilia eximia* (Wiedemann) (Greenberg & Szyska, 1984; Florez & Wolff, 2009). No segundo instar a maxila é mais curvada e alongada do que em larvas de *L. eximia* (Greenberg & Szyska, 1984). Em larvas de terceiro instar, as diferenças morfológicas são melhor observadas no esclerito dental e labial, sendo que em *L. cuprina* o esclerito dental de L3 assemelha-se a uma gota, e para *L. eximia* e *L. sericata* a uma virgula. A mandíbula de L1 de *L. cuprina* é semelhante ao que foi apresentado, para esta espécie, por Szpila & Villet (2011), e pode ser diferenciada de *L. sericata* por apresentar uma depressão, inferior, maior e fortemente marcada (Szpila & Villet, 2011). Na parte posterior, dorsal da mandíbula de L3 pode-se observar uma calosidade pontiaguda e pequena já em *L. eximia*, *L. ibis* Shannon (não encontrada no Brasil) e *L. sericata* este calo é maior e robusto (Greenberg & Szyska, 1984; Florez & Wolff, 2009).

Larvas de primeiro instar de Calliphoridae são descritas como sendo metapneusticas, com um par de espiráculos posteriores. Embora em nossas amostras de larvas de *L. cuprina* pudessem ser observados a presença do espiráculo anterior rudimentar (Fig. 1G). Observações semelhantes foram feitas para *Chrysomya megacephala* (Fabricius) *Chrysomya bezziana* (Villeneuve) (não encontrada no Brasil)

e *L. cuprina* (e.g. Kitching, 1976; Sukontason *et al.*, 2005). Kitching (1976) sugeriu que essa estrutura pode desempenhar um papel auxiliar no processo de respiração da L1.

O espiráculo anterior de L2 de *L. cuprina* apresenta de 5 a 6 papilas, já *L. sericata* apresenta de 7 a 8 papilas (Zumpt, 1965). Em L3 o espiráculo anterior de *L. cuprina* apresenta de 6 a 7 papilas, e para *L. eximia* esse número varia de 6 a 8, *L. sericata* de 7 a 10 e de *L. ibis*, de 6 a 8 papilas (Greenberg & Szyska, 1984; Florez & Wolff, 2009).

O tempo mínimo de desenvolvimento de *L. cuprina*, sob temperatura constante (23°C), do momento da oviposição até a emergência da mosca adulta foi de 350 horas (14,6 dias), sendo de 15 horas para o desenvolvimento embrionário, 128 horas (5,4 dias) para o desenvolvimento larval e de 207 horas (8,6 dias) para o desenvolvimento pupal (Tabela I). Em experimento realizado no Perú, sob condições não controladas, em floresta chuvosa e temperatura variando entre $26 \pm 3,1$ e $21,7 \pm 1,9$ °C, o tempo mínimo de incubação dos ovos foi de 12-20 horas, o período larval de 5,54-6,96 dias e o período pupal de 7-8,5 dias, o desenvolvimento completo, da oviposição a emergência da mosca adulta durou 14-15,1 dias (Greenberg & Szyska, 1984).

Já sob condições controladas, em temperatura de 20 e 28°C, o tempo de desenvolvimento larval foi, respectivamente, de 3,75 e 2,5 dias (O'Flynn, 1983); e a 25°C e 27°C o desenvolvimento larval e pupal foi de 5,88 e 9,81 dias 7,84 e 10,57 dias, respectivamente, para cada temperatura e estágio (Paes *et al.*, 2001).

Segundo Day & Wallman (2006), sob condições de temperatura variável de 24 a 28,5°C, o farado (L1/L2) ocorreu no 2º dia, o farado (L2/L3) ocorreu no terceiro dia, e a pupa surge no 6º dia. Nossos resultados são semelhantes aos resultados relatados por esses autores, onde a L2 ocorre no 2º dia da fase larval (40 horas), o farado (L2/L3) ocorre no 2º dia, assim como a L3, da fase larval, a pupa ocorre no 6º dia (128 horas) após a eclosão das larvas.

O desenvolvimento intra-pupal de *L. cuprina* ocorreu de modo semelhante ao que se observou para outras espécies de Diptera (Cyclorrhapha) como *C. albiceps*, *Oestrus ovis* Linneaus, *Sarcophaga bullata* (Parker) (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

A apólise de *L. cuprina*, em nossos resultados a 23°C, ocorreu com 3,4% (3 horas) do tempo de pupa, segundo Barrit & Birt (1971) a 30°C ela ocorreu com 2,8%

(4 horas) do tempo de pupa. Para outras espécies como *C. albiceps*, *Musca domestica* Linneaus e *O. ovis* a apólise ocorreu, respectivamente, com 3,4% (3 horas), 4,2% (4 horas) e 3,4% (18 horas) do tempo de pupa (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

A pupa criptocefálica e fanerocefálica de *L. cuprina* à 23°C ocorreu com 2,8% (6 horas) e 7,2% (15 horas) da fase de pupa, já à 30°C, segundo Barrit & Birt (1971), ela ocorreu com 5,6% (8 horas) e 16,7% (24 horas) da fase de pupa. Os mesmos eventos foram registrados, respectivamente, para *C. albiceps* 6,7% (6 horas) e 10% (9 horas), para *Musca domestica* 6,2-9,4% (6-9 horas) e 16,7-18,7% (16-18 horas), para *S. bullata* 13,6% (36 horas) e 18,2% (48 horas) e para *O. ovis* 9,1% (48 horas) e 22,7% (120 horas) (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Sivasubramanian & Biagi, 1983; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

A pupa farada corresponde ao período de maturação do adulto e é a etapa mais longa da fase de pupa. Em nossas amostras a 23°C essa fase durou, para *L. cuprina*, 91,4% (192 horas), já a 30°C essa fase durou 88,9% (128 horas) (Barrit & Birt, 1983) do tempo de pupa. Em outras espécies como *C. albiceps*, *M. domestica*, *S. bullata* e *O. ovis* essa etapa durou 86,7% (78 horas), 70,8% (68 horas), 45,5% (120 horas) e 68,2% (360 horas), respectivamente (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Sivasubramanian & Biagi, 1983; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

De modo geral, a maioria das espécies permanece por mais de 70%, do tempo da fase de pupa, no processo de maturação, mas como se pode observar com *S. bullata*, esse período durou 45,5% do tempo total. As diferenças podem estar relacionadas à temperatura, a dieta oferecida na fase larval ou a própria metodologia adotada nos trabalhos.

A pupa farada pode ser dividida em quatro eventos segundo a mudança progressiva de coloração dos olhos compostos. Nesse período *L. cuprina* ficou, no mínimo, por 9 horas (4,7%) com olhos transparentes, 129 horas (67,2%) com olhos amarelos, 18 horas (9,4%) com olhos rosa e 36 horas (18,8%) com olhos vermelhos. Outra espécie da mesma família, *C. albiceps* ficou, no mínimo, por 12 horas (15,4%) com olhos transparentes, 39 horas (50%) com olhos amarelos, 6 horas (7,7%) com olhos rosa e 24 horas (30,8%) com olhos vermelhos (Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012).

O estágio larval é o principal período em que o recurso alimentar pode ser limitante. Para que o indivíduo possa completar seu ciclo de desenvolvimento e gerar

adultos viáveis é necessário que no processo de pupariação ele tenha atingido um peso mínimo viável, que é singular para cada espécie. Neste experimento, o ganho de peso das larvas foi progressivo, como pode ser observado na tabela (V), as larvas maduras de *L. cuprina* abandonaram a dieta com peso médio de 38,8 mg. Resultado semelhante foi registrado por Paes *et al.* (2001) com peso de 38,7 mg para a larva madura. Peso muito inferior foi obtido por Gomes & Von Zuben (2004), para *L. cuprina*, suas pupas pesaram em média 18,9 mg; já em nossos resultados as pupas pesaram em média 28,4 mg. Para outras espécies como *C. albiceps* e *C. megacephala* o peso mínimo da larva madura foi de 42 mg e 30-32 mg, respectivamente (Queiroz & Milward-de-Azevedo, 1991; Von Zuben, 1998).

Assim como o peso, o crescimento da larva foi progressivo até o terceiro instar (Tab. IV). Entretanto, houve principalmente nas horas iniciais do estágio larval, uma descontinuidade no ganho de peso e crescimento. Isso, pode estar associado a competição pelo alimento, a larvas menos ativas ou ainda a proximidade do processo de apólise.

