UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Gabriela da Silva Zampim

Avaliação do desenvolvimento pós-embrionário da espécie de importância forense, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Insecta, Diptera, Calliphoridae), sob temperaturas controladas e flutuantes

Evaluation of post-embryonic development of the forensically important species, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Insecta, Diptera, Calliphoridae), under controlled and fluctuating temperatures

CAMPINAS

2025

GABRIELA DA SILVA ZAMPIM

Avaliação do desenvolvimento pós-embrionário da espécie de importância forense, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Insecta, Diptera, Calliphoridae), sob temperaturas controladas e flutuantes

Evaluation of post-embryonic development of the forensically important species, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Insecta, Diptera, Calliphoridae), under controlled and fluctuating temperatures

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Biologia Animal, na área de Biodiversidade Animal.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining the Master's Degree in Animal Biology, in the area of Animal Biodiversity.

Orientadora: PROFA. DRA. PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA GABRIELA DA SILVA ZAMPIM E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN

CAMPINAS

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Z14a

Zampim, Gabriela da Silva, 1997-
Avaliação do desenvolvimento pós-embrionário da espécie de importância forense, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Insecta, Diptera, Calliphoridae), sob temperaturas controladas e flutuantes / Gabriela da Silva Zampim. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Patricia Jacqueline Thyssen.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Insetos necrófagos. 2. Estágios imaturos. 3. Biologia do desenvolvimento. 4. Intervalo pós-morte. 5. Entomologia forense. I. Thyssen, Patricia Jacqueline , 1973 - . II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Evaluation of post-embryonic development of the forensically important species, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Insecta, Diptera, Calliphoridae), under controlled and fluctuating temperatures
Palavras-chave em inglês:
Carrion insects
Immature stages
Developmental biology
Post-mortem interval
Forensic entomology
Área de concentração: Biodiversidade Animal
Titulação: Mestra em Biologia Animal
Banca examinadora:
Patricia Jacqueline Thyssen [Orientador]
Carina Mara de Souza
Rodrigo Cezar Azevedo Pereira Faria
Data de defesa: 28-03-2025
Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)
Não se aplica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0009-0009-0160-3966
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/2223109635031656

FOLHA DE APROVAÇÃO

Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen

Profa. Dra. Carina Mara de Souza

Prof. Dr. Rodrigo Cezar Azevedo Pereira Farias

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de **Dissertação/Tese** e na Secretaria do Programa **de Pós graduação de Biologia Animal** da Unidade Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Entomologia Integrativa no Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP, pela infraestrutura e apoio oferecido através do parque de equipamentos para a realização deste estudo.

À minha orientadora, Profª Drª Patrícia Jacqueline Thyssen, manifesto minha gratidão por me acolher em seu laboratório em 2018 e, desde então orientar-me, alimentando minha paixão pelos insetos. Obrigada por compartilhar seu conhecimento, pela paciência, pelo tempo investido, pelas cobranças e críticas construtivas, que foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal e me trouxeram até este momento.

Aos meus pais, Renata e Valter, e às minhas irmãs, Rafaela e Izabella, sou eternamente grata por todo o apoio ao longo da minha formação. Sua presença e incentivo foram essenciais durante esta jornada.

Aos meus companheiros de quatro patas, Thor, Gregório e Olívia, por trazerem alegria e conforto nos momentos mais desafiadores.

À Dona Tacilda, meu sincero agradecimento por me receber tão bem em seu cantinho de criação de insetos e por compartilhar, com tanto zelo, seu vasto conhecimento sobre criação, manutenção e comportamento de imaturos. Sua colaboração foi indispensável para os experimentos que se seguiram.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Entomologia Integrativa – Ken, Letícia, Bárbara, Luís, Gisele, Aline, Thamires, Taís, Gustavo, Marcela, Lucas, Matheus e Laura –, minha mais profunda gratidão pelo auxílio durante o desenvolvimento do meu projeto. Agradeço não apenas pelo apoio técnico, mas também pelas conversas, companheirismo e os momentos compartilhados no bandejão, que tornaram esta caminhada mais especial e leve.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Informações sobre a biologia de insetos que se desenvolvem em corpos em decomposição são relevantes para o campo forense, particularmente por serem úteis para estimar o intervalo pós-morte (IPM) em casos de morte violenta e/ou não esclarecida. Entre alguns dos métodos mais frequentemente acessados para estimar o IPM, a partir de informações fornecidas pelos insetos, estão o Período de Atividade do Inseto (PAI) e o Tempo de Colonização (TOC). Com certas variações conceituais, ambos tomam como base a idade do inseto necrófago que está fazendo uso daquele recurso alimentar para sua nutrição. Embora dados entomológicos ofereçam boa acurácia para estimar o IPM quando comparado a outros métodos como a mensuração do *livor*, *algor* ou *rigor mortis*, a ausência de dados de desenvolvimento do inseto coletado em uma cena criminal pode tornar-se um obstáculo para seu uso. Estudos sobre dípteros da família Calliphoridae (Insecta, Diptera, Oestroidea) são bem numerosos na literatura devido à abundância e frequência com que são reportados em cadáveres, além de serem quase sempre os primeiros colonizadores. Assim como outros califorídeos, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), uma espécie necrófaga e de ampla distribuição, é observada se desenvolvendo em cadáveres. Por essa razão, neste estudo objetivou-se avaliar a taxa do desenvolvimento pós-embrionário de *C. macellaria* criada sob 13 faixas de temperaturas controladas (variando 2,5ºC no intervalo de 12,5 a 42,5±1ºC) e dois pares de temperaturas flutuantes (25/30±1ºC e 17,5/32.5±1ºC). Colônias de moscas adultas foram estabelecidas em laboratório a partir de coletas em campo. Adultos e imaturos permaneceram sob condições controladas de temperatura (a qual variou a depender da fase experimental testada), umidade relativa do ar (70±10%) e fotoperíodo (12:12h). Os tempos de incubação e de desenvolvimento larval e pupal foram mensurados em todas as etapas experimentais. Peso e comprimento foram aferidos de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios e de pupas a cada 24h (em temperaturas < 17,5ºC) ou 12h (em temperaturas > 17,5ºC). O tempo total de desenvolvimento, isto é, de ovo a adulto, sob temperaturas controladas variou de 699h (15ºC) a 165h (37,5ºC). As menores e maiores taxas de sobrevivência (%) foram registradas nas temperaturas de 15ºC e 30ºC, respectivamente. Sob temperaturas flutuantes, o tempo total de desenvolvimento foi maior no par 25,5/30ºC (253h) quando comparado ao par 17,5/32,5ºC (240h). Levando em conta os resultados obtidos, concluiu-se que a temperatura ótima de desenvolvimento para *C. macellaria* é entre 27,5 e 32,5ºC tanto sob temperaturas controladas quanto flutuantes.

Palavras-chaves: insetos necrófagos; biologia de imaturos; intervalo pós-morte; modelos de desenvolvimento; entomologia forense.

ABSTRACT

Information on the biology of insects that develop in decaying corpses is relevant to the forensic field, particularly because it is useful for estimating the postmortem interval (PMI) in cases of violent and/or unclear death. Some of the most frequently accessed methods for estimating the PMI from information provided by insects are the Period of Insect Activity (PIA) and Time of Colonization (TOC). With certain conceptual variations, both are based on the age of necrophagous insect that is using that food resource for its nutrition. Although entomological data offer good accuracy for estimating the PMI, when compared to other methods such as measuring *livor*, *algor* or *rigor mortis*, the lack of developmental data of the insect collected at a crime scene can be an obstacle to its use. Studies on Diptera of the family Calliphoridae (Insecta, Diptera, Oestroidea) have been numerous due to the abundance and frequency with which they are reported on cadavers, in addition to being almost always the first colonizers. *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), a widely distributed necrophagous species, as well as other blowflies, is observed developing on corpses. For this reason, this study aimed to evaluate the rate of post-embryonic development of *C. macellaria* reared under 13 controlled temperature ranges (varying each 2.5ºC among the interval from 12.5 to 42,5±1ºC) and two pairs of fluctuating temperatures (25/30±1ºC and 17.5/32.5±1ºC). Colonies of adult flies were established in the laboratory from field collections. Adults and immatures remained under controlled temperature conditions, which varied depending on the experimental stage tested, relative humidity (70±10%) and photoperiod (12:12h). Incubation and larval and pupal development times were measured at all experimental stages. Weight and length were measured from first, second and third instar larvae and pupae every 24h (at temperatures < 17.5ºC) or 12h (at temperatures > 17.5ºC). The total development time, i.e., from egg to adult, under controlled temperatures ranged from 699h (15ºC) to 165h (37.5ºC). The lowest and highest survival rates (%) were recorded at temperatures 15ºC and 30ºC, respectively. Under fluctuating temperatures, the total development time was longer in the 25.5/30ºC pair (253h) when compared to the 17.5/32.5ºC pair (240h). Taking into account the results obtained, it was concluded that the optimal development temperature for *C. macellaria* is between 27.5 and 32.5ºC both under controlled and fluctuating temperatures.

Key words: necrophagous insects; biology of immatures; postmortem interval; developmental models; forensic entomology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Tempo médio (h) de incubação de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) sob diferentes faixas de temperaturas controladas.

Figura 2. Massa corporal média (mg) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob diferentes faixas de temperaturas controladas.

Figura 3. Comprimento médio (mm) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob diferentes faixas de temperaturas controladas.

CAPÍTULO 2

Figura 1. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 25/30°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 2. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura constante de 27,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 3. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 17,5/32,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 4. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura constante de 25°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 5. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 25/30°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 6. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em

temperatura constante de 27,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 7. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 17,5/32,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 8. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura constante de 25°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

Figura 9. Representação gráfica dos resíduos considerando as equações com base na massa larval de A:regressão linear simples; B: regressão polinomial com 2 graus de liberdade e C: regressão com B-spline.

Figura 10. Representação gráfica dos resíduos considerando as equações com base no comprimento larval de A:regressão linear simples; B: regressão polinomial com 2 graus de liberdade e C: regressão com B-spline.

Figura 11. Representação gráfica dos resíduos de modelo de regressão múltipla.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Tempo de desenvolvimento (h), taxa de sobrevivência (%) e massa corporal (mg) e comprimento (mm) máximo de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) mantidas sob diferentes temperaturas (ºC) controladas. Notar que: *Não completou o desenvolvimento neste estágio de vida; N.A. significa que o parâmetro não foi avaliado.

Tabela 2. Equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2) que expressam a relação entre tempo de desenvolvimento e massa corpórea em diferentes temperaturas (T em ºC) para a espécie *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae).

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Tempo de desenvolvimento (h), taxas de sobrevivência larval e de pupas (%) e massa corporal (mg) e comprimento (mm) máximo de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob faixas de temperaturas flutuantes de 25/30°C e sua respectiva temperatura média. Notar: N.A.= não avaliado.

Tabela 2. Tempo de desenvolvimento (em h), taxas (%) de viabilidade larval e sobrevivência de adultos e massa corpórea (em mg) de larvas e pupas de *Cochliomyia macellaria* submetidas ao regime de criação em temperatura (ºC) flutuante de 217,5/32,5ºC e constante de 25°C.

Tabela 3. Massa corporal média (mg) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob faixa de temperaturas flutuantes de 25/30ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

Tabela 4. Massa corporal média (mg) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob faixa de temperaturas flutuantes de 17,5/32,5ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

Tabela 5. Comprimento (mm) médio de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob faixa de temperaturas flutuantes de 25/30ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

Tabela 6. Comprimento (mm) médio de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob faixa de temperaturas flutuantes de 17,5/32,5ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA 14

1.1 DIPTERA, CALLIPHORIDAE 14

1.2 ENTOMOLOGIA FORENSE 15

1.3 METODOLOGIAS PARA ESTIMAR O INTERVALO PÓS-MORTE 17

1.4 CALCULANDO A IDADE DE INSETOS ATRAVÉS DE DADOS MORFOMÉTRICOS 18

2 OBJETIVOS 20

2.1 GERAL 20

2.2 ESPECÍFICOS 20

3 CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *COCHLIOMYIA MACELLARIA* (F.) (INSECTA, DIPTERA, CALLIPHORIDAE) SOB TEMPERATURAS CONTROLADAS 21

3.1 INTRODUÇÃO 22

3.2 MATERIAL E MÉTODOS 23

3.3 RESULTADOS 24

3.4 DISCUSSÕES 26

3.5 REFERÊNCIAS 30

4 CAPÍTULO 2- O EFEITO DE TEMPERATURAS FLUTUANTES SOBRE A TAXA DE DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE DE IMPORTÂNCIA FORENSE COCHLIOMYIA MACELLARIA (F.) (INSECTA, DIPTERA, CALLIPHORIDAE) 37

4.1 INTRODUÇÃO 38

4.2 MATERIAL E MÉTODOS 39

4.3 RESULTADOS 42

4.4 DISCUSSÕES 44

4.5 REFERÊNCIAS 48

5 CONCLUSÕES GERAIS 67

6 REFERÊNCIAS 68

ANEXOS 72

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 Diptera, Calliphoridae

Os insetos da ordem Diptera (Arthropoda, Insecta) possuem desenvolvimento holometábolo, caracterizado por quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto. Os adultos apresentam como característica marcante a presença de um par de asas funcionais (anterior), enquanto o par posterior é reduzido a estruturas denominadas halteres, que auxiliam no equilíbrio durante o voo. Além disso, possuem peças bucais adaptadas para diferentes modos de alimentação, como sucção ou perfuração (Yeates et al., 2007). Essa ordem é uma das mais diversas da classe Insecta, abrigando aproximadamente 160 mil espécies descritas (Carvalho et al.,2024) , distribuídas em aproximadamente 160 famílias (Pape et al. 2011).

Dentre essas, destaca-se a família Calliphoridae (Insecta, Diptera, Oestroidea), composta por dípteros popularmente conhecidos como moscas varejeiras, facilmente reconhecíveis por sua coloração metálica ou brilhante e tamanho variando de 4 a 16 mm (Ferrar, 1987). Mundialmente, foram registradas mais de 1.500 espécies de Calliphoridae (Courtney et al., 2017), das quais cerca de 70 ocorrem na região Neotropical e 34 são reportadas no Brasil (Marinho e Madeira-Ott, 2025).

Alta fecundidade, eficiente capacidade de dispersão associada à plasticidade adaptativa são fatores que propiciam aos califorídeos explorar favoravelmente ambientes modificados, em particular áreas urbanas e aquelas destinadas à criação de animais domésticos. Grande parte das espécies de Calliphoridae são saprófagas (Ferrar, 1987), por esta razão ganham importância na ciclagem da matéria orgânica no planeta. Contudo, nas grandes cidades tal hábito alimentar pode trazer uma série de prejuízos de ordem econômica e sanitária, pois seus imaturos ao utilizarem os excrementos ou resíduos orgânicos como fonte alimentar podem carrear diversos patógenos causadores, sobretudo, de doenças entéricas (Thyssen et al., 2004; Marcondes e Thyssen, 2017; Bertolini et al., 2022).

Quando o hábito alimentar dos califorídeos acaba por enfestar tecidos de animais vertebrados, é denominado miíase (Ferrar, 1987). A classificação desse quadro é baseada na espécie das larvas encontradas, podendo ser facultativa ou acidental (Guimarães e Papavero, 1999). No caso da miíase obrigatória, as larvas se alimentam obrigatoriamente de tecido vivo (e.g. *Cochliomyia hominivorax*) (Grisi et al., 2014), enquanto na miíase facultativa, as espécies se alimentam de tecidos necrosados de hospedeiros vivos. Neste segundo caso, sua importância

também se estende à terapia larval, em que larvas estéreis de algumas espécies são utilizadas no tratamento de feridas crônicas ou infecções resistentes a antibióticos, uma vez que seus estágios imaturos se alimentam exclusivamente de tecido lesionado, demonstrando seu potencial positivo no campo médico (Masiero e Thyssen, 2016; Thyssen et al., 2022).

Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) é um dos califorídeos mais amplamente distribuídos na região Neotropical. Por ser comumente encontrada em ambiente modificado, seu comportamento é caracterizado como sinantrópico (Alvarez-García et al., 2017; Byrd e Tomberlin, 2019). Devido ao seu hábito necrófago, pode ser encontrada em cadáveres, principalmente nos estágios iniciais da decomposição (Kotzé e Tomberlin, 2019), conferindo a seus imaturos uma potencial fonte de informações para a investigações judiciais (Oliveira-Costa e Mello-Patiu, 2004; Oliveira e Vasconcelos, 2010; Meira et al., 2020).

1.2 Entomologia Forense

Dentro do contexto forense a entomologia, isto é, o estudo de insetos e outros artrópodes, quando associado aos demais procedimentos periciais, tem como principal propósito levantar informações e vestígios que possam ter valia para o andamento ou conclusão de um processo investigativo (Thyssen, 2011). Nesse campo da entomologia, denominado como entomologia forense, uma das contribuições práticas mais significativas tem sido a utilização dos insetos para estimar o intervalo pós-morte (IPM), especialmente por meio da análise do desenvolvimento dos imaturos de moscas, que estão frequentemente entre os primeiros colonizadores de cadáveres (Thyssen et al., 2018). Além disso, a presença de insetos pouco usuais como os parasitos ou coprófagos pode indicar circunstâncias de negligência, como em casos de maus-tratos ou abandono (Thyssen et al., 2012). Outro aspecto relevante é que os insetos necrófagos também podem revelar a causa da morte, principalmente em circunstâncias onde o óbito se deu pela ingestão, inoculação ou contato com substâncias tóxicas, drogas ou venenos (Souza et al., 2013).

O uso de insetos na resolução de casos criminais tem registros documentados desde o século XIII, na China. O livro *Washing Away of Wrongs*, escrito por Song Ci em 1247, é considerado o primeiro manual que menciona a entomologia forense, relatando um caso em que a presença de moscas foi usada para identificar uma arma utilizada em um homicídio em 1235. No relato, o corpo de um lavrador foi encontrado degolado em uma área rural, possivelmente por uma foice. Na tentativa de identificar o culpado pelo assassinato, o investigador solicitou

que todos os aldeões colocassem suas foices em exposição e por conter vestígios de sangue e de tecido, as moscas varejeiras foram atraídas para uma única lâmina. Confrontado com a evidência, o proprietário da foice confessou o crime (Benecke, 2001).

No século XIX, estudos científicos começaram a sistematizar as observações sobre a relação entre insetos e cadáveres. Os trabalhos pioneiros do francês Jean-Pierre Mégnin, publicados em 1894 no livro "*La Faune des Cadavres*", estabeleceram a base da entomologia forense como uma ciência aplicada. Mégnin descreveu as sucessões de insetos em cadáveres e suas aplicações para determinar o intervalo pós-morte (IPM) influenciando profundamente os métodos forenses. Benecke ajudou a popularizar a prática, destacando como as características únicas dos insetos – como seu ciclo de vida previsível e sua relação direta com a decomposição – são cruciais na resolução de crimes (Benecke, 2001; Pujol-Luz et al.,2008).

No contexto brasileiro, a entomologia forense começou a ser divulgada em 1908, através do médico-legista Oscar Freire, que integrou conhecimentos sobre entomologia nos estudos de medicina legal em sua apresentação para a Sociedade Médica da Bahia. Em seguida, Roquette-Pinto (1908) realizou estudos com cadáveres humanos, publicando um estudo de caso intitulado "Nota sobre a fauna cadavérica no Rio de Janeiro", enquanto Lüderwald (1911) realizou experimentos sobre a biologia e o comportamento de besouros necrófagos em carcaças, no Horto do Museu Paulista, comparando-os com a fauna de besouros da Alemanha (Pujol-Luz et al., 2008).

No âmbito forense, os califorídeos se destacam de outros insetos pela abundância e frequência com que são reportados em carcaças e cadáveres, estando entre os primeiros organismos colonizadores (Carvalho et al., 2004; Thyssen et al., 2018). Essa associação, quando conhecidos seus dados biológicos, taxonômicos e de distribuição geográfica, pode ser útil para fornecer informações que podem auxiliar na estimativa do IPM, na detecção de substâncias tóxicas (para inferir a causa da morte), na associação de suspeitos à autoria de um crime ou ainda para ajudar a evidenciar casos de negligência ou maus tratos (Smith, 1986; Souza et al., 2013; Thyssen et al., 2012; 2018).

1.3 Metodologias para estimar o intervalo pós-morte

O IPM corresponde ao intervalo de tempo desde a morte até o encontro do corpo, e é uma das etapas mais importantes em investigações judiciais, pois fornece informações fundamentais para reconstrução da linha do tempo de eventos relacionados à morte (Benecke, 2001).

Tradicionalmente, a medicina legal utiliza os fenômenos cadavéricos para determinar o IPM em estágios iniciais da decomposição, como o rigor mortis, algor mortis e livor mortis (correspondentes à rigidez, resfriamento e manchas hipostáticas cadavéricas, respectivamente), etc. Apesar de úteis, essas técnicas apresentam limitações, devido principalmente às inúmeras variáveis associadas ao cadáver ou ao ambiente em que este se encontra (Campobasso et al., 2001). Já os insetos, como evidências, sob condições que não limitem o acesso ao corpo, podem ser encontrados poucos minutos após a morte (Byrd e Tomberlin, 2019) pelo fato de certas espécies utilizarem este substrato como fonte de proteína para o desenvolvimento de sua prole (Amendt et al., 2004; Thyssen, 2010; 2011). Essa atração ao cadáver por recurso, que pode resultar em oviposição ou larviposição é denominada PAI (Período de Atividade do Inseto) (Amendt et al., 2007; Berg e Benbow, 2013).

A partir de informações obtidas através dos insetos, o IPM pode ser estimado por meio de dois métodos: o primeiro, antes denominado intervalo pós-morte mínimo (IPMmin), toma como base o cálculo da idade dos imaturos que se desenvolvem e são coletados em um cadáver para indicar o tempo de colonização do corpo (Catts e Goff, 1992); já o segundo, o intervalo pós-morte máximo (IPMmax), é definido pela sucessão faunística dos insetos que colonizam o cadáver ao longo do processo de decomposição (Mégnin, 1894).

O IPM através do cálculo da idade do imaturo mais velho tem sido frequentemente o método entomológico mais aplicado, objetivando alcançar maior acurácia ao IPM (Amendt et al., 2007), o qual pode ser inferido através do tempo de colonização dos insetos (TOC - time of colonization), que se refere ao intervalo entre a deposição dos ovos ou das primeiras formas imaturas no cadáver até o momento de coleta dos espécimes (Brundage, 2020).

Por serem organismos ectotérmicos, os insetos têm seu metabolismo fortemente influenciado pelas condições térmicas do ambiente (Busvine, 1980). Temperaturas mais baixas tendem a retardar o crescimento larval, possivelmente devido à redução na atividade de enzimas metabólicas, enquanto temperaturas mais altas aceleram o desenvolvimento, favorecendo o aumento das taxas de crescimento. Essa relação térmica impacta processos essenciais ao ciclo

de vida, como a alimentação, o ganho de massa corporal, o crescimento em comprimento e a eclosão (Ames e Turner, 2003). Além disso, o desenvolvimento desses organismos é limitado por intervalos térmicos específicos; temperaturas abaixo ou acima desses limites resultam na interrupção do crescimento (Campobasso et al., 2001).

Modelos matemáticos que investigam o tempo de desenvolvimento como variável resposta, frequentemente utilizam a temperatura como variável preditora (Wagner et al., 1984). Entretanto, a maior parte dos estudos concentra-se em taxas de desenvolvimento sob temperaturas constantes, com destaque para algumas análises recentes (e.g., Nassu et al., 2014; Alonso et al., 2015; Lecheta et al., 2015). Apesar disso, temperaturas flutuantes, como as observadas em ciclos diários, podem exercer influência significativa sobre o tempo de vida das formas imaturas (e.g., Dadour et al., 2001; Clarkson et al., 2004; Chen et al., 2019), ressaltando a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o impacto dessas oscilações na estimativa do IPM. Ademais, a resposta às variações térmicas é espécie-específica, o que reforça a importância de considerar tais diferenças no cálculo do IPM (Reibe et al., 2010).

Para tornar possível o cálculo do IPM é necessário acessar dados de referência padronizados e completos (Matuszewski, 2021) incluindo de populações de insetos geograficamente próximas (Greenberg, 2002; Owings et al., 2014), os quais devem considerar a sazonalidade, ciclos diurnos e variações climáticas que podem alterar o comportamento e o desenvolvimento dos insetos necrófagos em diferentes regiões.

1.4 Calculando a idade de insetos através de dados morfométricos

Dados morfométricos têm sido frequentemente utilizados para estimar o desenvolvimento dos imaturos. Essa abordagem baseia-se na medição de variáveis como massa, comprimento ou largura das larvas, e permite construir curvas de crescimento que correlacionam o desenvolvimento larval com o tempo desde a oviposição, fornecendo uma estimativa precisa da idade larval (Von Zuben et al., 1998; Thyssen e Oliveira-Costa, 2024). No entanto, as equações empregadas nessas análises geralmente assumem um comportamento linear, o que pode levar a discrepâncias na interpretação, pois o desenvolvimento real dos insetos segue uma curva não linear. Essa curva apresenta uma desaceleração no crescimento nos estágios finais, devido à redução na ingestão de alimento e o processo de retração dos tecidos, refletindo uma redução no ganho de massa ou comprimento à medida que o desenvolvimento se aproxima do estágio adulto (Thyssen, 2005). Essa limitação metodológica

destaca a necessidade de adotar modelos matemáticos que considerem o comportamento não-linear do desenvolvimento dos insetos em diferentes temperaturas, permitindo uma aproximação mais fiel ao PAI, e consequentemente ao IPM.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a taxa de desenvolvimento pós-embrionário da espécie de importância forense *Cochliomyia macellaria* (Insecta, Diptera, Calliphoridae) criada sob condições de temperatura controlada e flutuante.

2.2 ESPECÍFICOS

i) Avaliar o tempo de incubação de ovos de *C. macellaria* mantidos em 13 faixas térmicas controladas adicionando 2,5ºC dentro de um intervalo de 12,5 a 42,5±1ºC;

ii) Avaliar o tempo de desenvolvimento, ganho de massa corpórea e comprimento de larvas e pupas de *C. macellaria* criadas em 13 faixas térmicas controladas adicionando 2,5ºC dentro de um intervalo de 12,5 a 42,5±1ºC, e em dois pares de temperaturas flutuantes, 25/30±1ºC e 17,5/32.5±1ºC;

iii) Avaliar a taxa de sobrevivência dos imaturos de *C. macellaria* criados sob as condições controladas e flutuantes mencionadas acima;

iv) Construir equações de regressão para auxiliar na estimativa da idade larval de *C. macellaria* quando submetidas às condições controladas e flutuantes mencionadas acima.

3 CAPÍTULO 1 - Avaliação da taxa de desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria* (F.) (Insecta, Diptera, Calliphoridae) sob temperaturas controladas

GABRIELA S. ZAMPIM[1], MAICON D. GRELLA[1], PATRICIA J. THYSSEN[1#]

[1]Laboratório de Entomologia Integrativa, Departamento de Biologia Animal, IB, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, CP 13083-862, São Paulo, Brasil.

Resumo

A entomologia forense utiliza o estudo de insetos e outros artrópodes para obter informações em contextos legais, sendo a determinação do intervalo pós-morte (IPM) um de seus métodos mais populares. A análise do desenvolvimento de dípteros da família Calliphoridae, como *Cochliomyia macellaria*, é especialmente útil devido à sua rápida colonização de cadáveres e ao conhecimento prévio de seus padrões de desenvolvimento. Como organismo ectotérmico, o crescimento de *C. macellaria* varia conforme a temperatura, tornando essencial a obtenção de dados detalhados sobre seu desenvolvimento em diferentes faixas térmicas. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar a influência da temperatura no crescimento e nas características larvais dessa espécie sob diferentes faixas térmicas. Para tanto, adultos de *C. macellaria* foram coletados em campo ativamente, utilizando como iscas vísceras em estágio de decomposição. Após estabelecimento de colônia, os ovos coletados de F1 (N=250) foram transferidos para recipientes contendo carne suína moída e expostos a diferentes temperaturas constantes (12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5; 30; 32,5; 35; 37,5; 40 e 42,5 ± 1ºC, 70±10% UR, fotoperíodo 12:12h). Durante o desenvolvimento, a massa e o comprimento das larvas foi mensurado a cada 12/24 h até a fase de pupariação. Os dados coletados foram analisados por meio de regressões para determinar as taxas de desenvolvimento, com as diferenças entre os regimes térmicos avaliadas utilizando ANOVA. Os dados mostram que o tempo de desenvolvimento de larvas e pupas de *C. macellaria* diminuiu com o aumento da temperatura, variando de 660h a 15°C para 156h entre 32,5°C e 37,5°C. A massa e o comprimento larvais atingiram valores máximos a 37,5°C (70,2 mg e 17,21 mm, respectivamente), mas reduziram a 40°C. As temperaturas intermediárias (27,5°C a 30°C) apresentaram maior viabilidade larval (94,1%) e sobrevivência adulta, enquanto temperaturas extremas, como 15°C e 40°C, mostraram viabilidade significativamente reduzida. Esses resultados destacam a influência da temperatura no desenvolvimento de *C. macellaria*, evidenciando padrões específicos que podem ser utilizados para aprimorar a estimativa do intervalo pós-morte (IPM). Estudos como este são fundamentais para aumentar a precisão das análises entomológicas forenses.