Os comprimentos médios de *L. cuprina* foram de 1,9 mm para L1; 3,1 mm para o farado (1º/2º); 4,9 mm para L2; 7,2 mm para o farado (2º/3º); 11,0 mm para L3; 11,6 mm para pré-pupas e 7,1 mm para as pupas. Segundo Ishijima (1967), larvas dessa espécie podem medir até 13 mm, nossos resultados apresentaram larvas maiores, com até 14,5 mm. Norris (1989) mensurou larvas de *L. cuprina* que mediaram 1,65-3,5 mm para L1; de 4,5-7,5 mm para L2 e de 8-16 mm para L3. Já Day & Wallman (2006), obtiveram o comprimento médio de 1,95 mm para L1; 6,02 mm para L2; 5,53 mm para o farado (1º/2º); 11,53 mm pra L3 e 6,68 mm para as pupas.

5. Agradecimentos

A Érica S. Harterreiten-Sousa por auxiliar em diversas etapas do trabalho. Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal e às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAP/DF, FINEP.

6. Referências

- Andrade, H.T.A., Varela-Freire A.A., Batista M.J.A., Medeiros J.F., 2005. Calliphoridae (Diptera) coletados em cadáveres humanos no Rio Grande do Norte. *Neotrop Entomol* 34 (5): 855-856.
- Barritt, L.C. & Birt, L.M., 1971. Development of *Lucilia cuprina*: correlation of biochemical and morphological events. *J Ins Phisiol* 17: 1169-1983.
- Barros-Cordeiro, K.B. & Pujol-Luz, J.R., 2010. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. *Pap Av Zoo* 50 (47): 709-717.
- Biavati, G.M., Santana, F.H.A., Pujol-Luz, J.R., 2010. A checklist of Calliphoridae blowflies (Insecta, Diptera) associated with a pig carrion in Central Brazil. *J Forensic Sci* 55 (6), 1603-1606.
- Byrd, J.H. & Castner, J.L., 2001. Insects of forensic importance, p. 43-79. In: Byrd, J. H. & J.L. Castner (Eds), *Forensic Entomology: The utility of Arthropods in Legal Investigations*, CRC press, Boca Raton, 418p.
- Cepeda- Palacios R. & Scholl, P.J., 2000. Intra-puparial development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *J Med Entomol* 37: 239-245.
- Mendonça, P.M., Santos-Mallet, J.R. & Queiroz, M.M.C., 2010. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance. *Micros Res Tec* 73: 779-784.
- Concha, C., Belikoff, E.J., Brandi-lee C.F.Li., Schiemann, A.H. & Scott, M.J., 2011. Efficient germ-line transformation of the economically important pest species *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae). *Ins Bio Mol Bio* 41: 70-75.
- Costa, C., Ide, S. Simonka, C.E., 2006. *Insetos Imaturos: metamorfose e identificação*. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 249p.
- Courtney, G.W., Sinclair, B.J. & Meier, R., 2000. Morphology and terminology of Diptera larvae, *in*: L. Papp & B. Darvas (Eds.), *Contribution to a Manual of Palaearctic Diptera: General and Applied Dipterology*, vol. 1, Science Herald, Budapest, 85–161p.
- Day, D.M. & Wallman, J.F., 2006. Influence of substrate tissue type on larval growth in *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci* 51 (3): 657-663.

- Estrada, D.A., Grella, M.D., Thyssen, P.J. & Linhares, A.X., 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotrop Entomol* 38 (2): 203-207.
- Florez, E. & Wolff, M., 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales espécies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense em Colombia. *Neotrop Entomol* 38 (3): 418-429.
- Foster, G.G., Vogt, W.G. & Woodburn, T.L., 1985. Genetic analysis of field trials of sex- linked translocation strains for genetic control of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wiedemann). *Aust J Bio Sci* 38: 275-293.
- Fraenkel, G. & Bhaskaran, G., 1973. Pupariation and pupation in cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Ann Entomol Soc Am* 66: 418–422.
- Gomes, L. & Von Zuben, C.J., 2004. Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. *Iheringia* 94 (2): 135-138.
- Greenberg, B., 1971. Flies and disease: ecology, classification and biotic associations. Vol. 1. Princeton University Press, New Jersey, 856 p.
- Greenberg, B. 1973., Flies and disease: biology and disease transmission. Vol. II. Princeton University Press, New Jersey, 447p.
- Greenberg, B. & Szyska, M.L., 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). *Ann Entomol Soc Am* 77:488-517.
- Greenberg, B. & Kunich, J.C., 2002. Entomology and the law: flies as forensic indicators. University press, Cambridge, 306p.
- Guimarães, J.H. & Papavero, N., 1999. Myiasis in man and animals in the neotropical region- bibliographic database. São Paulo: FAPESP and Editora Plêiade.
- Imms, A.D., 1957. A general textbook of entomology. 9a Ed. London: Methuen & CO LTD. 886p.
- Ishijima, H., 1967. Revision of the third stage of synantropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae). *Jap J San Zoo* 18:47-100.
- Kitching, R.L., 1976. On the protoracic spiracles of the first instar larvae of calyprate Cyclorrhapha (Diptera). *J Aust Entomol Soc* 15: 233-235.

- Kosmann, C., Mello, R.P., Harterreiten-Souza, E.S., Pujol-Luz, J.R., 2013. A list of current valid blow fly name (Diptera: Calliphoridae) in the America South of Mexico with key to the Brazilian species. *Entomobrasilis* 6 (1), 74-85.
- Lukin, L.G., 1989. Human cutaneous myiasis in Brisbane: a prospective study. *Med J Australia* 150 (5): 237-240.
- Maldonado, M.A. & Centeno, N., 2003. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Mem I Oswaldo Cruz* 98 (2): 213-216.
- McAlpine, J.F., Peterson, V.B., Shewell, G.E., Teskey, J.H., Vockeroth, J.R., & Wood, D.N., 1981. *Manual of Nearctic Diptera*. Research Branch Agriculture Canada, Monograph, 1. 674p.
- Mendonça, P.M., Santos-Mallet, J.R. & Queiroz, M.M.C., 2010. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance. *Microsc Res Tec* 73: 779-784.
- Mendonça, P.M., Barbosa, R.R., Cortinhas, L.B., Santos-Mallet, J.R., & Queiroz, M.M.C., 2013. Ultrastructure of immature stages of *Peckia* (Euboetcheria) *collusor* (Diptera: Sarcophagidae). *Acta Tropica* 128: 522-527.
- Moreira-Lima, M.A. & Moya-Borja, G.E., 1997. Estudo comparativo de miíases produzidas por *Cocchliomyia hominivorax* (Coquerel, 1959) e *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1930) (Diptera: Calliphoridae) em ovino artificialmente infestados. *Rev Vet* 19: 200-205.
- Norris, K.R., 1989. Human cutaneous myiasis in Brisbane: a prospective study. *Med J Australia* 150: 237-240.
- O'Flynn, M.A., 1983. The succession and rate of development of blowflies in carrion in southern Queensland and application of these data to forensic entomology. *J Australian Entomol Soc* 22: 137-148.
- Paes, M.J., Brito, L.G., Moya-Borja, G.E. & Daemon, E., 2001. Determinação das exigências térmicas para o desenvolvimento pós-embrionário de *Lucilia cuprina* (Wied., 1830) (Diptera: Calliphoridae). *Parasitol al dia* 25 (3-4): 93-99
- Pujol-Luz, J.R., Arantes, L.C. & Constantino, R., 2008. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Rev Bras Entomol* 52(4): 485-492.

- Pujol-Luz, J.R. & Barros-Cordeiro, K.B., 2012. Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 56 (3): 269-272.
- Queiroz, S.M.P. & Carvalho, C.J.B., 1987. Chave pictórica e descrição de larvas de 3o ínstar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em vazadouros de resíduos sólidos domésticos em Curitiba, Paraná. *An Soc Entomol Bras* 16(2): 265-288.
- Queiroz, M.M.C. & Milward-de-Azevedo, E.M.V., 1991. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Rev Bras de Zoo* 8: 75-84.
- 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. *Mem I Oswaldo Cruz* 92: 187-196.
- Sackett, D., Holes, P., Abbott, K., Jephcott, S. & Barber, M., 2006. Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. Final Report of Animal Health and Welfare Project 087, 38-42p. Meat and Livestock Australian LTD.
- Sivasubramanian, P. & Biagi, M., 1983. Scientific note morphology of the pupal stage of the fleshfly, *Sarcophaga bullata* (Parker) (Diptera: Sarcophagidae). In *J Ins Morphol & Embryol* 12 (5/6): 355-359.
- Skevington, J.H. & Dang, P.T., 2002. Exploring the diversity of flies (Diptera). *Biodiversity* 3 (4): 3-27
- Sukontason, K.L., Sukontason, K., Piangjai, S., Boonchu, N., Chaiwong, T., Vogtsberger, R.C., Kuntalue, B., Thijunk, N. & Olson, J.K., 2003. Larval morphology of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) using scanning electron microscopy. *J Vect Eco* 28 (1): 47-52.
- Sukontason, K.L., Vogtsberger, R.C., Boonchu, N., Chaiwong, T., Sripakdee, D., Ngern-Klun, R., Piangjai, S. & Sukontason, K., 2005. Larval morphology of *Chrysomya nigripes* (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance. *J Med Entomol* 42 (3): 233-240.
- Szpila, K. & Villet, M.H., 2011. Morphology and identification of first instars of African blow flies (Diptera: Calliphoridae) commonly of forensic importance. *J Med Soc Am* 48 (4): 738-752.