Palavras-chaves: entomologia forense, intervalo pós-morte, padrões térmicos

3.1 Introdução

A entomologia forense é caracterizada pela utilização do estudo de insetos e outros artrópodes como ferramenta para coletar informações e evidências em contextos legais (Thyssen, 2011). Um de seus principais objetivos é determinar o intervalo pós-morte (IPM) a partir do tempo de colonização dos insetos (TOC) (Brundage, 2020), considerando que a análise da idade dos estágios imaturos pode fornecer dados valiosos sobre o tempo transcorrido entre a morte e a descoberta de um corpo (Catts e Goff, 1992).

Entre os organismos que colonizam cadáveres, destacam-se os dípteros da família Calliphoridae, devido à sua abundância, ampla distribuição e capacidade de estar presente em todos os estágios da decomposição. Esses insetos são frequentemente os primeiros a localizar e colonizar cadáveres, muitas vezes já dentro das primeiras horas após a morte (Oliveira-Costa, 2011). Dentre os califorídeos, a espécie *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) se destaca por sua ampla distribuição, além do comportamento sinantrópico (Ferrar, 1987; Hall e Doisy, 1993; Guimarães e Papavero, 1999; Mohr e Tomberlin, 2015).

Um dos métodos mais eficazes para estimar o intervalo pós-morte mínimo (IPMmin) é a determinação da idade das larvas coletadas em cadáveres (Catts e Goff, 1992). As larvas são amplamente utilizadas nesse contexto, uma vez que o tempo de desenvolvimento larval de diversas espécies já foi amplamente estudado. Pesquisas revelam que o padrão de desenvolvimento dos insetos ectotérmicos pode variar conforme a temperatura do ambiente (Busvine, 1980). Assim, a temperatura desempenha um papel crítico na precisão da estimativa do IPMmin (Catts e Goff, 1992).

Portanto, obter dados completos sobre o desenvolvimento de *C. macellaria* em diferentes faixas térmicas é fundamental para aprimorar a acurácia das estimativas do intervalo pós-morte. Essa abordagem permite construir modelos de crescimento larval que abrangem diferentes condições ambientais, refletindo variações naturais que podem ocorrer na cena de um crime. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de *C. macellaria* em diferentes faixas térmicas constantes, visando determinar os efeitos da temperatura no tempo de desenvolvimento e nos limiares térmicos mínimo e máximo da espécie. Esses dados permitem calcular os graus-hora acumulados (ADH) e desenvolver modelos de crescimento larval mais precisos, contribuindo para melhorar a estimativa do intervalo pós-morte mínimo (IPMmin) em contextos forenses.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Estabelecimento de colônias de moscas no laboratório

Adultos de *C. macellaria* foram coletados no campo ativamente (22°49'03"S; 47°04'11"W) com uso de iscas putrefeitas por pelo menos 48h antes (fígados de galinha e bovino), anestesiadas a -20ºC por 3 min, identificadas (Grella e Thyssen, 2011) e acondicionadas em gaiolas plásticas mantidas sob condições controladas (25±1ºC, 70±10% UR, fotoperíodo 12:12h). Para a manutenção dos espécimes adultos e estabelecimento de colônia, foi oferecida uma dieta de açúcar, levedo de cerveja e leite em pó integral (1:1:1) e água *ad libidum*. Na geração F1, após o comportamento de cópula, uma porção de 50g de carne suína moída foi usada para estimular a postura por até três horas.

3.2.2 Grupos experimentais

Os ovos obtidos foram contados (N=250) e transferidos para triplicatas independentes contendo carne suína fresca moída, na proporção de 1g/ovo. Para avaliar o tempo de incubação, foram preparadas triplicatas para cada temperatura testada, as quais foram mantidas em câmaras climáticas modelo Eletrolab® EL202/4, com temperaturas ajustadas para 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5; 30; 32,5; 35; 37,5; 40 e 42,5 ± 1°C, sob 70±10% de UR e fotoperíodo de 12:12h. Após a eclosão, 10 larvas foram retiradas ao acaso a cada 12h quando em temperaturas >20°C, e 24h nos primeiros dias quando em temperaturas <20°C até a fase de pupa. As larvas foram mortas em água a 70ºC e conservadas em solução de Kahle (Borror e DeLong, 1969). A massa (mg) foi aferida através de uma balança analítica modelo Scientech® SA 210, e o comprimento (mm) com auxílio de uma câmara digital acoplada em uma lupa Zeiss® Discovery V.12, com sistema de captura de imagens AxioCam 5.0 e software ZEN versão 2.0.

Simultaneamente, triplicatas foram mantidas sob as mesmas condições para cada grupo de tratamento (representado pelas temperaturas: 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5; 30; 32,5; 35; 37,5; 40 e 42,5 ± 1ºC, 70±10% UR, fotoperíodo 12:12h) para obtenção da taxa de sobrevivência larval, tempo de desenvolvimento pupal e emergência de adultos.

3.2.3 Análise de dados

Os resultados foram analisados através de ANOVA de um fator, utilizando o software Rstudio® (R Core Team, 2019), com o intuito de comparar o efeito dos diferentes regimes térmicos no tempo de desenvolvimento. Para cada faixa térmica foi feita uma análise de regressão linear inversa para comparar a relação entre duração de desenvolvimento e graus-hora acumulados (GHA). Nesse caso, as variáveis tempo, massa e comprimento foram analisadas como independentes a fim de encontrar a melhor combinação para estimativa de PAI. O nível de significância de 5% ($p \leq 0,5$) foi considerado para todas as análises.

3.3 Resultados

3.3.1 Tempo de incubação dos ovos

O tempo de incubação dos ovos pode ser observado na Tabela 1. Como as larvas não chegaram a eclodir nas temperaturas de 12,5 e 42,5°C, pode-se afirmar que essas temperaturas representam seus limiares mínimo e máximo de desenvolvimento, respectivamente. O tempo variou significativamente entre as faixas térmicas, podendo ser observado no gráfico da Figura 1 uma forte correlação negativa entre o tempo de incubação e a temperatura. A força da correlação é corroborada pelo valor de $R^2 = 0,8748$.

3.3.2 Taxa de desenvolvimento de larvas e pupas

Dados sobre o tempo de desenvolvimento, taxas de viabilidade e sobrevivência, médias máximas do peso e comprimento de *C. macellaria* são apresentados na Tabela 1. Como esperado, a temperatura influenciou significativamente o tempo de desenvolvimento de *C. macellaria* ($F = 2,25$; $p = 0,0204$). A partir dos resultados observados em relação ao tempo de desenvolvimento, ganho de massa corpórea e taxa de sobrevivência, é possível predizer que a faixa térmica ótima para o desenvolvimento dessa espécie está entre 27,5 e 32,5°C. O tempo de desenvolvimento das larvas e das pupas diminuiu progressivamente com o aumento da temperatura. Enquanto em 15°C o desenvolvimento larval foi de 348 h, em 40°C foi de 72 h (Figura 2). Já para pupas, o tempo de desenvolvimento variou de 312 h em 15°C a 72 h em 37,5°C. Em 40°C as pupas não se desenvolveram. O tempo de desenvolvimento total de larvas e pupas variou de 696 h em 15°C e 156 h em 32,5; 35 e 37,5°C.

A massa corporal máxima adquirida pelas larvas aumentou com a temperatura, atingindo o valor máximo de 70,2 ± 3,5 mg a 37,5 °C, mas diminuiu a 40°C (56,7 ± 2,5 mg) (Figura 2). O comprimento corporal seguiu uma tendência semelhante, com o maior valor registrado em 37,5 °C (17,21 ± 0,73 mm), e redução para 15,47±0,62 em 40°C (Figura 3).

As taxas de viabilidade larval e sobrevivência de adultos mostraram um padrão variável. As temperaturas intermediárias (27,5°C a 30°C) apresentaram maior sobrevivência larval (94,1%) e maiores taxas de viabilidade (67,8% e 55,3%, respectivamente). Em temperaturas extremas, como 15°C (33,3%) e 40°C (8,8%), a viabilidade foi consideravelmente menor.

3.3.3 Equações de desenvolvimento

As equações de regressão linear entre o tempo (x) e a massa corpórea (y) para as diferentes temperaturas avaliadas são apresentadas na Tabela 2. Em temperaturas mais baixas (15 e 17,5ºC), os coeficientes angulares foram menores, refletindo um ganho de massa e comprimento mais lento, enquanto os valores de R^2 mais elevados indicam um padrão de crescimento mais estável. Isso ocorre porque, em condições térmicas menos favoráveis, as larvas demandam mais acúmulo de graus-dia para se desenvolver, resultando em uma variação menos abrupta entre medições sucessivas. Por outro lado, temperaturas intermediárias e altas (27,5 a 40ºC) apresentam inclinações mais acentuadas (coeficientes angulares mais altos), mas com menores valores de R^2.

A equação para 15ºC (R^2 = 0,9372) foi a que mais se adequou aos dados apresentados de massa corpórea, bem como para o comprimento larval, indicando que essa temperatura favorece o crescimento previsível. Por outro lado, a temperatura de 37,5ºC apresentou o menor coeficiente de determinação na equação linear para massa corpórea (R^2 = 0,3654), seguido do coeficiente da equação linear para comprimento em 40°C (R^2 = 0,132), reforçando a hipótese de que altas temperaturas podem gerar instabilidade no desenvolvimento larval.

Já nas equações de regressão linear entre o tempo (x) e o comprimento larval (y), a equação que mais se adequa a curva de desenvolvimento foi para 17,5°C (R^2=0,8454), enquanto a que menos alcançou os dados analisados foi a equação obtida para 40°C (R^2= 0,1362).

Uma análise mais detalhada do R^2 (Tabela 2) revela que as predições baseadas na

massa corpórea apresentam maior precisão em comparação às realizadas com base no comprimento larval, independentemente das faixas de temperatura avaliadas.

3.4 Discussões

O limiar mínimo de desenvolvimento é essencial para o cálculo de graus-hora acumulados (ADH), amplamente utilizado para estimar parâmetros como o Período de Atividade dos Insetos (PAI) e, consequentemente, o Intervalo Pós-Morte (IPM). Na literatura, costuma-se adotar o limiar mínimo de 10°C para os cálculos de ADH em *C. macellaria* (Higley e Haskell, 2001). Entretanto, considerando que o ciclo de vida da espécie não se completa em temperaturas de 12,5°C, uma investigação mais precisa sobre o limiar mínimo real pode ser necessária, a fim de minimizar variações e melhorar a confiabilidade das estimativas de PAI e IPM.

Na maioria das vezes, o tempo de incubação registrado neste estudo foi similar àqueles reportados por outros autores, uma vez que essa fase do desenvolvimento não é influenciada pelo substrato de alimentação das larvas. Por exemplo, Dale e Prudot (1987) registraram um intervalo entre 12h e 13h a 28°C, Vélez e Wolff (2008) de aproximadamente 15h a 25,3°C, e Byrd e Butler (1996) de 12h em 25ºC.

Por outro lado, fatores intrínsecos, como variações genéticas e adaptações locais, podem influenciar o tempo de incubação (Defilippo et al, 2017). Os resultados de Vélez e Wolff (2008) e Álvarez-García et al., (2017), cujos dados foram consistentes com os nossos em temperaturas próximas a 30ºC, sugerem que populações semelhantes produzem dados comparáveis. Contudo, diferenças mais notáveis foram observadas em relação aos dados de Melvin (1934), possivelmente devido a diferenças nas origens geográficas. Por exemplo, em 17,7°C, Melvin (1934) registrou 33h de incubação, enquanto o nosso foi de 29h (17,5°C). Já em temperaturas acima de 20ºC, os tempos de incubação observados por Melvin (1934) foram menores que os obtidos aqui neste estudo, sendo de 22h (20,5°C), 16h (23,3°C), 12h (26°C), 9h (28,8°C), 8h (31,7°C), 7h (34,4°C), 6,6h (37,3°C) e 6,7h (40°C). Essas diferenças ressaltam que, mesmo sob condições controladas, a dinâmica do desenvolvimento pode variar entre linhagens, tornando importante a caracterização bionômica regional para aplicações forenses mais precisas. A exceção foi observada no limiar máximo (42,5ºC), em qua ambas as populações não eclodiram.

Quanto ao tempo de desenvolvimento larval e pupal, nossos resultados mostraram-se próximos aos de Byrd e Butler (1996), que relataram 104h para o estágio larval e 125h para o estágio pupal a 25°C. Em nosso estudo, observamos 120h para ambos os estágios nessa mesma temperatura. Além disso, nossos dados foram consistentes com os de Álvarez-García et al. (2017), que registraram 82,5h para o desenvolvimento larval e 95,19h para o estágio pupal a 29,14°C, enquanto obtivemos 84h e 96h, respectivamente. Nesse estudo, o tempo total de desenvolvimento (ovo a adulto) foi de 189,8h, valor próximo ao obtido em nosso experimento a 30°C, que foi de 193h.

Por outro lado, observamos diferenças significativas em relação aos resultados de Vélez e Wolff (2008), que reportaram tempos de desenvolvimento total de 256h a 25,3°C e 191,45h a 30,7°C, enquanto em nosso estudo os tempos foram de 120h a 25°C e 84h a 30°C. A diferença também é visível quando comparamos temperaturas próximas com os dados de Boatright e Tomberlin (2010), que obtiveram tempo de desenvolvimento larval de 156h, 132h e 108h para 20,8; 24,3 e 28,2°C, respectivamente. Enquanto isso, obtivemos um desenvolvimento mais lento em 20°C (192h), mas mais rápido em 25 e 30°C, sendo de 120h e 84h, respectivamente.