- Szipla, K., Hall, M.J.R., Sukontason, K.L., & Tantawi, T.I., 2012. Morphology and identification of first instars of the European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part I: Chrysomyinae. *Med Vet Entomol*: 1-13.
- Teskey, H.J., 1976. Diptera larvae associated with trees in North America. *Mem Entomol Soc Can* 100: 1-53.
- Ubero-Pascal, N., López-Esclapez, R. María-Dolores G. & María-Isabel A., 2012. Morphology of preimaginal stages of *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy 1830 (Diptera: Calliphoridae): a comparative study. *For Sci In* 219: 228-243.
- Von Zuben, C., 1998. Comportamento de oviposturas individuais, percentage de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F). *An Soc Entomol Bras* 27 (4): 525-533.
- Wall, R., 2012. Ovine cutaneous myiasis: effect on production and control. *Vet Parasitol* 189: 44-51.
- Zumpt, F., 1965. Myiasis in man and animals in the old world. London, Butterworths, 267p

Tabela I. Tempo de desenvolvimento mínimo de *Lucilia cuprina*, em horas (h), para cada estágio do desenvolvimento a $23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

| Estágio | Evento | Tempo (h) | Média (h) | | DP | Varição (h) | n |
|---------|----------------------|-----------|-----------|---|------|-------------|------|
| Ovo | Embrionário | 15 | 15,75 | ± | 0,83 | (15-17) | 1723 |
| Larva | Larva 1º instar | 16 | 7,7 | ± | 5,2 | (*00-20) | 93 |
| | Farado 1º/ 2º instar | 4 | 19,8 | ± | 2,0 | (16-22) | 25 |
| | Larva 2º instar | 20 | 31,0 | ± | 5,0 | (20-42) | 84 |
| | Farado 2º/ 3º instar | 2 | 41,6 | ± | 1,7 | (40-46) | 14 |
| | Larva 3º instar | 40 | 61,5 | ± | 11,3 | (42-82) | 194 |
| | Pré-pupa | 46 | 92,8 | ± | 10,8 | (82-116) | 80 |
| Pupa | Apólise | 3 | 8,6 | ± | 8,4 | (*00-36) | 45 |
| | Criptocefálica | 9 | 15,5 | ± | 10,4 | (06-39) | 25 |
| | Fanerocefálica | 3 | 32,6 | ± | 11,0 | (15-54) | 38 |
| | transparente | 9 | 33,8 | ± | 14,7 | (18-72) | 24 |
| | amarelo | 129 | 98,9 | ± | 44,0 | (24-192) | 237 |
| | rosa | 18 | 178,2 | ± | 16,0 | (156-204) | 30 |
| | vermelho | 36 | 196,4 | ± | 11,6 | (174-210) | 41 |

Tempo (h): refere-se ao tempo de duração mínima de cada evento. Média (h): refere-se à média de tempo em que ocorre cada evento. DP: Desvio Padrão; Varição (h): intervalo em que ocorre cada evento; n: número de amostras; * início de cada estágio

Tabela II. Comprimento médio em mm das larvas de *Lucilia cuprina*, para cada instar larval e estágio de desenvolvimento.

| Instar | Média (mm) | | DP | Varição (mm) | n |
|---------------------|-------------------|---|-----------|---------------------|----------|
| Larva 1° instar | 1,9 | ± | 0,4 | (0,9-3,1) | 95 |
| Farado 1°/2° instar | 3,1 | ± | 0,7 | (2,0-4,7) | 26 |
| Larva 2° instar | 4,9 | ± | 0,8 | (2,5-6,9) | 84 |
| Farado 2°/3° instar | 7,2 | ± | 1,0 | (6,2-9,5) | 14 |
| Larva 3° instar | 11,0 | ± | 1,5 | (6,3-14,5) | 195 |
| Pré-pupa | 11,6 | ± | 1,5 | (7,8-14,2) | 80 |
| Pupa | 7,1 | ± | 0,2 | (6,8-7,4) | 10 |

DP: Desvio Padrão; Varição: Intervalo de Varição; n: número de amostras.

Tabela III. Peso médio em mg das larvas de *Lucilia cuprina* para cada instar larval e estágio de desenvolvimento.

| Instar | Médias (mg) | | DP | Varição (mg) | n |
|---------------------|--------------------|---|-----------|---------------------|----------|
| Larva 2° instar | 3,3 | ± | 1,2 | (0,7-8,7) | 82 |
| Farado 2°/3° instar | 9,0 | ± | 2,1 | (6,0-12,7) | 14 |
| Larva 3° instar | 26,6 | ± | 10,7 | (5,6-65,0) | 194 |
| Pré-pupa | 38,8 | ± | 9,6 | (20,8-58,8) | 80 |
| Pupa | 28,4 | ± | 1,7 | (25,4-30,8) | 10 |

DP: Desvio Padrão; Varição: Intervalo de Varição; n: número de amostras.

Tabela IV. Comprimento médio em mm das larvas de *Lucilia cuprina* a cada duas horas, desde a hora de eclosão até a formação da pupa.

| Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max |
|------------------------|-------|--------|------|------|------------------------|-------|--------|-------|-------|-------------------------|-------|--------|-------|-------|
| ^a 00 | 1,28 | ± 0,27 | 0,86 | 1,66 | 34 | 5,26 | ± 0,60 | 4,04 | 5,82 | 68 | 11,40 | ± 1,00 | 9,90 | 12,75 |
| 02 | 1,75 | ± 0,08 | 1,62 | 1,89 | 36 | 5,76 | ± 0,58 | 4,89 | 6,74 | 70 | 11,03 | ± 0,65 | 10,33 | 12,35 |
| 04 | 1,71 | ± 0,23 | 1,31 | 2,04 | 38 | 5,52 | ± 0,38 | 4,95 | 6,19 | 72 | 12,42 | ± 0,66 | 10,87 | 13,13 |
| 06 | 1,64 | ± 0,25 | 1,33 | 2,08 | ^d 40 | 7,07 | ± 0,87 | 6,18 | 8,76 | 74 | 12,12 | ± 0,88 | 10,36 | 13,38 |
| 08 | 1,87 | ± 0,23 | 1,50 | 2,20 | ^e 42 | 7,11 | ± 0,79 | 6,29 | 9,48 | 76 | 11,29 | ± 1,00 | 9,62 | 12,68 |
| 10 | 1,68 | ± 0,34 | 1,22 | 2,26 | 44 | 8,28 | ± 0,60 | 7,29 | 9,14 | 78 | 11,73 | ± 0,97 | 10,83 | 13,58 |
| 12 | 2,15 | ± 0,31 | 1,78 | 2,74 | 46 | 8,82 | ± 0,82 | 7,09 | 9,62 | 80 | 12,35 | ± 0,87 | 11,25 | 13,68 |
| 14 | 2,24 | ± 0,14 | 2,10 | 2,59 | 48 | 9,87 | ± 0,45 | 9,15 | 10,69 | ^f 82 | 11,17 | ± 0,94 | 9,94 | 12,28 |
| ^b 16 | 2,57 | ± 0,29 | 2,23 | 3,07 | 50 | 10,75 | ± 0,52 | 9,83 | 11,40 | 84 | 12,51 | ± 0,97 | 11,13 | 14,13 |
| 18 | 2,45 | ± 0,30 | 1,71 | 2,87 | 52 | 10,73 | ± 0,74 | 9,57 | 11,62 | 86 | 12,48 | ± 0,85 | 11,36 | 13,79 |
| ^c 20 | 2,67 | ± 0,29 | 1,97 | 3,03 | 54 | 10,85 | ± 0,69 | 9,77 | 11,62 | 88 | 12,63 | ± 0,67 | 11,40 | 13,64 |
| 22 | 2,64 | ± 0,19 | 2,20 | 2,86 | 56 | 11,00 | ± 0,82 | 9,50 | 12,41 | 90 | 11,79 | ± 1,29 | 10,08 | 14,49 |
| 24 | 3,94 | ± 0,31 | 3,44 | 4,38 | 58 | 11,28 | ± 0,52 | 10,44 | 12,17 | 92 | 12,31 | ± 0,74 | 10,90 | 13,16 |
| 26 | 4,03 | ± 0,40 | 3,35 | 4,73 | 60 | 11,93 | ± 0,40 | 11,09 | 12,57 | 104 | 10,63 | ± 0,74 | 9,88 | 11,85 |
| 28 | 4,60 | ± 0,53 | 3,77 | 5,43 | 62 | 12,60 | ± 0,64 | 11,59 | 13,67 | 116 | 8,50 | ± 0,52 | 7,78 | 9,18 |
| 30 | 4,94 | ± 0,44 | 4,39 | 5,89 | 64 | 12,56 | ± 0,87 | 11,47 | 14,19 | ^g 128 | 7,12 | ± 0,18 | 6,77 | 7,42 |
| 32 | 4,76 | ± 0,44 | 3,91 | 5,27 | 66 | 11,35 | ± 0,98 | 9,54 | 12,10 | | | | | |