Nos estudos comparados anteriormente, observou-se que, embora o tempo de incubação seja relativamente pouco variável, ele ainda desempenha um papel crucial no cálculo do PAI e na estimativa do IPM (Bourel et al., 2003; Sharma et al., 2015). No entanto, as diferenças significativas nos tempos de desenvolvimento pós-embrionário observados neste estudo podem ser atribuídas principalmente ao tipo de substrato utilizado na alimentação dos estágios imaturos. Boatright e Tomberlin (2010) não encontraram diferenças significativas no tempo de desenvolvimento de imaturos de *C. macellaria* criados em substratos como glúteo equino e lombo suíno, ambos compostos por músculo estriado. De forma semelhante, nossos resultados não divergem tanto quando comparados aos estudos de Byrd e Butler (1996) e Álvarez-García et al. (2017), que utilizaram músculo suíno e bovino, respectivamente, como substratos. Contudo, nossos resultados divergem significativamente dos obtidos por Dale e Prudot (1987) e Vélez e Wolff (2008), que utilizaram peixe e fígado bovino, respectivamente, como substratos. Essas discrepâncias sugerem que a composição e o tipo de substrato podem influenciar diretamente o desenvolvimento dos imaturos (Thyssen et al., 2014).

Quanto às equações de regressão linear, os resultados indicaram que os modelos apresentaram melhor desempenho na predição da massa corpórea e do comprimento larval de

C. macellaria em faixas de temperaturas mais baixas, conforme também observado por Nassu et al. (2014). Isso é consistente com estudos que sugerem que temperaturas mais baixas proporcionam um crescimento uniforme devido ao metabolismo reduzido dos insetos ectotérmicos. Por outro lado, temperaturas intermediárias e altas (27,5 a 40°C) apresentam inclinações mais acentuadas (coeficientes angulares mais altos), mas com menores valores de R^2, sugerindo maior variabilidade no desenvolvimento larval. Este padrão pode ser explicado por fatores como estresse térmico em temperaturas mais altas, o que leva a diferenças significativas no metabolismo e na sobrevivência.

Agradecimentos. Registro de acesso do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) #A8D7C44. Todas as coletas foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) por meio do Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO), processos #86367-1.

Contribuição dos autores. Todos os autores contribuíram para a concepção e delineamento do estudo. A preparação do material e a coleta de dados foram realizadas por MDG e GSZ. As análises de dados foram realizadas por todos os autores. A versão preliminar do manuscrito foi escrita por MDG e GSZ e todos os autores comentaram as versões subsequentes. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Financiamento. PJT foi apoiada pelo CNPq (Conselho Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por meio bolsa de produtividade em pesquisa (#308832/2020–5) e pela FAPESP (#2022/09029-0).

Declarações

Conflito de interesses: os autores declaram não haver conflitos de interesses.

3.5 Referências

Álvarez García, DM., Pérez-Hérazo, A, e Amat, E. (2017). Life history of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera, Calliphoridae), a blowfly of medical and forensic importance. Neotropical Entomology, 46: 606-612.

Boatright, SA., e Tomberlin, JK. (2010). Effects of temperature and tissue type on the development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Journal of Medical Entomology, 47: 917-923.

Borror, DJ, DeLong, D (1969) Introdução ao Estudo dos Insetos. São Paulo: Ed. Edgard Blucher.

Bourel B, Callet B, Hédouin V, Gosset D (2003) Flies eggs: a new method for the estimation of short-term post-mortem interval? Forensic Sci Int 135:27–34.

Brundage, A. (2020). Diptera development: a forensic Science perspective. In: Life cycle and development of Diptera. London: IntechOpen.

Busvine JR (1980) Insects and hygiene. In: Chapman and Hall, The biology and control of insect pests of medical and domestic importance. 3rd ed. London. Pp. 568.

Byrd, J. H., e Butler, J. F. (1996). Effects of temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) development. Journal of Medical Entomology, 33: 901-905.

Catts EP, Goff ML (1992) Forensic entomology in criminal investigations. Annu Rev Entomol 37: 253-272.

Dale W, Prudot E (1987) Apuntes sobre la biología de las moscas Calliphoridae en la costa central peruana. Rev Peru Entomol 29: 105-111

Ferrar P (1987) A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera Cyclorrhapha. Copenhagen: EJ Brill/Scandinavian Science Press.

Greenberg, B, Szyska, ML (1984) Immature Stages and Biology of Fifteen Species of Peruvian Calliphoridae (Diptera), Annals of the Entomological Society of America, 77: 488–517, https://doi.org/10.1093/aesa/77.5.488

Grella MD, Thyssen PJ (2011) Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. Disponível em: http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil.

Guimarães JH, Papavero N (1999) Myiasis in man and animals in the Neotropical region. São Paulo: Plêiade, FAPESP. pp308.

Hall RD, Doisy KE (1993) Length of time after death—effect on attraction and oviposition or larviposition of midsummer blow flies (Diptera:Calliphoridae) and flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) of medicolegal importance in Missouri. Ann Entomol Soc Am 86: 589–593

Higley L, Haskell N (2001) Insect development and forensic entomology. In: Byrd J, Castner J (eds) Forensic entomology the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, USA, pp 287–300

Melvin, R. (1934). Incubation period of eggs of certain muscoid flies at different constant temperatures. Annals of the Entomological Society of America, 27: 406-410.

Mohr, R. M., e Tomberlin, J. K. (2015). Development and validation of a new technique for estimating a minimum postmortem interval using adult blow fly (Diptera: Calliphoridae) carcass attendance. International Journal of Legal Medicine, 129: 851-859.

Nassu, M. P., Thyssen, P. J., e Linhares, A. X. (2014). Developmental rate of immatures of two fly species of forensic importance: *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* and *Microcerella halli* (Diptera: Sarcophagidae). Parasitology Research, 113: 217-222.

Oliveira-Costa, J. (2011). Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios. Campinas, Ed. Millenium, pp502.

R Core Team. (2017). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. https://www.R-project.org/

Sharma, R., Garg, R. K., e Gaur, J. R. (2015). Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. Egyptian Journal of Forensic Sciences, 5: 1-12.

Thyssen, PJ. (2011). Entomologia Forense. In: Marcondes CB (org.) Entomologia Médica e Veterinária. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu. p. 129-137.

Thyssen, PJ, Souza, CM, Shimamoto, PM, Salewski, TDB, Moretti, TC. (2014). Rates of development of immatures of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) reared in different types of animal tissues: implications for estimating the postmortem interval. Parasitology Research, 113: 3373-3380.

Vélez, MC., e Wolff, M (2008). Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. Papéis Avulsos de Zoologia, 48: 41-47.

Figura 1. Tempo médio (h) de incubação de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) sob diferentes faixas de temperaturas controladas.

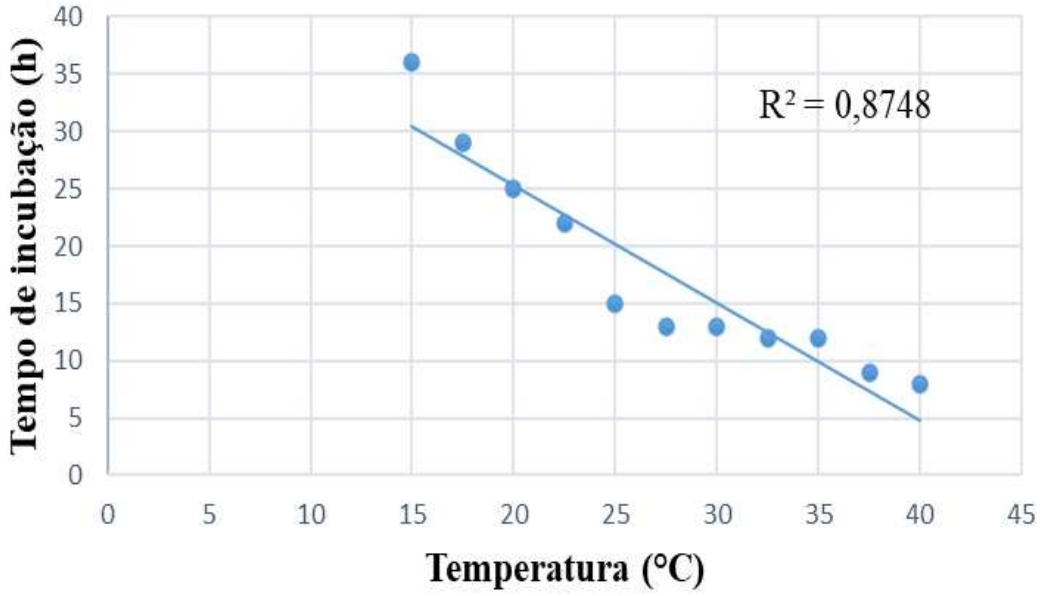


Figura 2. Massa corporal média (mg) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob diferentes faixas de temperaturas controladas.

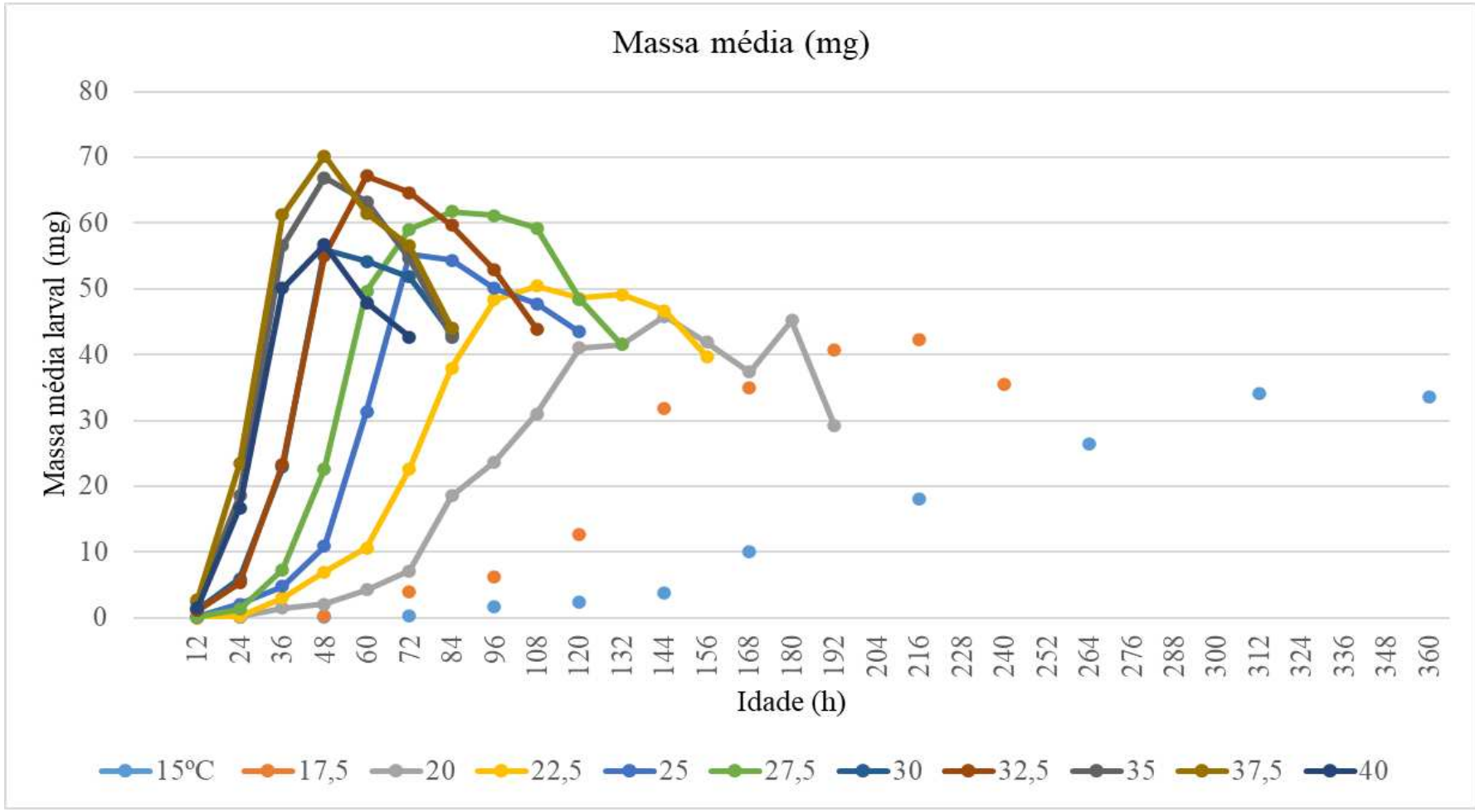


Figura 3. Comprimento médio (mm) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criadas sob diferentes faixas de temperaturas controladas.

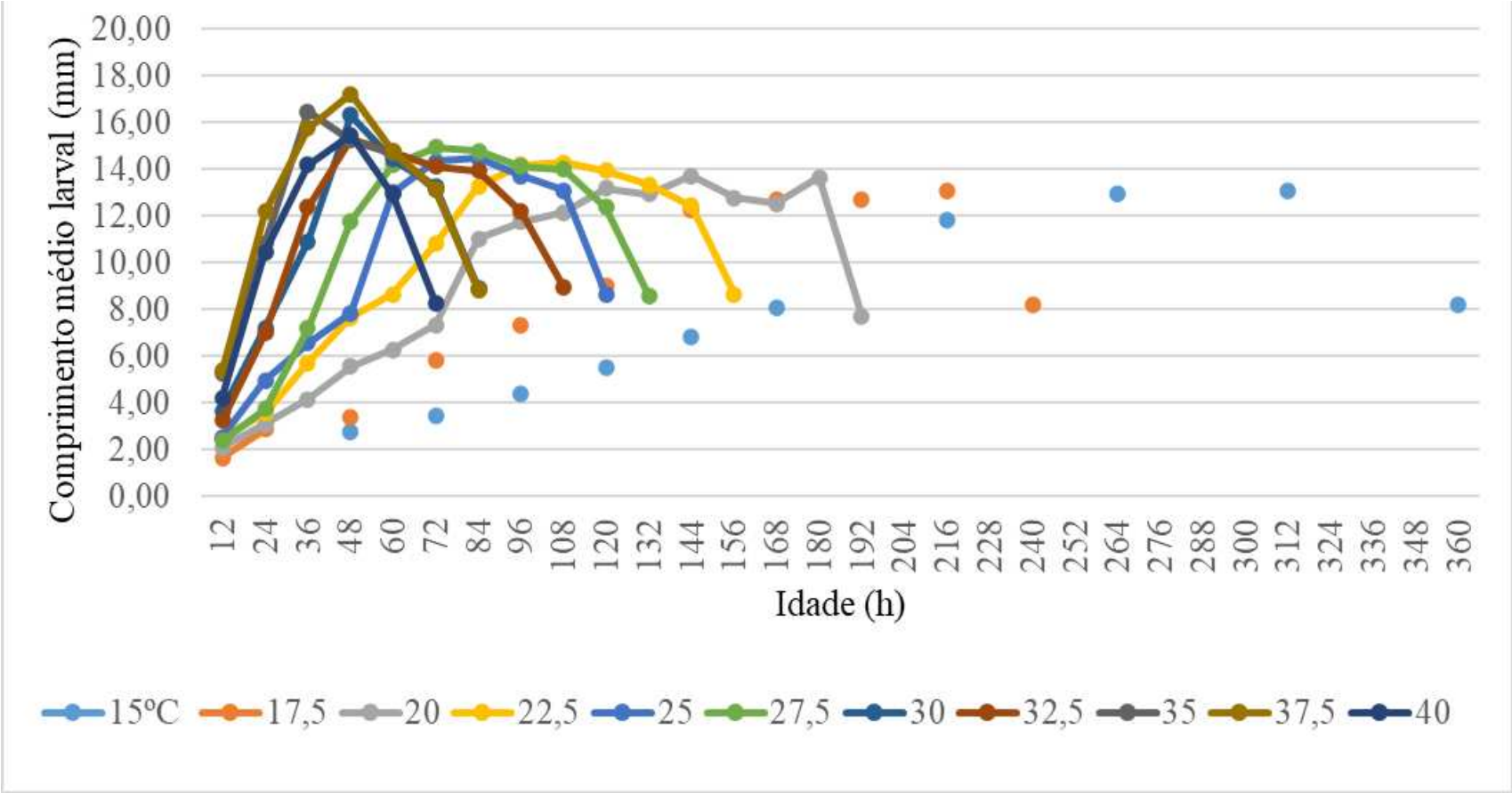


Tabela 1. Tempo de desenvolvimento (h), taxa de sobrevivência (%) e massa corporal (mg) e comprimento (mm) máximo de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) mantida sob diferentes temperaturas (ºC) controladas. Notar que: *Não completou o desenvolvimento neste estágio de vida; N.A. significa que o parâmetro não foi avaliado.