DP:Desvio Padrão; Min: comprimento mínimo; Max: comprimento máximo. DP: desvio padrão; Min: menor comprimento; Max: maior comprimento. ^a eclosão das larvas (L1); ^b visualizada o primeiro farado 1^o/2^o instar; ^c visualizada a larva de 2^o instar; ^d visualizada o primeiro farado de 2^o/3^o instar; ^e visualizada a primeira larva de 3^o instar; ^f pré-pupas; ^g pupas.

Tabela V. Peso médio em mg das larvas de *Lucilia cuprina* a cada duas horas, desde a 24^a hora de eclosão até a formação da pupa.

| Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max | Hora | Média | DP | Min | Max |
|------------------------|-------|--------|------|------|-----------|-------|--------|------|------|-------------------------|-------|--------|------|------|
| ^a 24 | 1,4 | ± 0,37 | 0,7 | 2,0 | 50 | 23,4 | ± 3,6 | 18,0 | 29,9 | 76 | 27,9 | ± 7,9 | 19,0 | 41,3 |
| 26 | 2,7 | ± 0,44 | 1,6 | 3,1 | 52 | 22,6 | ± 2,3 | 19,5 | 25,5 | 78 | 28,2 | ± 5,9 | 20,7 | 37,5 |
| 28 | 3,2 | ± 0,38 | 2,7 | 4,0 | 54 | 26,0 | ± 8,2 | 14,0 | 42,3 | 80 | 39,2 | ± 7,9 | 29,3 | 52,1 |
| 30 | 3,5 | ± 0,49 | 3,1 | 4,5 | 56 | 21,1 | ± 3,8 | 15,1 | 28,0 | ^d 82 | 33,1 | ± 6,0 | 25,0 | 41,3 |
| 32 | 2,9 | ± 0,43 | 1,9 | 3,4 | 58 | 29,1 | ± 6,9 | 22,0 | 46,5 | 84 | 44,0 | ± 10,0 | 30,8 | 58,8 |
| 34 | 3,6 | ± 0,75 | 1,9 | 4,3 | 60 | 31,8 | ± 4,2 | 25,3 | 37,1 | 86 | 44,4 | ± 8,3 | 35,1 | 56,5 |
| 36 | 4,2 | ± 0,87 | 2,9 | 5,5 | 62 | 41,4 | ± 12,9 | 24,2 | 64,8 | 88 | 45,4 | ± 6,0 | 36,2 | 55,6 |
| 38 | 4,1 | ± 0,68 | 2,8 | 4,9 | 64 | 39,9 | ± 14,4 | 25,6 | 65,0 | 90 | 39,4 | ± 9,0 | 26,4 | 53,0 |
| ^b 40 | 7,9 | ± 1,76 | 5,6 | 10,8 | 66 | 25,6 | ± 6,5 | 14,1 | 35,0 | 92 | 44,4 | ± 9,1 | 27,4 | 55,8 |
| ^c 42 | 7,6 | ± 1,97 | 5,1 | 11,3 | 68 | 27,0 | ± 6,5 | 18,4 | 36,6 | 104 | 34,5 | ± 5,2 | 27,6 | 44,6 |
| 44 | 11,5 | ± 2,17 | 7,7 | 14,5 | 70 | 25,6 | ± 5,7 | 19,7 | 34,9 | 116 | 24,8 | ± 2,8 | 20,8 | 29,8 |
| 46 | 13,9 | ± 2,41 | 9,6 | 17,2 | 72 | 31,6 | ± 9,2 | 17,2 | 41,5 | ^e 128 | 28,4 | ± 1,7 | 25,4 | 30,8 |
| 48 | 16,8 | ± 2,0 | 13,8 | 20,4 | 74 | 33,2 | ± 9,7 | 21,7 | 51,2 | | | | | |

DP: desvio padrão; Min: peso mínimo; Max: peso máximo. ^a larva de 2^o instar; ^b visualizada o primeiro farado de 2^o/3^o instar; ^c visualizada a primeira larva de 3^o instar; ^d pré-pupas; ^e pupas.