Parâmetros	**Temperaturas (±1ºC)**										
	15	**17,5**	**20**	**22,5**	**25**	**27,5**	**30**	**32,5**	**35**	**37,5**	**40**
Tempo de desenvolvimento:											
Ovo	36	29	25	22	15	13	13	12	12	9	8
Larval	348	240	192	156	120	132	84	84	84	84	72*
Pupa	312	264	216	132	120	96	96	72	72	72	N.A.
Ovo-adulto	696	533	433	310	255	241	193	168	168	165	N.A.
Taxa de sobrevivência:											
Larval	10,0	37,8	36,2	46,2	44,2	60,7	67,8	47,8	55,3	72,7	N.A.
Adultos emergidos	33,3	72,3	83,4	80,7	91,9	87,5	94,1	86,0	85,1	68,8	N.A.
Massa corporal:	34,1	42,3	45,8	50,5	55,3	61,7	51,8	67,1	66,9	70,2	56,7
Comprimento:	13,1	13,1	13,7	14,3	14,5	14,9	16,3	15,3	16,5	17,2	15,5

Tabela 2. Equações de regressão e coeficientes de determinação (R^2) que expressam a relação entre tempo de desenvolvimento e massa corpórea em diferentes temperaturas (T em ºC) para a espécie *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae).

	Equações de regressão linear/ R^2	
T (ºC)	**Relação idade *vs* massa corpórea**	**Relação idade *vs* comprimento**
15	y = 0,1207x - 8,1444; R^2 = 0,9372	y = 0,03018x + 2,2473; R^2= 0,7051
17,5	y = 0,2161x - 7,1927; R^2 = 0,8841	y = 0,0464x + 2,4888; R^2 = 0,8454
20	y = 0,2835x - 5,7496; R^2 = 0,7998	y = 0,0571x + 3,5600; R^2 = 0,6300
22,5	y = 0,4048x - 5,9563; R^2 = 0,8080	y = 0,0665x + 4,3523; R^2 = 0,5654
25	y = 0,5503x - 63013; R^2 = 0,7495	y=0.0852x+4.2967; R^2= 0,5077
27,5	y = 0,4853x + 2,5391; R^2 = 0,6007	y=0.0692x+5.7611; R^2= 0,3653
30	y = 0, 7414x - 1,9857; R^2 = 0,6759	y = 0,0932x + 6,2043; R^2 = 0,2018
32,5	y = 0,5498x + 8,4581; R^2 = 0,5113	y = 0,0558x + 7,9703; R^2 = 0,2018
35	y = 0,5940x + 15,064; R^2 = 0,4019	y = 0,0411x + 10,11; R^2 = 0,07141
37,5	y = 0,5672x + 18,454; R^2 = 0,3654	y = 0,0338x + 10,8510; R^2 = 0,0446
40	y = 0,7279x + 5,3647; R^2 = 0,5626	y = 0,0688x + 8,0367; R^2 = 0,1362

4 CAPÍTULO 2- O efeito de temperaturas flutuantes sobre a taxa de desenvolvimento da espécie de importância forense Cochliomyia macellaria (F.) (Insecta, Diptera, Calliphoridae)

GABRIELA S. ZAMPIM[1], MAICON D. GRELLA[1], GIOVANNA M. YOSHIDA[1,2], SAMARA FLAMINI KIIHL[2], PATRICIA J. THYSSEN[1#]

[1] Laboratório de Entomologia Integrativa, Departamento de Biologia Animal, IB, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, CP 13083-862, São Paulo, Brasil.

[2] Departamento de Estatística, IMECC, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, CP 13083-862, São Paulo, Brasil.

Resumo

A entomologia forense é uma área das ciências forenses que utiliza o estudo de insetos e outros artrópodes para obter informações relevantes em processos legais, como a determinação do intervalo pós-morte (IPM). Dentre os organismos que colonizam cadáveres, os dípteros da família Calliphoridae, especialmente *Cochliomyia macellaria*, destacam-se devido à sua abundância, capacidade de rápida colonização e ampla distribuição geográfica no Brasil. Deste modo, o presente estudo investigou o impacto da alternância de temperaturas no desenvolvimento de *C. macellaria* em condições controladas de laboratório, visando compreender melhor as flutuações na temperatura influenciam o desenvolvimento larval e sua aplicação em estimativas forenses. Colônias de *C. macellaria* foram estabelecidas a partir de coletas realizadas em campo, utilizando armadilhas com iscas de vísceras em decomposição. Os ovos obtidos de F1 (N=250) foram transferidos para recipientes contendo músculo suíno moído e submetidos a diferentes pares de temperaturas flutuantes (25/30°C e 17,5/32,5°C) e suas respectivas temperaturas médias (27,5°C e 25ºC). A massa corpórea e o comprimento das larvas foram obtidos a cada 12h, desde a eclosão até a pupariação. Os dados obtidos foram analisados por meio de regressões para estimar taxas de desenvolvimento e comparações entre os regimes de temperatura utilizando o teste de χ^2. Os resultados demonstraram que o tempo de desenvolvimento larval sob temperaturas flutuantes foi de 120h em ambos os pares, enquanto sob as temperaturas médias controladas variou de 120h (25ºC) a 132h (27,5°C). No par de temperaturas flutuantes de 25/30°C o tempo total de desenvolvimento foi de 253h enquanto que no par 17,5/32,5°C foi de 240h. Os resultados obtidos neste estudo permitem ampliar o conhecimento sobre o efeito da temperatura no desenvolvimento de *C. macellaria*, assim como contribui para assegurar o cálculo de estimativas mais confiáveis do IPM.

Palavras-chaves: moscas varejeiras; intervalo pós-morte; modelos de predição

4.1 Introdução

O intervalo pós-morte (IPM) é o período compreendido entre a morte de um organismo e a descoberta do cadáver (Benecke, 2001). Determinar o IPM é uma tarefa fundamental em investigações criminais, pois pode fornecer informações cruciais para esclarecer a cronologia de eventos relacionados a um crime (Benecke, 2001). No entanto, a precisão dessa estimativa depende de múltiplos fatores, como condições ambientais, estágio de decomposição e métodos científicos aplicados (Campobasso et al., 2001).

Na entomologia forense, a estimativa do IPM baseia-se frequentemente na análise do desenvolvimento do inseto encontrado no cadáver, denominado de IPM mínimo (Catts e Goff, 1992), ou na sucessão de insetos necrófagos (Mégnin, 1894), denominado IPM máximo. Os dípteros da família Calliphoridae se destacam nesse contexto devido à sua abundância, rápida colonização de cadáveres e ciclo de vida bem documentado (Carvalho et al., 2004). Entre eles, *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) (Fabricius, 1775) ganha destaque, pois está amplamente distribuída e frequentemente associada a corpos em decomposição em regiões tropicais e subtropicais (Álvarez García *et al*., 2017; Oliveira-Costa e Mello-Patiu, 2004; Oliveira e Vasconcelos, 2010; Meira et al., 2020, Guimarães, 2022), além de ser uma das espécies pioneiras na colonização póstuma (Kotzé e Tomberlin, 2019).

Os padrões de colonização associados ao desenvolvimento dos insetos, são influenciados por variáveis ambientais, especialmente a temperatura (Busvine, 1980). Isso porque os insetos são organismos ectotérmicos, tendo seu metabolismo dependente diretamente da temperatura do ambiente. Enquanto temperaturas mais altas aceleram o seu tempo de desenvolvimento, temperaturas mais baixas tendem a prolongá-lo (Ames Turner, 2003).

Embora muitos estudos enfoquem o desenvolvimento larval em condições de temperatura constantes (e.g. Nassu et al., 2014; Alonso et al., 2015; Lecheta et al., 2015), ainda há uma lacuna significativa na literatura sobre o impacto de flutuações térmicas nesse processo, que refletem de forma mais realista as condições ambientais naturais (Byrd e Butler, 1996; Chen et al., 2019).

Historicamente, métodos como a regressão linear têm sido amplamente utilizados para estimar o IPM com base no desenvolvimento de insetos (Wagner et al., 1984). Embora sejam relativamente simples, esses métodos apresentam limitações significativas, especialmente em cenários onde o crescimento dos insetos é influenciado por variações ambientais não lineares. A regressão linear assume uma relação constante e previsível entre as

variáveis (Caffo, 2015), o que pode não representar adequadamente as flutuações de temperatura e suas interações complexas com o crescimento dos insetos. Isso porque, após a eclosão das larvas há um aumento em sua massa e comprimento, mas é sucedido por uma queda no momento de precede a pupariação (Thyssen, 2005). Neste contexto, os B-splines surgem como uma abordagem promissora, já que permitem modelar relações não lineares de forma mais precisa (Talebitooti et al., 2015), capturando padrões de crescimento complexos e ajustando variações associadas a fatores ambientais dinâmicos.

Assim, no presente estudo objetivou-se avaliar o efeito de temperaturas flutuantes sobre a taxa de desenvolvimento de *C. macellaria* em condições controladas de laboratório. Adicionalmente, foi proposto o uso de B-splines para estimar o IPM levando em conta a maior flexibilidade deste método e em busca de maior precisão ao proporcionar intervalos de confiança mais robustos o que, consequentemente, pode gerar estimativas mais próximas da realidade.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Consulta à base de dados climáticos e seleção das temperaturas chaves

Uma consulta às bases de dados meteorológicos do Instituto Nacional de Meteorologia (INPE, 2021) foi conduzida para acessar os dados de temperatura mínima, máxima e média compensada registrados, diariamente, no ano de 2021 para a região Sudeste do Brasil. Os dados foram organizados em uma tabela e as médias referentes aos períodos demarcados do ano foram calculadas para obter um perfil térmico relativo ao período diurno e noturno. Adicionalmente, o intervalo de horário ao qual o imaturo foi exposto a temperaturas máximas e mínimas foi calculado com base em sua duração durante o dia, como proposto por Chen et al. (2019), podendo apresentar amplitudes de até 15ºC a depender da época do ano. Diante disso, foram consideradas para avaliação os seguintes pares de temperaturas para o estudo de desenvolvimento sob condições flutuantes: 25−30±1ºC, 27,5−32,5±1ºC.

4.2.2 Estabelecimento de colônias de moscas no laboratório

Adultos de *Cochliomyia macellaria* foram coletadas ativamente em campo (22°49'03"S; 47°04'11"W) utilizando iscas putrefeitas preparadas 48h antes (fígado de galinha e bovino). Após a coleta, os espécimes foram anestesiados a -20°C por 3 min, identificados

conforme descrito por Grella e Thyssen (2011) e acondicionados em gaiolas plásticas mantidas sob condições controladas (25±1°C, 70±10% UR e fotoperíodo de 12h). Os adultos foram alimentados com uma dieta composta por açúcar, levedo de cerveja e leite em pó integral na proporção de 1:1:1, além de água *ad libitum*. para manutenção e estabelecimento de colônia. Em F1, após os adultos apresentarem o comportamento de cópula, foi oferecida uma porção de 50 g de carne suína moída por um período de até 3h para estimular a postura.

4.2.3 Grupos experimentais

Os ovos obtidos foram contados (N=750) e transferidos para triplicatas contendo carne suína fresca moída em uma proporção de 1g/ovo. Para avaliar o tempo de incubação dos ovos, triplicatas foram levadas às câmaras climáticas modelo Eletrolab® EL202/4, tendo as temperaturas sido ajustadas em temperaturas controladas de 25 e 27,5°C; e temperaturas flutuantes de 25/30°C e 17,5/32,5°C, 70±10% UR, fotoperíodo 14:10h. Após a eclosão, 10 larvas foram retiradas de um dos recipientes ao acaso a cada 12h. As amostras retiradas foram submersas em água a 70ºC e conservadas em solução de Kahle (Borror e DeLong, 1969). A massa corporal (mg) foi aferida através de uma balança analítica modelo Scientech® SA 210 enquanto o comprimento (mm) foi determinado utilizando uma câmara digital acoplada em uma lupa Zeiss® Discovery V.12, com sistema de captura de imagens AxioCam 5.0 e software ZEN versão 2.0.

Paralelamente, triplicatas adicionais foram mantidas sob as mesmas condições para posterior obtenção da taxa de sobrevivência larval e emergência dos adultos.

4.2.4 Análise dos dados

Análise estatística. Os resultados foram analisados através de ANOVA de um fator, utilizando o software Rstudio® (R Core Team, 2019), com o intuito de testar o efeito dos

diferentes regimes térmicos no tempo de desenvolvimento. As variáveis tempo, massa e comprimento foram analisadas como independentes e posteriormente como dependentes a fim de encontrar a melhor combinação para estimativa de IPM. Uma análise de regressão linear inversa e regressão linear múltipla foram conduzidas para comparar a relação entre duração de desenvolvimento e graus-hora acumulados (GHA). O nível de significância de 5% ($p \leq 0,5$) foi considerado para todas as análises.

Modelo de regressão linear inversa. A partir da massa e comprimento obtidos através dos experimentos com imaturos desenvolvidos sob alternância de temperatura, buscou-se predizer sua idade a partir de uma regressão linear. A regressão linear pode ser explicada como uma relação entre duas ou mais variáveis, onde uma delas, a dependente (ou resposta), pode ser inferida pelas outras variáveis (independentes, preditoras ou regressoras) (Caffo, 2015).

Modelo de regressão linear múltipla. O modelo de regressão linear múltipla é uma técnica estatística utilizada para analisar a relação entre diversas variáveis independentes ($k > 1$) e uma variável dependente (Sen e Srivastava, 2012), e são representados pela fórmula:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \cdots + \beta_k x_{ik} + \varepsilon_i ,$$

onde:

$i = 1, \ldots, n$, com n sendo o número de observações

Y= variável dependente

β0= coeficiente angular da reta

β1= coeficiente angular 1

Xi1= variável independente 1

Uma das principais características do modelo de regressão linear múltipla é que ele

permite avaliar o impacto de cada variável independente na variável dependente. Neste caso, é possível utilizar a variável massa e comprimento concomitantemente para o cálculo do TOC.

B-spline. Caso aconteça de a curva não ser linear, o método mais eficaz para calcular a equação do crescimento é por B-spline. B-Spline significa Spline Básico (Knott, 2000) e é uma função polinomial Piecewise, definida por múltiplas subfunções aplicadas em subdomínios da variável x. Os pontos de interseção dessas subfunções são chamados de "nós". A propriedade principal das funções spline é que elas e suas derivadas devem ser contínuas nos nós.

As B-Splines de ordem n são funções básicas para splines de mesma ordem definidas pelos mesmos nós. Isso significa que todas as possíveis funções spline podem ser construídas por uma combinação linear de B-Splines, com uma única combinação para cada spline. As B-Splines permitem criar curvas suaves que passam por um número de pontos de controle, sendo amplamente utilizadas em métodos de otimização de formas para a criação e gestão de formas e superfícies complexas. Para comparar o ajuste de diferentes modelos, foi utilizado o R^2, cujo resultado varia de 0 a 1, indicando o quão bem o modelo se ajusta aos dados. Quanto mais próximo de 1, melhor é o ajuste.

4.3 Resultados

4.3.1 Taxa de desenvolvimento

Os tempos de desenvolvimento, massa e comprimento e estádio larval dos imaturos submetidos a faixas de temperaturas flutuantes e suas respectivas médias de temperaturas controladas podem ser observados nas Tabelas 1-6. É possível notar que em 25/30°C (Tabela 1) os tempos de incubação dos ovos foram iguais, mas o tempo de desenvolvimento larval obteve uma diferença de 12h a mais na média de 27,5°C, enquanto o tempo de pupa foi 24h

menor, resultando em um tempo total (de ovo a adulto) de 253h e 241h em 25/30°C e 27,5°C, respectivamente.

Em 17,5/32,5°C o tempo de incubação dos ovos foi de 12h, enquanto em sua respectiva média foi de 15h. Para essa temperatura flutuante, o tempo de desenvolvimento larval foi o mesmo que em sua média constante, de 120h. Já o tempo em pupa foi de 108h sob este par de temperatura flutuante, e de 120h para a média controlada em 25°C. Nesse caso, o tempo total de desenvolvimento foi de 240h em 17,5/32,5°C e 255h em 25°C.

A alternância de temperatura de 17,5/32,5°C quando comparada com sua respectiva média de 25°C, obteve um valor de F= 0,0122 e p= 0,9156. Enquanto a alternância de temperatura de 25/30°C quando comparada com sua respectiva média de 27,5°C obteve um valor de F= 0,0077 e p=0,9327, refutando portanto, a diferença de dados de imaturos criados sob temperaturas flutuantes e controladas.

4.3.2 Equações de desenvolvimento

As equações de regressão linear estão apresentadas junto com os gráficos de desenvolvimento nas figuras 1.A-4.A para a massa larval e figuras de 5.A-8.A para o comprimento larval. É possível notar que as equações respondem melhor aos dados de massa corpórea, com ambas apresentando R^2 acima de 0,5. Neste caso, a equação que mais se ajustou a curva foi a obtida para o desenvolvimento em 17,5/32,5°C, com R^2= 0,7408 (Figura 3.A). Em contrapartida, as equações lineares para comprimento se ajustaram pouco em relação aos dados, com o maior valor de R^2= 0,5164 para 17,5/32,5°C (Figura 7.A).

Quanto às equações polinomiais, que podem ser observadas nas figuras 1.B-4.B para a massa larval e figuras de 5.B-8.B para o comprimento larval. Nas curvas apresentadas é possível notar que o valor de R^2 foi acima de 0,8 para todas as curvas, e teve um ajuste melhor quando utilizados os dados de comprimento para o desenvolvimento a 27,5°C, com R^2= 0,9358 (Figura 6.B).

Entretanto, os valores de R^2 obtidos para a função B-spline (Figuras 1C-4C) quando considerada a massa corpórea foram maiores, se ajustando melhor à curva de desenvolvimento. O maior valor obtido de R^2= 0,9565, para o desenvolvimento na temperatura constante de 27,5°C (Figura 2.C), quando considerada a massa corpórea; e R^2=0,9597 para o desenvolvimento na temperatura flutuante de 17,5/32,5°C considerando o parâmetro comprimento (Figura 7.C).

Já para a regressão linear múltipla, R^2= 0,9128, porém com resíduos que variam muito ao longo do intervalo das preditoras.(Figura 11).

4.4 Discussões

Os resultados mostraram que as temperaturas flutuantes (25/30°C e 17,5/32,5°C) não diferiram significativamente de suas respectivas médias constantes (27,5°C e 25°C) em relação ao tempo total de desenvolvimento (F=0,0122 e p=0,9156 para 17,5/32,5°C; F=0,0077 e p=0,9327 para 25/30°C).

No regime 25/30°C, apesar do tempo de incubação dos ovos ser igual a sua respectiva constante de 27,5°C (13h), o estágio larval foi mais rápido na temperatura flutuante (120h) quando comparado a temperatura constante (132h), entretanto mais lento na fase de pupa (120h) do que na constante (96h). Esses resultados estão parcialmente alinhados com os de Dale e Prudot (1987), que, utilizando temperaturas semelhantes (24/32°C), observaram o mesmo tempo de incubação (13 h). Em contrapartida, os tempos de desenvolvimento larval e

pupa foram significativamente maiores, com uma média de 141h e 128h, respectivamente.

Para o regime 17,5/32,5°C, o tempo de incubação dos ovos foi de 12h a menos na alternância de temperatura em comparação com a média constante de 25°C. Além disso, o estágio pupal foi reduzido em 12h na temperatura flutuante. Esse padrão sugere que diferentes estágios do desenvolvimento podem apresentar sensibilidades distintas às oscilações térmicas. O tempo total de desenvolvimento no regime de 17,5/32,5°C foi de 240h, enquanto na média constante de 25°C foi de 255h, indicando que temperaturas flutuantes podem, em alguns casos, acelerar o ciclo de vida. Esse achado é consistente com observações de Byrd e Butler (1996), que também relataram efeitos semelhantes em regimes térmicos variáveis.

Byrd e Butler (1996), em um experimento semelhante, utilizaram temperaturas cíclicas, com médias de 15,6°C, 21,1°C, 26,7°C e 32,2°C, variando 5,5°C acima e abaixo dessas médias. Quando comparados com os resultados obtidos em temperaturas constantes por Zampim et al. (2025), observam-se diferenças significativas. Nas temperaturas cíclicas mais baixas (15,6°C e 21,1°C), o tempo de incubação dos ovos foi mais rápido do que em suas respectivas médias constantes, sendo de 32 horas e 12 horas, respectivamente. Em contraste, Zampim et al. (2025) registraram tempos de incubação de 36 horas a 15°C e 25 horas a 20°C. Por outro lado, nas temperaturas cíclicas mais altas (26,7°C e 32,2°C), houve um retardo no tempo de incubação, com 16 horas e 14 horas, respectivamente. Em comparação, Zampim et al. (2025) observaram tempos de incubação de 13 horas a 27,5°C e 12 horas a 32,5°C em condições de temperatura constante.

Dale e Prudot (1987), em um estudo com temperatura flutuante de 24-32°C obtiveram um tempo de incubação de 12-13h, semelhante ao nosso (13h). No entanto, os tempos de desenvolvimento obtidos para os próximos estágios foram significativamente maiores, variando de 141 a 209h para o estágio larval e 120 a 136h para o estágio de pupa. Nesse estudo, o tempo médio total de desenvolvimento de *C. macellaria*, isto é, de ovo a adulto, foi de 313h,

enquanto nosso tempo total na temperatura flutuante de 25/30°C foi de 253h. Essa diferença significativa no tempo total de desenvolvimento pode ser explicada pela diferença do substrato oferecido para a alimentação dos imaturos, que foi peixe (Thyssen et al., 2014).

Quanto aos modelos equacionais, o valor de R^2 superiores a 0,5 nas equações de regressão linear para massa corpórea em todos os regimes térmicos, sugere que a massa corpórea é mais previsível e menos suscetível a variações do que o comprimento, possivelmente devido à sua maior estabilidade como indicador de desenvolvimento. Isso porque os modelos lineares para comprimento apresentaram valores de R^2 consideravelmente menores (máximo de 0,5164), indicando que o comprimento é menos linearmente relacionado às variáveis preditoras.

Os modelos de regressão polinomial e B-spline demonstraram maior capacidade de ajuste, com R^2 ajustados acima de 0,8 tanto na massa corpórea quanto no comprimento. Esses modelos capturaram melhor a complexidade da relação entre os fatores térmicos e as características de desenvolvimento, capturando também o decréscimo na massa e comprimento larval no final do desenvolvimento, indicando a fase de pupariação.

Todos os modelos apresentaram resíduos pequenos, que variaram de -0,03 a 0,03 nas equações considerando a massa corpórea (Fig 9.A-C), e de -8 a 5.nas equações considerando o comprimento (Fig 10-A-C). Em contrapartida, o alto R^2 (0,9128) no modelo de regressão linear múltiplo, os resíduos ficaram amplamente distribuídos, variando de -30 a 30 (Fig 11) indicando que essa equação não captura completamente a relação entre as variáveis. Isso sugere a necessidade de explorar modelos não lineares ou incluir outros fatores ambientais.

Agradecimentos. Registro de acesso do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) #A8D7C44. Todas as coletas foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) por meio do Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO), processos #86367-1.

Contribuição dos autores. Todos os autores contribuíram para a concepção e delineamento do estudo. A preparação do material e a coleta de dados foram realizadas por MDG e GSZ. As análises de dados foram realizadas por todos os autores. A versão preliminar do manuscrito foi escrita por MDG e GSZ e todos os autores comentaram as versões subsequentes. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Financiamento. PJT foi apoiada pelo CNPq (Conselho Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por meio bolsa de produtividade em pesquisa (#308832/2020–5) e pela FAPESP (#2022/09029-0).

Declarações.

Conflito de interesses: os autores declaram não haver conflitos de interesses.

4.5 Referências

Alonso, MA. Souza, CM., Linhares, AX., Thyssen, PJ. (2015). Egg developmental time and survival of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) under different temperatures. J. Med. Entomol., 52: 551-556.

Álvarez-García, DM., Pérez-Hérazo, A, & Amat, E. (2017). Life history of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera, Calliphoridae), a blowfly of medical and forensic importance. Neotropical Entomology, 46: 606-612.

Ames, C., Turner, B. (2003). Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. Medical and Veterinary Entomology, 17: 178–186

Benecke, M. (2001). A brief history of forensic entomology. Forensic Science International 120: 2–114.

Borror, DJ, DeLong, D (1969) Introdução ao Estudo dos Insetos. São Paulo: Ed. Edgard Blucher.

Busvine JR (1980) Insects and hygiene. In: Chapman and Hall, The biology and control of insect pests of medical and domestic importance. 3rd ed. London. Pp. 568.

Byrd, J. H., & Butler, J. F. (1996). Effects of temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) development. Journal of Medical Entomology, 33: 901-905.

Caffo, B. (2015). Regression models for data science in R. A companion book for the Coursera Regression Models class.

Campobasso, CP., Vella, GD., Introna, F. (2001). Factors affecting decomposition and Diptera colonization, Forensic Science International, 120: 18– 27.

Carvalho, LML., Thyssen, PJ., Goff, ML., Linhares, AX. (2004). Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. Aggrawal's Int J Forensic Med Toxicol 5: 33-39.

Catts EP, Goff ML (1992) Forensic entomology in criminal investigations. Annu Rev Entomol 37: 253-272.

Chen, W., Yang, L., Ren, L., Shang, Y., Wang, S., Guo, Y. (2019). Impact of constant versus fluctuating temperatures on the development and life history parameters of *Aldrichina graham* (Diptera: Calliphoridae). Insects, 10: 184.

Dale W, Prudot E (1987) Apuntes sobre la biología de las moscas Calliphoridae en la costa central peruana. Rev Peru Entomol 29: 105-111

Grella MD, Thyssen PJ (2011) Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. Disponível em: http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil.

INPE. (2021) Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em <https://www.cptec.inpe.br/>

Knott, GD. (2000). Interpolating cubic splines (Vol. 18). Springer Science & Business Media.

Kotzé, Z., Tomberlin, JK. (2019). Influence of substrate age on oviposition behavior of a specialist carrion colonizer, *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol., 57: 686-690.

Lecheta, MC., Thyssen, P.J., Moura, MO. (2015). The effect of temperature on development

of *Sarconesia chlorogaster*, a blowfly of forensic importance. Forensic Sci. Med. Pathol., 11: 538-543.

Leitão-Filho, H., Morelatto, PC. (1995). Ecologia e preservação de uma área de floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra. 1ª ed. Campinas: Ed. UNICAMP.

Megnin, J. (1894). La faune des cadavres: application de l'entomologie a la medecine legale. Encyclopédie Scientifique des Aides Memoires. Masson et Gauthiers-Villars, Paris, pp214.

Nassu, M. P., Thyssen, P. J., & Linhares, A. X. (2014). Developmental rate of immatures of two fly species of forensic importance: *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* and *Microcerella halli* (Diptera: Sarcophagidae). Parasitology Research, 113: 217-222.

R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. https://www.R-project.org/

Sen, A., & Srivastava, M. (2012). Regression analysis: theory, methods, and applications. Springer Science & Business Media.

Talebitooti, R., Shojaeefard, M. H., & Yarmohammadisatri, S. (2015). Shape design optimization of cylindrical tank using b-spline curves. Computers & Fluids, 109: 100-112.