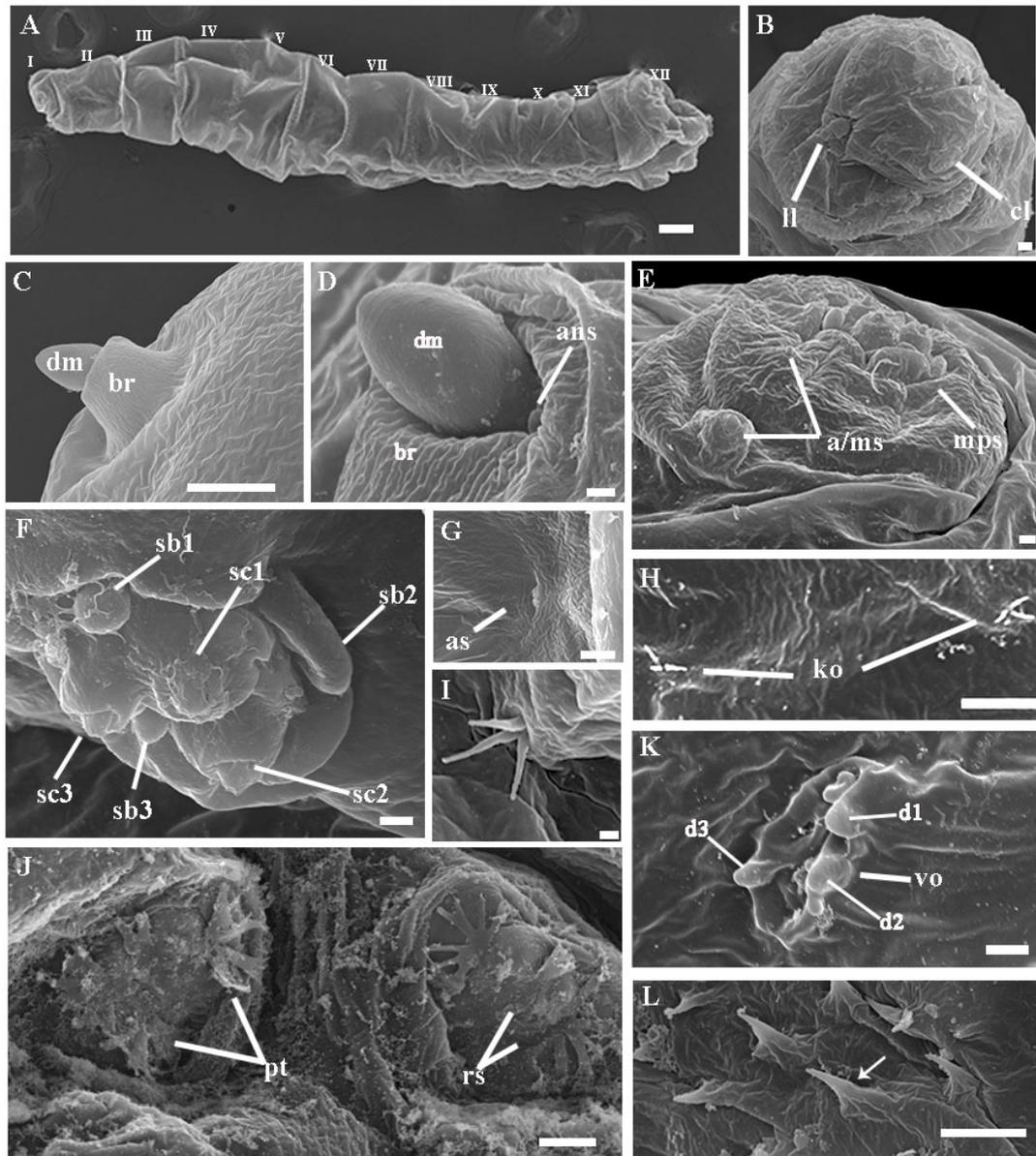


Figura 1. Microscopia Eletrônica de Varredura de larvas em primeiro instar de *Lucilia cuprina*. (A) corpo da larva composto por doze segmentos; (B) região cefálica; (C) antena; (D) detalhe da sensila da antena; (E) palpo maxilar; (F) detalhe das sensilas do palpo maxilar; (G) posição relativa do espiráculo anterior do primeiro segmento torácico; (H) órgão de Keilin; (I) detalhe do órgão de Keilin com as três sensilas; (J) detalhe do espiráculo posterior; (K) detalhe do órgão ventral; (L) detalhe dos espinhos (seta). **Abreviaturas:** I-XII, segmento do corpo; ans, sensila da antena; a/ms, sensila antenal ou mandibular; as, espiráculo anterior; br, anel basal; cl, lobo cefálico; d1-3, pequenos dígitos do órgão ventral; dm, domo da antena; ko, órgão de Keilin; ll, lobo labial; mps, sensila do palpo maxilar; pt, tufo peristigmático; rs, fenda respiratória; sb1-3, sensila basicônicas do palpo maxilar; sc1-3, sensila celocônica do palpo maxilar; vo, órgão ventral. **Escala:** (A) 100µm; (B, C, G, H, J, L) 10 µm; (D, E, F, I, K) 1 µm.

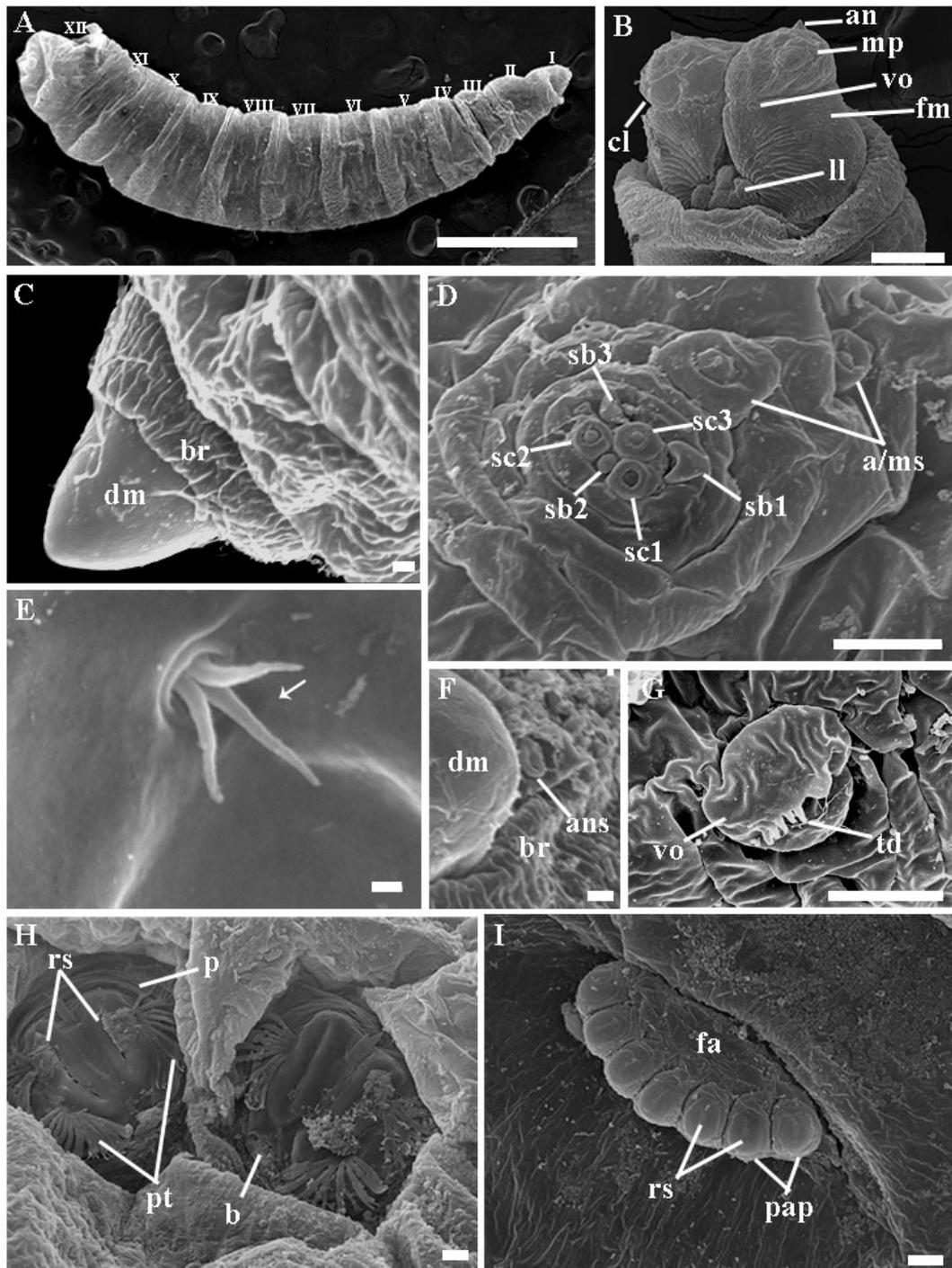


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de larvas em segundo instar de *Lucilia cuprina*. (A) corpo da larva composto por doze segmentos; (B) região cefálica; (C) antena; (D) detalhe da sensila do palpo maxilar; (E) detalhe do órgão de Keilin com três sensilas (seta); (F) detalhe da sensila da antena; (G) detalhe do órgão ventral; (H) detalhe do espiráculo posterior; (I) detalhe do espiráculo anterior. **Abreviaturas:** I-XII, segmentos do corpo; an, antena; ans, sensila da antena; a/ms, sensila da antena ou mandíbula; b, botão espiracular; br, anel basal; cl, lobo cefálico; dm, domo da antena; fa, estrutura em forma de leque; fm, máscara facial; ll, lobo labial; mp, palpo maxilar; p, peritrema; pap, papila; pt, tufo peristigmático; rs, fenda respiratória; sb1-3, sensila basicônicas do palpo maxilar; sc1-3, sensila celocônica do palpo maxilar; td, pequenos dígitos; vo, órgão ventral. **Escala:** (A) 1 mm; (B) 100 μ m; (C, E, F) 1 μ m; (D, G, H, I) 10 μ m.

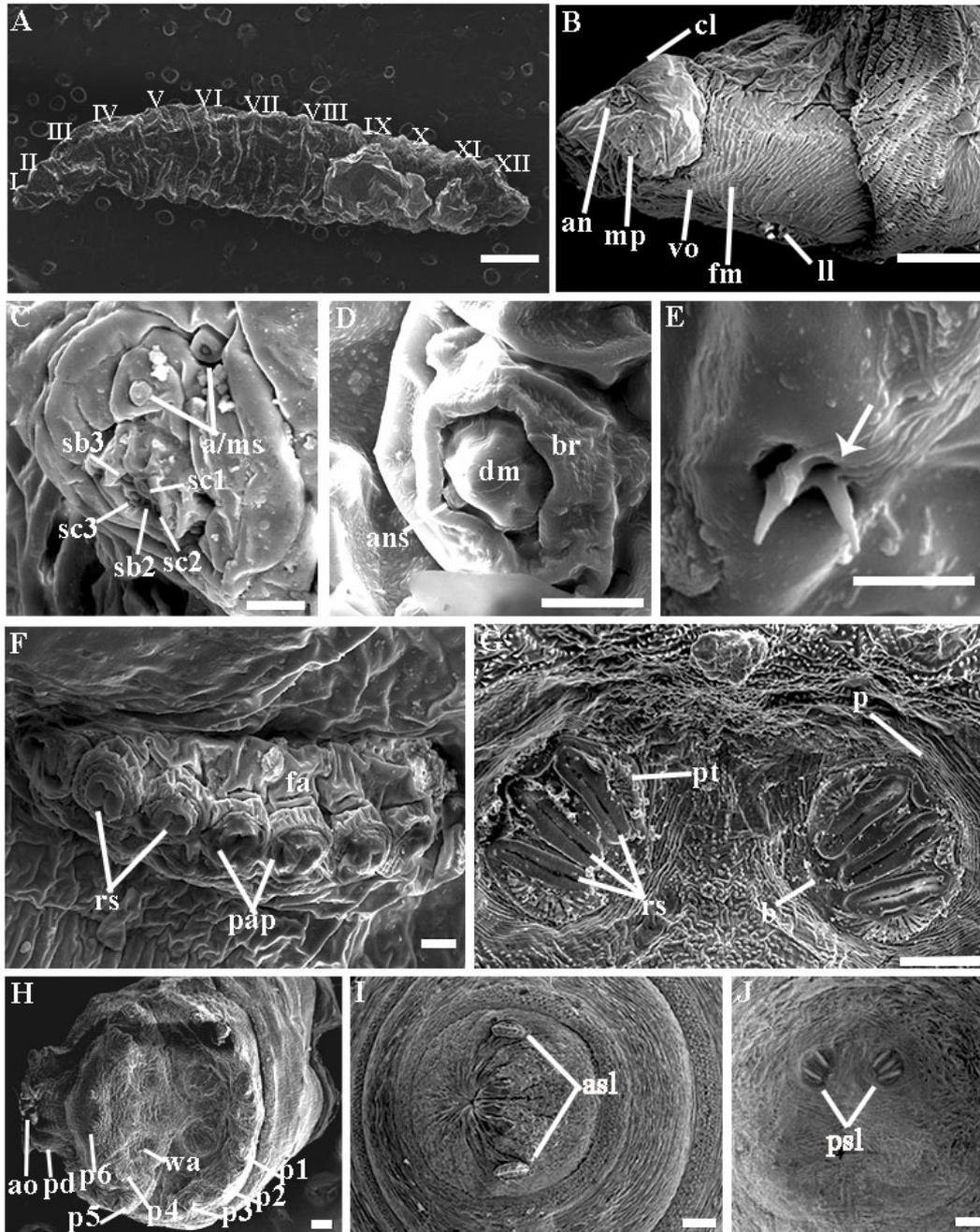


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de larvas de terceiro instar de *Lucilia cuprina*. (A) corpo da larva composto por doze segmentos; (B) região cefálica; (C) detalhe da sensila do palpo maxilar; (D) detalhe da sensila da antena; (E) detalhe do órgão de Keilin com três sensilas (seta); (F) detalhe do espiráculo anterior; (G) detalhe do espiráculo posterior; (H) vista posterior da larva; (I) vista anterior do pupário, pseudocéfalo do primeiro segmento torácico fusionado com o segundo segmento torácico; (J) vista posterior do pupário. **Abreviaturas:** I-XII, segmentos do corpo; an, antena; ans, sensila da antena; a/ms, sensila da antena ou mandíbula; ao, abertura anal; asl, espiráculo anterior da larva, quitinizado; b, botão espiracular; br, anel basal; cl, lobo cefálico; dm, domo da antena; fa, estrutura em forma de leque; mp, palpo maxilar; p, peritrema; p1-6, papila posterior; pd, tubérculo anal; pap, papila; psl, espiráculo posterior da larva, quitinizado; pt, tufo peristigmático; rs, fenda respiratória; sb2-3, sensila basicônica do palpo maxilar; sc1-3, sensila celocônica do palpo maxilar; vo, órgão ventral; wa, área enrugada. **Ecalas:** (A) 1 mm; (B, G, H, I, J) 100 µm; (C, D, E, F) 10 µm.

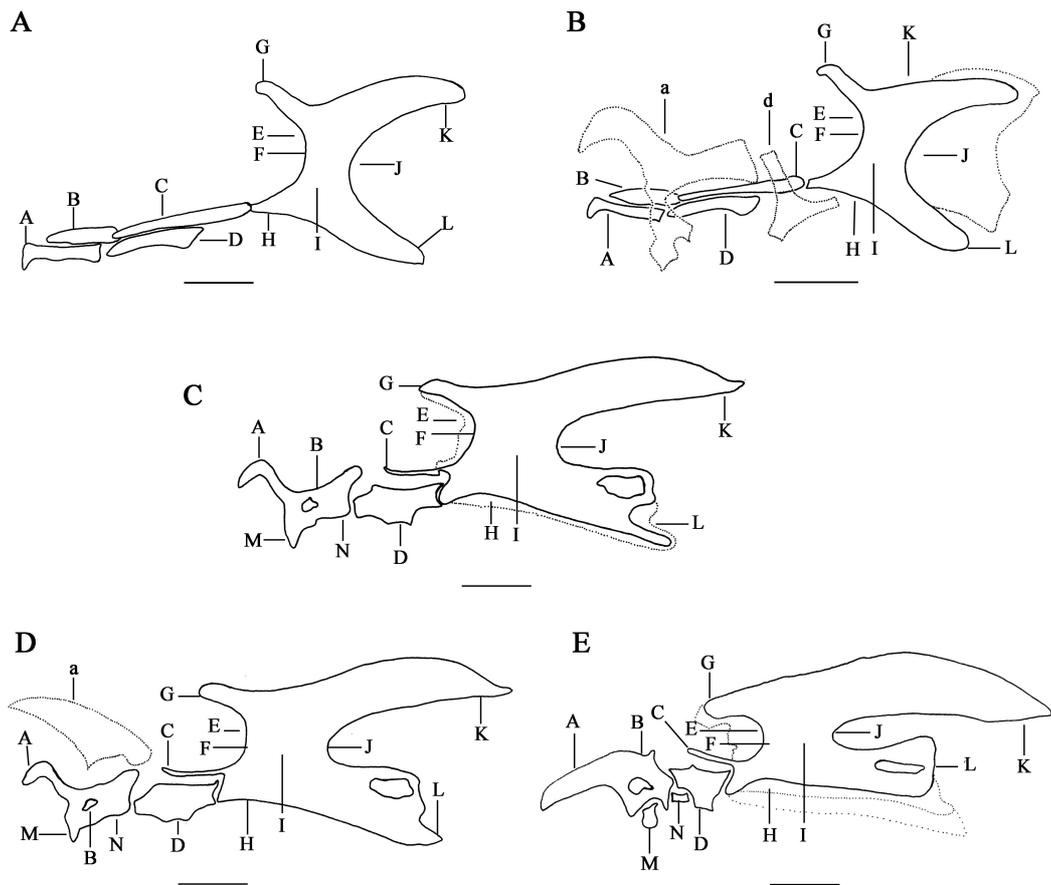


Figura 4. Esqueleto cefalofaríngeo de *Lucilia cuprina*, vista lateral. **(A)** Larva em Primeiro instar; **(B)** Farado 1^o/2^o instar; **(C)** Larva em segundo instar; **(D)** Farado 2^o/3^o instar; **(E)** Larva em terceiro instar. **Abreviaturas:** A, maxila; B, mandíbula; C, esclerito hipostomal; D, esclerito hipofaríngeo; E, depressão ocular; F, clipeo; G, arco clipeal; H, esclerito infrafaríngeo; I, esclerito faríngeo; J, incisão média; K, corno dorsal; L, corno ventral; M, esclerito dental; N, esclerito labial; a, maxila e mandíbula em formação. **Escala:** (A, B) 50 µm; (C, D) 100 µm; (E) 200 µm.

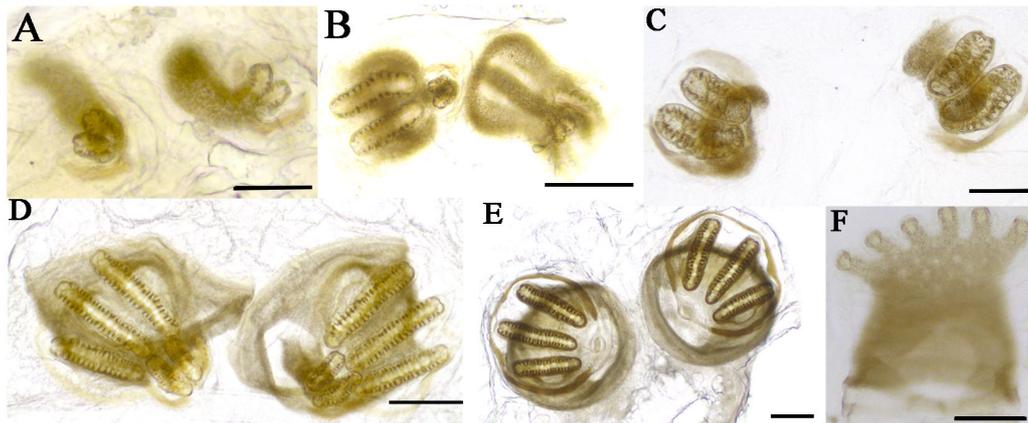


Figura 5. Espiráculo respiratório posterior de *Lucilia cuprina*. (A) larva em primeiro instar; (B) farado 1^o/2^o instar; (C) segundo instar; (D) farado 2^o/3^o instar; (E) terceiro instar; (F) espiráculo anterior do segundo instar. **Escala:** (A, B, C, F) 50 μ m; (D, E) 100 μ m.