Thyssen, PJ. (2005). Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense. CampinasSP. Universidade de Estadual de Campinas, São Paulo, Tese de Doutorado, pp116.

Thyssen, PJ, Souza, CM, Shimamoto, PM, Salewski, TDB, Moretti, TC. (2014). Rates of development of immatures of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) reared in different types of animal tissues: implications for estimating the postmortem interval. Parasitology Research, 113: 3373-3380.

Wagner, TL., Wu, HI., Sharpe, PJ., Schoolfield, RM., Coulson, RN. (1984). Modeling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. Annals of the Entomological Society of America, 77: 208-220.

Zampim, G.S.; Grella, M. D.; Thyssen, P.J. (2025). Avaliação da taxa de desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria* (F.) (Insecta, Diptera, Calliphoridae) sob temperaturas controladas.

Tabela 1. Tempo de desenvolvimento (h), taxas de sobrevivência larval e de pupas (%) e massa corporal (mg) e comprimento (mm) máximo de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criada sob faixas de temperaturas flutuantes de 25/30°C e sua respectiva temperatura média. Notar: N.A.= não avaliado.

Parâmetros	**Temperaturas (±1°C)**	
Tempo de desenvolvimento (h)	**25-30°C**	**27,5°C**
Ovo	13	13
Larval	120	132
Pupa	120	96
Ovo-adulto	253	241
Taxa de sobrevivência (%)		
Larval	N.A.	60,7
Adultos emergidos	N.A.	87,5
Massa corporal (X±DP) máxima adquirida (mg)		
Larva	49,09±4,7	61,7±2,6
Comprimento corporal (X±DP) máximo adquirido (mm)		
Larva	14,90±0,6	14,94±0,58

Tabela 2. Tempo de desenvolvimento (h), taxas de sobrevivência larval e de pupas (%) e massa corporal (mg) e comprimento (mm) máximo de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criada sob faixas de temperaturas flutuantes de 17,5/32,5°C e sua respectiva temperatura média. Notar: N.A.= não avaliado.

Parâmetros	**Temperaturas (±1°C)**	
Tempo de desenvolvimento (h)	**17,5-32,5°C**	**25°C**
Ovo	12	15
Larval	120	120
Pupa	108	120
Ovo-adulto	240	255
Taxa de sobrevivência (%)		
Larval	N.A.	44,2
Adultos emergidos	85,06	91,9
Massa corporal (X±DP) máxima adquirida (mg)		
Larva	53,26±3,2	55,3±6,2
Comprimento corporal (X±DP) máximo adquirido (mm)		
Larva	14,88±0,6	14,48±0,32

Tabela 3. Massa corporal média (mg) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criada sob faixa de temperaturas flutuantes de 25/30ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

Tempo (h)	**Temperaturas (ºC)**	
	25-30 ± 1	**27,5± 1**
12	2,7 ± 0,436	0,14 ± 0,01
24	3,19 ± 0,775	1,31 ± 0,29
36	6,13 ± 1,432	7,28 ± 1,17
48	31,58 ± 5,806	22,67 ± 3,66
60	45,98 ± 2,856	49,65 ± 5,76
72	49,09 ± 4,719	59,05 ± 6,24
84	47,73 ± 7,398	61,79 ± 2,62
96	46,78 ± 5,029	61,17 ± 4,88
108	45,72 ± 3,395	59,27 ± 5,90
120	37,68 ± 3,322	48,41 ± 4,12
132	-	41,56 ± 4,27
ANOVA: F= 0,347; p= 0,563		

Tabela 4. Massa corporal média (mg) de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criada sob faixa de temperaturas flutuantes de 17,5/32,5ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

Tempo (h)	**Temperaturas (ºC)**	
	17,5-32,5±1	**25±1**
12	1,167± 0,321	0,14 ± 0,01
24	1,23± 0,306	2,12 ± 0,31
36	2,77± 0,595	4,77 ± 1,23
48	15,55± 2,742	10,91 ± 3,30
60	18,55± 3,922	31,40 ± 4,98
72	48,42± 5,7	55,30 ± 6,25
84	51,87± 5,079	54,32 ± 4,57
96	53,26± 3,19	50,05 ± 3,38
108	48,4± 4,185	47,73 ± 4,30
120	41,87± 2,582	43,46 ± 2,75
ANOVA: F= 0,0282; p= 0,8685		

Tabela 5. Comprimento (mm) médio de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criada sob faixa de temperaturas flutuantes de 25/30ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

Tempo (h)	**Temperaturas (ºC)**	
	25-30±1	**27,5±1**
12	2,1245± 0,25361223	2,39 ± 0,48
24	4,5512± 0,45403421	3,77 ± 0,84
36	6,188± 0,579483678	7,18 ± 0,63
48	13,1772± 0,60423943	11,78 ± 1,04
60	14,6053± 0,387138807	14,18 ± 0,92
72	14,9008± 0,635890417	14,94 ± 0,58
84	13,6542± 0,944902323	14,79 ± 0,37
96	12,8585± 0,668696784	14,12 ± 0,83
108	13,4257± 0,733328492	14,00 ± 0,64
120	8,471± 0,241258736	12,39 ± 0,85
132	-	8,60 ± 0,33
ANOVA: F= 0.0293; p=0.8659		

Tabela 6. Comprimento (mm) médio de larvas de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) criada sob faixa de temperaturas flutuantes de 17,5/32,5ºC e sua respectiva temperatura média, avaliada a cada 12h desde a eclosão até a pupariação.

Tempo (h)	**Temperaturas (ºC) (mm)**	
	17,5-32,5 ± 1	**25 ± 1**
12	1,703± 0,313775574	2,55 ± 0,30
24	3,4255± 0,537443796	4,99 ± 0,60
36	5,0061± 0,489978106	6,56 ± 0,68
48	10,9842± 0,77723367	7,84 ± 1,45
60	11,7± 0,925319578	13,00 ± 0,66
72	14,8367±0,518400328	14,33 ± 0,71
84	14,8888± 0,655275481	14,48 ± 0,32
96	14,3582± 0,511168335	13,73 ± 0,65
108	13,7765± 0,511166476	13,09 ± 0,68
120	8,625± 0,168865495	8,66 ± 0,26
ANOVA: $F= 1.25\times10^{-5}$; p=0.997		

Figura 1. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 25/30°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

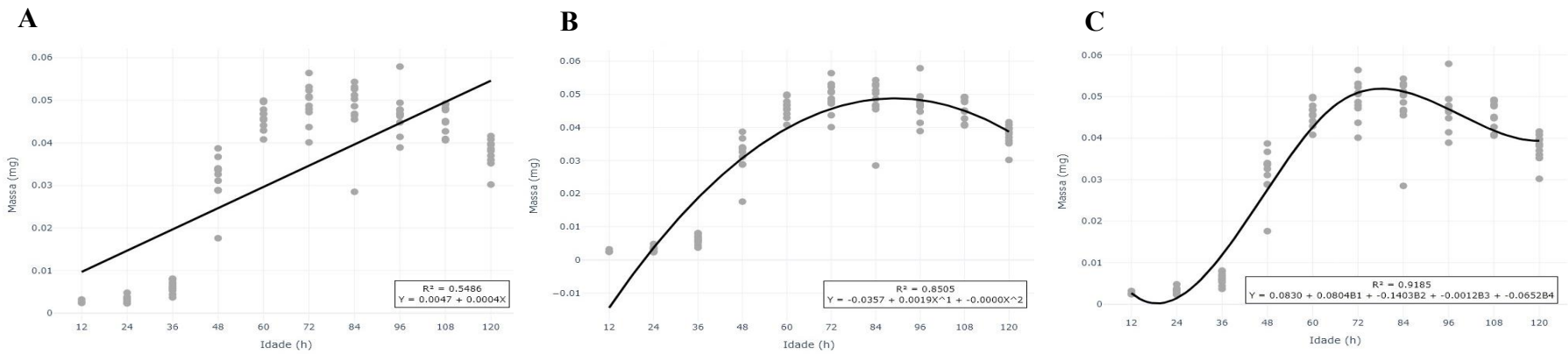


Figura 2. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura constante de 27,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

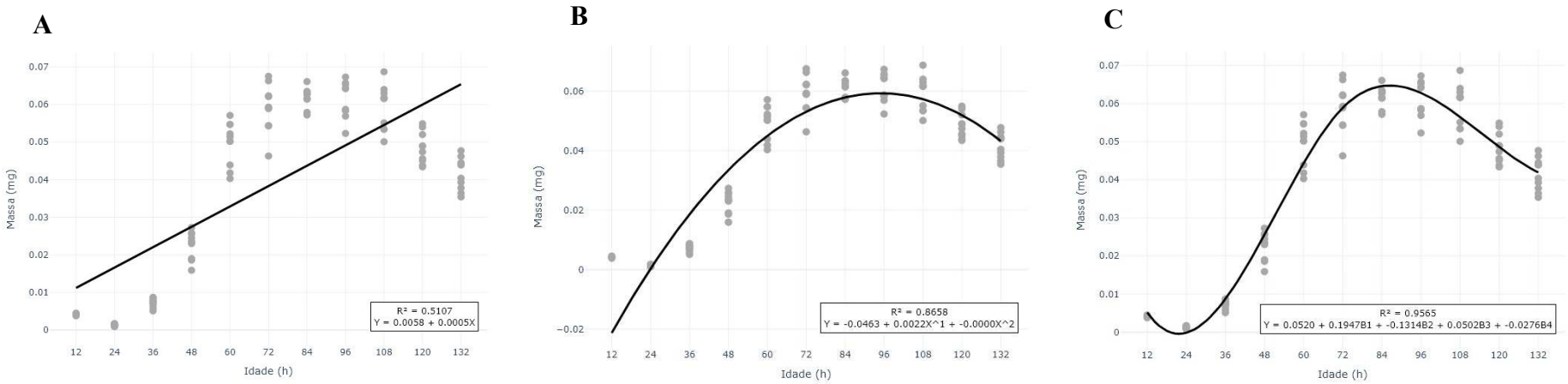


Figura 3. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 17,5/32,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

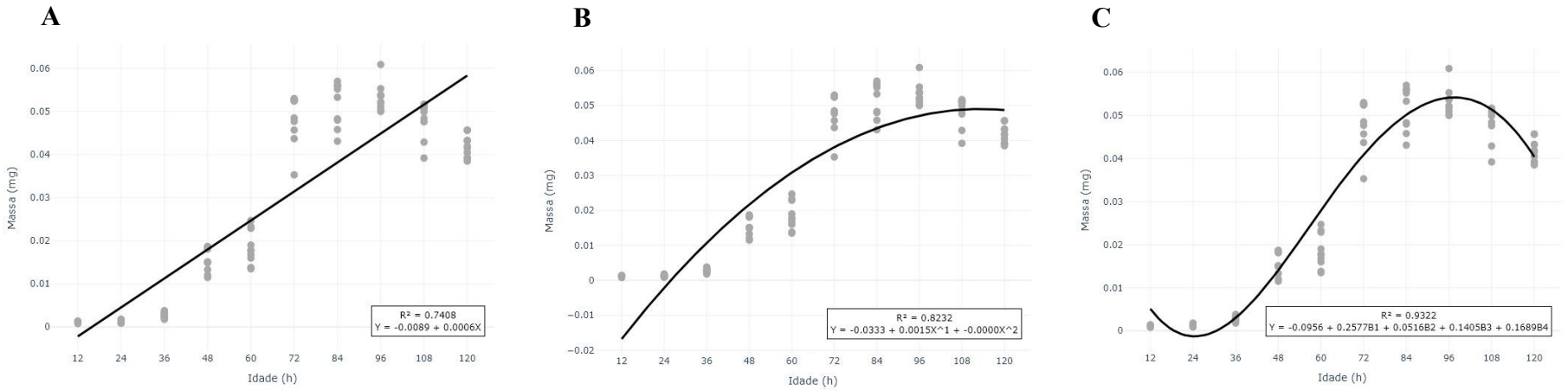


Figura 4. Variação da massa larval (mg) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura constante de 25°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

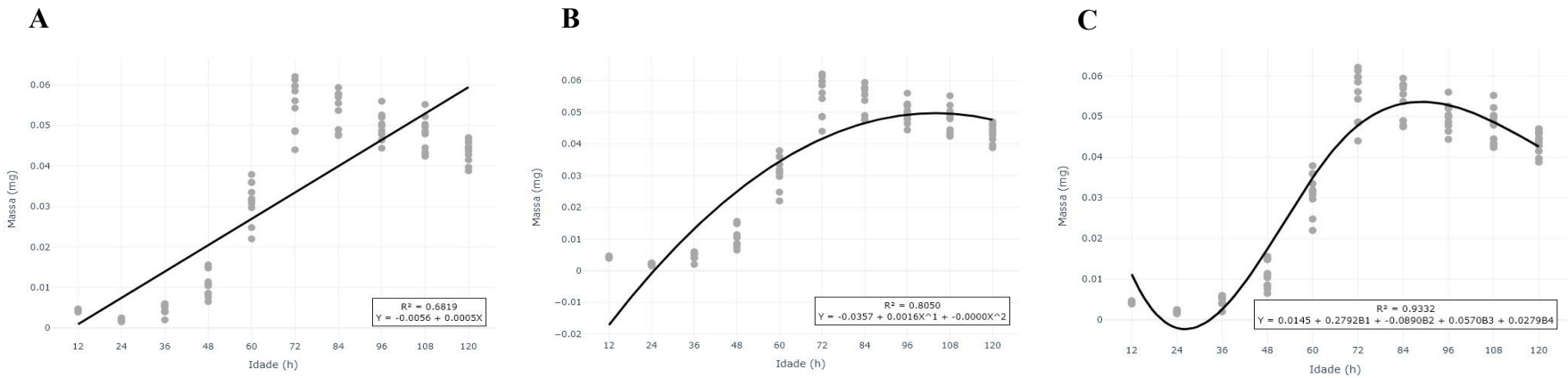


Figura 5. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 25/30°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