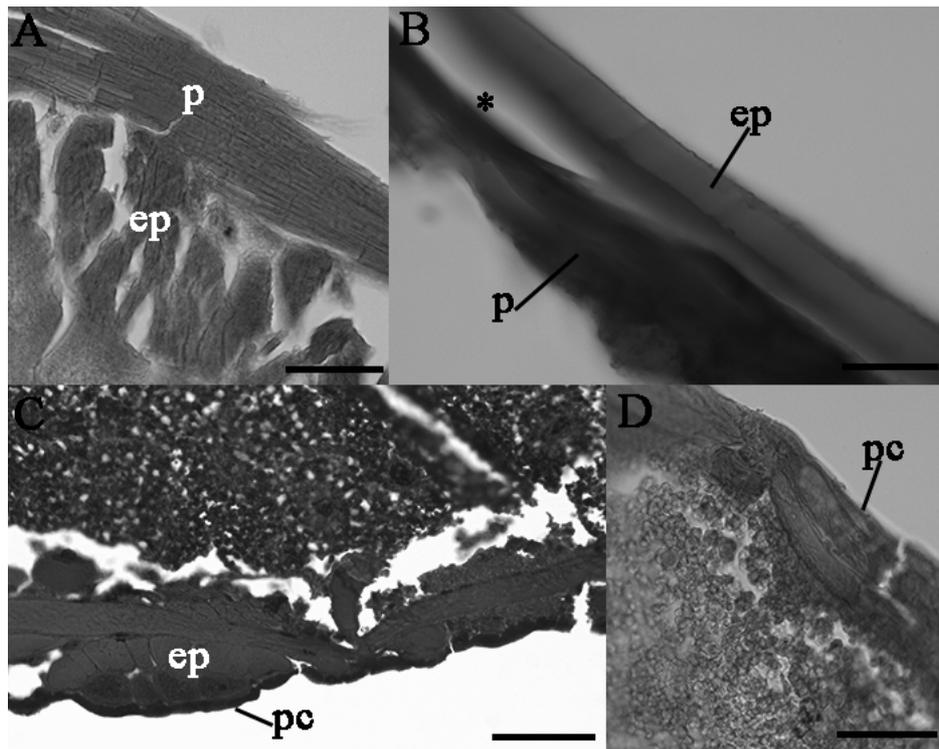


Figura 6. Apólise larva-pupa de *Lucilia cuprina*. (A) a pupa não sofreu apólise; (B) iniciado o processo de apólise larva-pupa; (C-D) apólise larva-pupa completa. **Abreviaturas:** ep, epiderme; p, pupário; pc, cutícula da pupa (farado adulto em desenvolvimento). *, separação da epiderme da pupa do pupário. **Escala:** (A, D) 50 μ m; (B) 20 μ m; (C) 100 μ m.

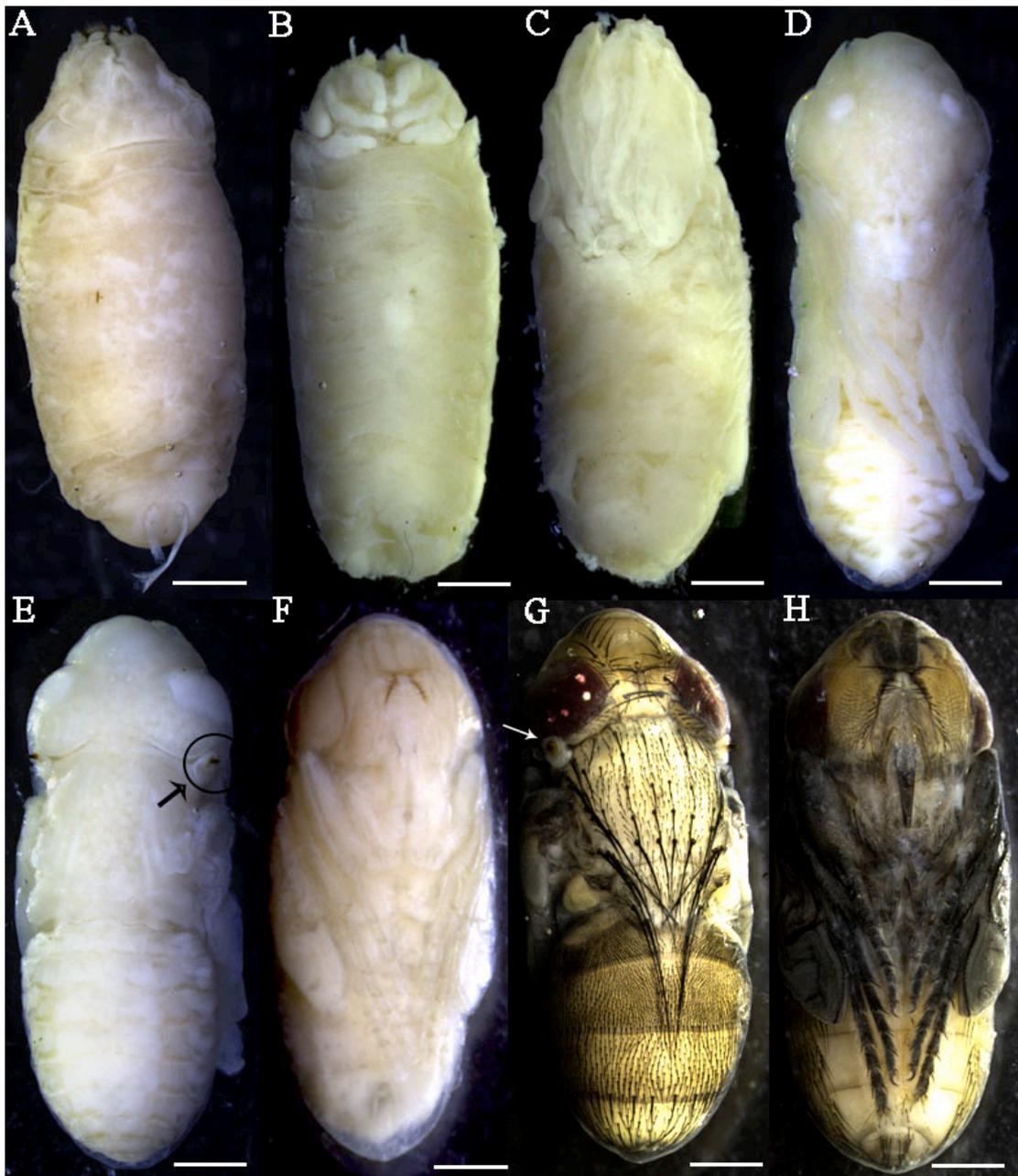


Figure 7. Sequência morfológica do desenvolvimento intra-pupal de *Lucilia cuprina*. (A) vista ventral da pupa criptocefálica; (B, C) vista ventral da pupa fanerocefálica; (D) vista ventral do adulto farado e (E) vista dorsal, espiráculo anterior da pupa (seta); (F) vista ventral do adulto farado, sequencia de pigmentação dos pelos, cerdas e estruturas do corpo; (G) adulto formado e formação do saco pitilíneo em vista dorsal, espiráculo anterior da pupa (seta) e (H) vista ventral. **Escalas:** 1 mm.



Figura 8. Sequencia de maturação do adulto farado de *Lucilia cuprina*, de acordo com a coloração dos olhos compostos. (A) olhos transparentes; (B) olhos amarelos; (C) olhos rosa; (D) olhos vermelhos. Abreviaturas: ec, olhos compostos. Escalas: (A) 0,5 mm; (B, C, D) 1 mm.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vários períodos da história humana as moscas varejeiras foram observadas e relacionadas à decomposição de cadáveres, carcaças e de modo geral, por estarem associadas ao lixo. Em virtude da sua alta frequência em que eram encontradas nessas situações motivaram o fortalecimento de teorias como a da geração espontânea. Entretanto, em 1951 William Harvey observou animais ovíparos e vivíparos e publicou o trabalho intitulado “*Exercitationes de generatione animalium*”, o que contrariou as teorias médicas da época*. Mais tarde, em 1968, Francesco Redi realizou experimento de reprodução com califorídeos, e pela primeira vez surgiu evidências sólidas contrariando a geração espontânea*.

Como se vê as moscas desde muito tempo despertam interesse e preocupação para a sociedade, elas sempre estiveram envolvidas em questões de morte e de doenças. Por isso, desde então são objetos de estudo. Ao longo da história humana foram feitos inúmeros trabalhos sobre morfologia e tempo de desenvolvimento, na tentativa de identificar os indivíduos e estabelecer seu ciclo de vida.

Nesse sentido, essa dissertação seguiu com o mesmo objetivo, fazer a caracterização morfológica das formas imaturas, para identificação das espécies propostas e estabelecer seus ciclos de desenvolvimento, nas condições de criação estabelecidas. Os avanços foram:

I) Foi feita uma tentativa de recuperar conceitos e informações terminológicas da pré-pupa, pupa e do desenvolvimento intra-pupal, a fim de tentar estabelecer uma uniformização futura entre os trabalhos.

II) Sob condições controladas, em câmara climatizada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR, 12 horas de fotofase): **i)** o tempo de desenvolvimento de ovo até a emergência de *Cochliomyia macellaria* foi de 241 horas (10,04 dias), sendo 17 horas o tempo de desenvolvimento embrionário, 104 horas a fase larval e 120 horas a fase de pupa, e **ii)** o tempo de desenvolvimento de ovo até a emergência de *Lucilia cuprina* foi de 354 horas (14,75 dias), sendo 16 horas o tempo de desenvolvimento embrionário, 128

* Papavero, N., Pujol-Luz, J.R. & Teixeira, D.M., 2010. From Homer to Redi. Some historical notes about the problem of necrophagous blowflies' reproduction. Arquivos de Zoologia 41 (4): 153-170.

horas a fase larval e 210 horas a fase de pupa.

III) Com auxílio da microscopia de luz e da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível descrever e redescrever estruturas morfológicas de ovos, larvas e pupário. A união das duas técnicas permitiu observar com clareza a composição e morfologia, por exemplo, da antena e sua sensila, das sensilas do palpo maxilar, o órgão oral, as sensilas do tórax, o órgão de Keilin e os detalhes do espiráculo anterior e posterior, além de maiores detalhes do esqueleto cefalofaríngeo para cada instar larval.

IV) Pela primeira vez foi realizado um estudo do desenvolvimento intra-pupal para *C. macellaria* e complementar para *L. cuprina*. Esse tipo de estudo, permite fazer uma identificação mais pormenorizada do tempo de desenvolvimento, seguindo as mudanças morfológicas sofridas ao longo do processo de pupação. Nesse estágio foi possível distinguir quatro eventos importantes até a emergência da mosca adulta: **i)** apólise larva pupa, **ii)** pupa criptocefálica, **iii)** pupa fanerocefálica e **iv)** adulto farado, que corresponde ao processo de maturação do adulto, sendo possível separá-lo, através do grau de pigmentação dos olhos compostos de transparente até o vermelho.

V) Como perspectivas espera-se aplicar esse tipo de estudo para outras espécies de Calliphoridae, assim como para larvas de outras famílias de Diptera. E explorando também o tempo de desenvolvimento dessa e de outras espécies sob um regime de diferentes temperaturas e condições de criação.

Adulto farado: É a etapa mais longa do desenvolvimento intra-pupal, corresponde à maturação do adulto (Denlinger & Ždárek, 1994; Cepeda-Palacios & Scholl, 2000)

Apólise: processo de separação e digestão parcial das células epidermais da cutícula velha do inseto e secreção da nova cutícula (Jenkin & Hinton, 1966, Hinton, 1971).

Apólise Larva-Pupa: marca o fim do processo de pupariação. Processo que separa a cutícula da larva modificada, o pupário, da nova epiderme da pupa em formação (Denlinger & Ždárek, 1994).

Ecdise: rompimento da cutícula velha e liberação do inseto, podendo ser de um instar ou estágio (Jenkin & Hinton, 1966, Hinton, 1971).

Eclosão: ação de sair a luz, de surgir. Usado para designar a saída da larva do ovo (Costa *et al.*, 2006).

Emergência: aparecimento, surgimento. Ato no qual o inseto adulto sai do pupário (Borror & DeLong, 1988)

Evento: acontecimento, de caráter eventual. Eventualidade = transitório (Koogan & Houaiss, 1999)

Exúvia: a cutícula velha do inseto deixada após a ecdise (Costa *et al.*, 2006).

Estágio = fase: são etapas do ciclo de vida de um inseto holometábolo (ovo, larva, pupa, adulto) (Hinton, 1946; Costa *et al.*, 2006).

Farado: intervalo entre dois eventos, momento que o inseto se encontra encoberto pela cutícula do instar ou estágio anterior (Hinton, 1946; Costa *et al.*, 2006).

Imago: Imagem. Forma definida do inseto adulto após a evaginação da capsula cefálica e dos apêndices torácicos (modificado de Costa *et al.*, 2006).

Instar: é fisiologicamente definido como o período compreendido entre duas apólises. Usado atualmente para definir cada uma das etapas do estágio larval (Fink, 1983; Costa *et al.*, 2006).

Pupa criptocefálica: ‘cabeça escondida’ ocorre logo após a apólise larva-pupa e termina com a evaginação da cabeça e dos apêndices torácicos. Os discos imaginiais dos apêndices e a vesícula cefálica (gânglio cerebral e cefálico) estão

sob os segmentos do tórax (Imms, 1957; Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994).

Pupa fanerocefálica: ‘cabeça visível’ ocorre a extroversão, visualização, da capsula cefálica e dos apêndices torácicos. Marca o processo de apólise pupa-adulto (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994).

Pupação: finalizado o processo de pupariação, inicia-se logo após a apólise larva-pupa, a pupa formada passa por dois eventos i) extroversão da cabeça e dos apêndices torácicos e ii) desenvolvimento e maturação do adulto formado (Denlinger & Ždárek, 1994).

Pupariação: processo compreendido entre o abandono da dieta, pela larva madura, até a completa imobilização e redução do comprimento larval. Gradualmente ocorre a redução da sua mobilidade e a retração dos segmentos. A cutícula progressivamente fica mais opaca, pigmentada e esclerotizada (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994).

Pré-pupa: ocorre na larva madura, período compreendido entre o abandono da dieta pela larva até a formação da pupa (Costa & Vanin, 1985; Costa *et al.*, 2006).

Pupa: termo usado para definir a fase em que o inseto está inativo, ele é incapaz de se alimentar. Ocorre entre o último instar larval e a fase adulta (Hinton, 1946, 1948; Imms, 1957).

Pupário: envoltório formado pelo endurecimento da cutícula do último estágio larval (Hinton, 1946, 1948; Borror & DeLong, 1988).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borror, D.J. & DeLong, D.M., 1988. Introdução ao estudo dos insetos. São Paulo, SP: Edgar Blucher, Editora. 655p.
- Cepeda- Palacios, R. & Scholl, P.J., 2000. Intra-Puparial Development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). J Med Entomol 37: 239-245.
- Costa, C. & Vanin, S.A., 1985. On the concepts of “pré-pupa”, with special reference to the Coleoptera. Rev Bras de Zoo 2(6): 339-345.
- Costa, C., Ide, S. Simonka, C.E., 2006. Insetos Imaturos: metamorfose e identificação. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 249p.

- Denlinger, D.L. & Ždársek, J., 1994. Metamorphosis behavior of flies. *Ann Rev Entomol* 39: 243-266.
- Fink, T., 1983. A further note in the use of terms *instar*, *stadium*, and *stage*. *Ann Entomol Soc Am* 76 (3): 316-317.
- Koogan, A. & Houaiss, A., 1999. Enciclopédia e dicionário ilustrado. 4^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Seinfer. 1808p.
- Fraenkel, G. & Bhaskaran, G., 1973. Pupariation and pupation in cyclorrhous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Ann Entomol Soc Am* 66: 418-422.
- Hinton, H.E., 1946. Concealed phases in the metamorphosis. *Nature* 157 (3991): 552-553.
- Hinton, H.E., 1948. On the origin and function of the pupal stage. *Trans R Ent Soc Lond* 99 (12): 395-409.
- Hinton, H.E., 1971. Some neglected phases in metamorphosis. *Proc R Ent Soc Lond* 35: 55-64
- Imms, A. D. 1957. *A General Textbook of Entomology*. 9^a Ed. London: Methuen & CO LTD. 886p.
- Jenkin, P.M. & Hinton, H.E., 1966. Apolysis in arthropod moulting cycles. *Nature* 5051: 871.