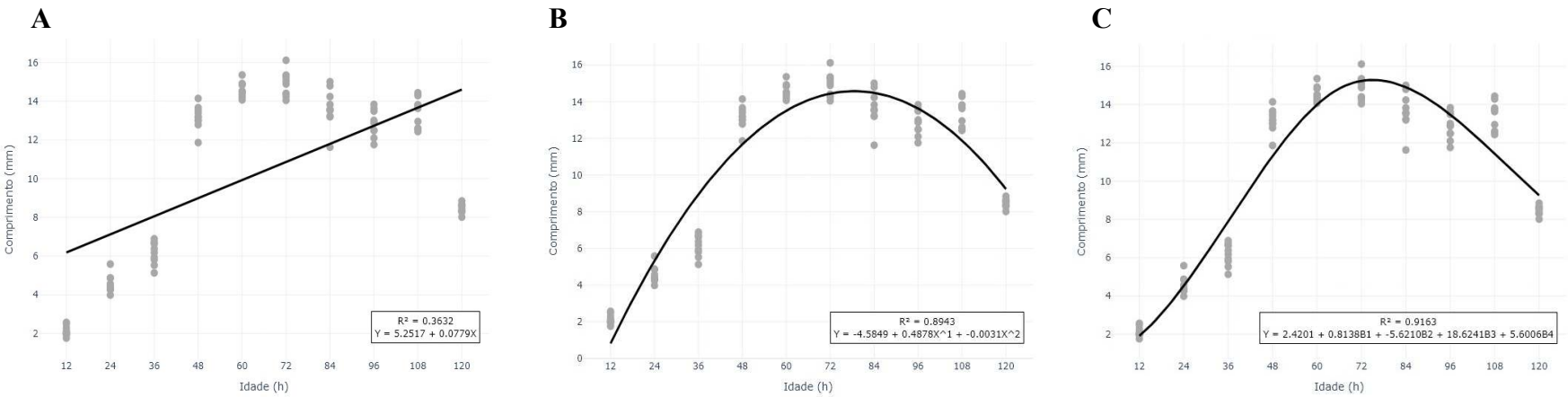


Figura 6. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura constante de 27,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

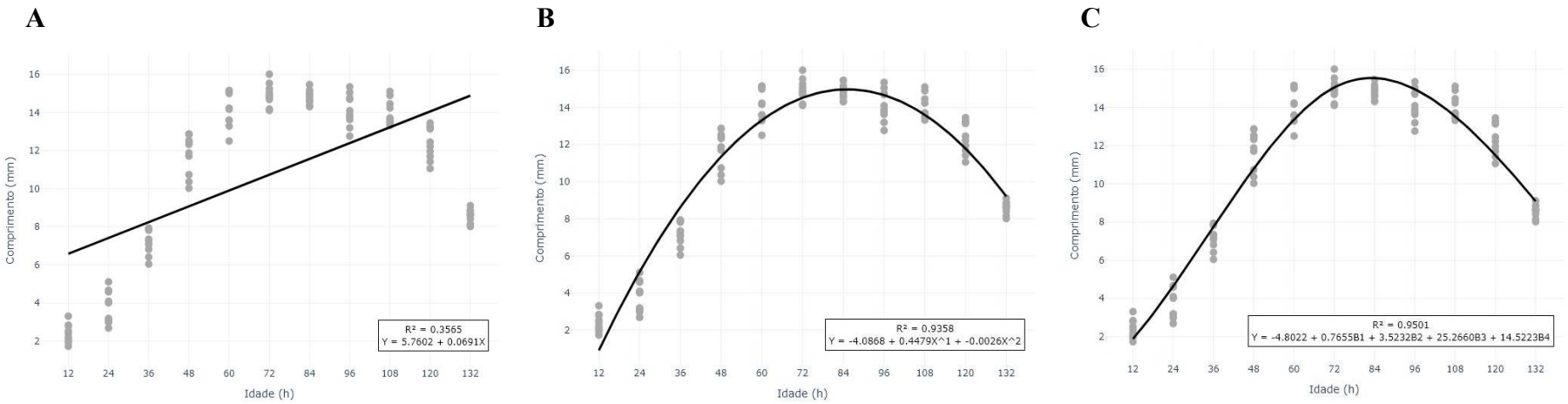


Figura 7. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura flutuante de 17,5/32,5°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

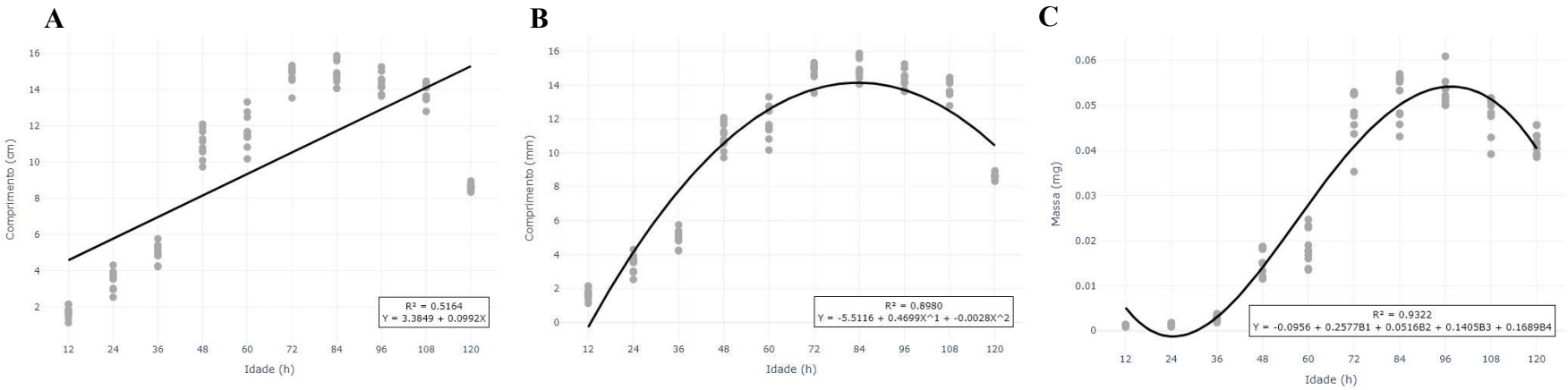


Figura 8. Variação do comprimento larval (mm) de *C. macellaria* a cada 12h, mantidas em temperatura constante de 25°C. A: equação de regressão linear; B:equação de regressão polinomial; C: equação de regressão com B-spline.

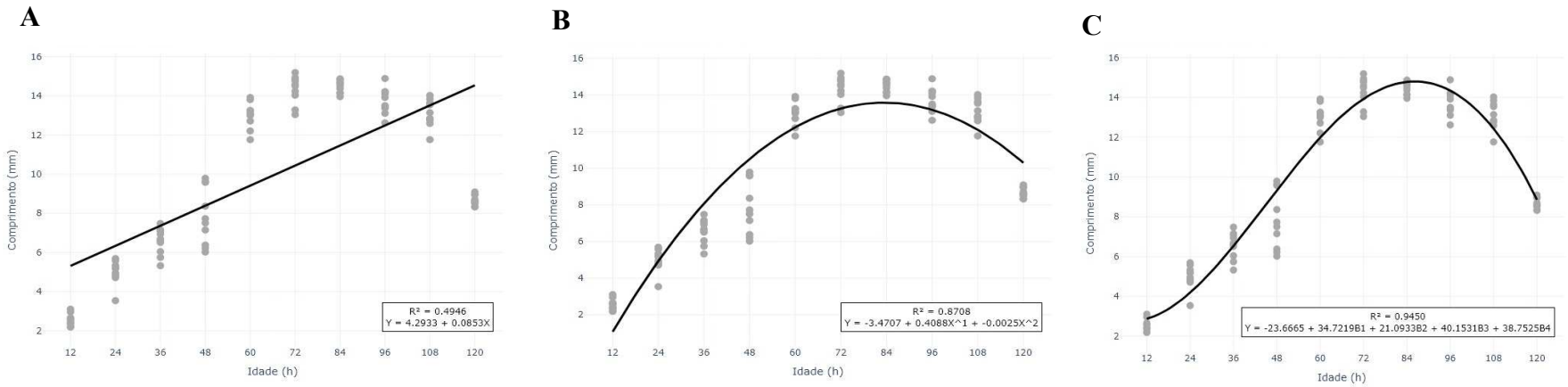


Figura 9. Representação gráfica dos resíduos considerando as equações com base na massa larval de A:regressão linear simples; B: regressão polinomial com 2 graus de liberdade e C: regressão com B-spline.

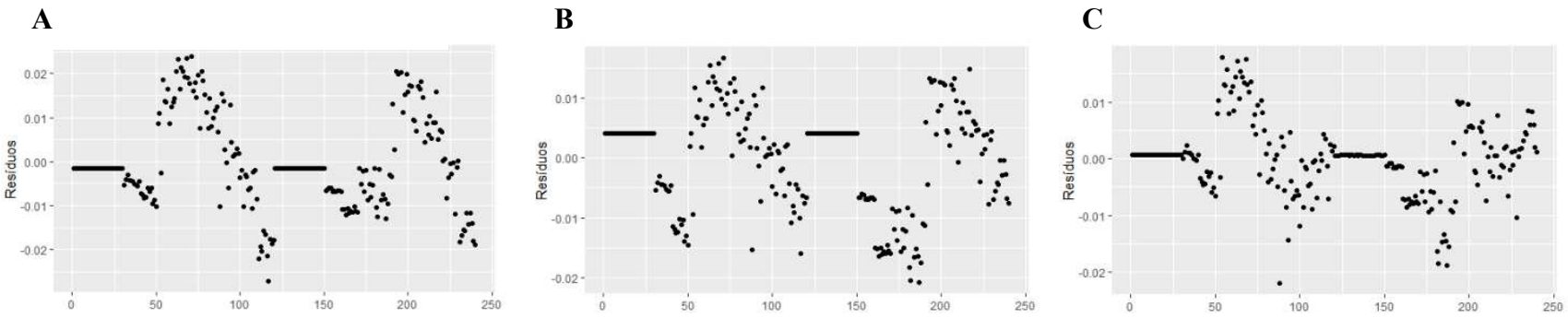


Figura 10. Representação gráfica dos resíduos considerando as equações com base no comprimento larval de A:regressão linear simples; B: regressão polinomial com 2 graus de liberdade e C: regressão com B-spline.

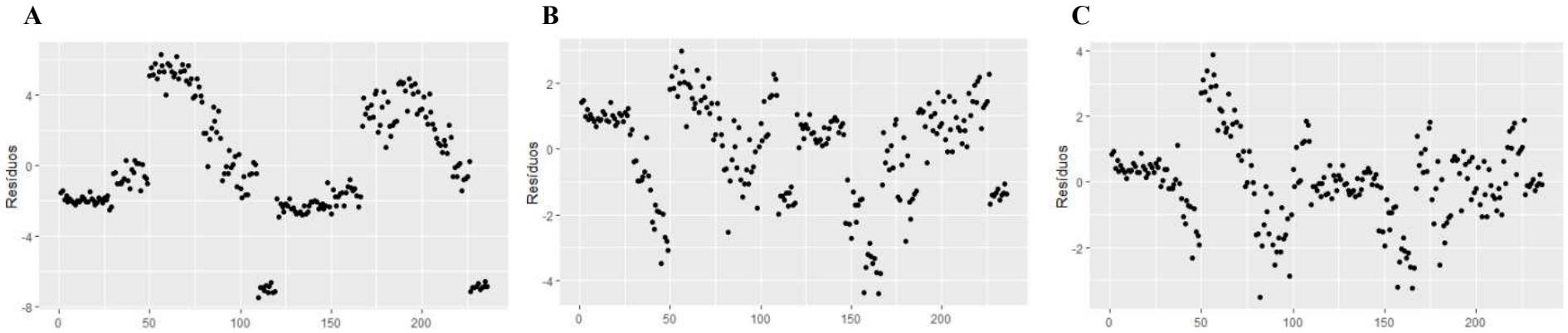
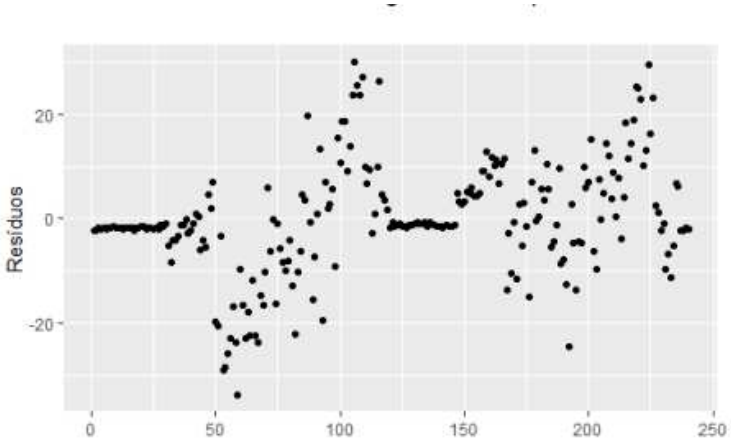


Figura 11. Representação gráfica dos resíduos de modelo de regressão múltipla.



5 CONCLUSÕES GERAIS

Considerando todos os parâmetros analisados nesse estudo, foi possível concluir que:

- A faixa térmica ótima para o desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria* está entre 27,5 e 32,5 °C.
- A espécie não se desenvolve abaixo de 12,5 e acima de 42,5°C, as quais podem ser então consideradas como limiares térmicos inferiores e superiores, respectivamente.
- Modelos de regressão linear expressam de forma mais confiável o tempo de desenvolvimento frente a uma variável quando os imaturos de *C. macellaria* foram submetidos a temperaturas < 20ºC.
- As temperaturas flutuantes não influenciaram significativamente a taxa de desenvolvimento de imaturos de *C. macellaria* tomando como base o ganho de massa corpórea e comprimento larval.
- Os modelos polinomiais e B-spline ofereceram uma precisão confiável para descrever o desenvolvimento de *C. macellaria*.

6 REFERÊNCIAS

ALONSO, M.A.; SOUZA, C.M.; LINHARES, A.X.; THYSSEN, P.J. 2015. Egg developmental time and survival of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) under different temperatures. J. Med. Entomol., 52(4): 551-556.

ALVAREZ-GARCIA, D.M.; PÉREZ-HÉRAZO, A.; AMAT, E. 2017. Life history of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera, Calliphoridae), a blowfly of medical and forensic importance. Neotrop. Entomol., 46(6): 606-612.

AMENDT, J.; KRETTEK, R.; ZEHNER, R. Forensic entomology. 2004. Sci. Nat., 91(2): 51-65.

AMENDT, J.; CAMPOBASSO, C.P.; GAUDRY, E.; REITER, C.; LEBLANC, H.N.; HALL, M. 2007. Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. Int. J. Legal Med., 121(2): 90-104.

BERTOLINI, A.B.; PRADO, A.M.; THYSSEN, P.J.; SOUZA RIBEIRO MIONI, M.; GOUVEA, F.L.R.; SILVA LEITE, D.; LANGONI, H.; FIGUEIREDO PANTOJA, J.C.; RALL, V.M.; GUIMARÃES, F.F.; JOAQUIM, S.F.; GUERRA, S.T.; HERNANDES, R.T.; LUCHEIS, S.B.; RIBEIRO, M.G. 2022. Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment. Lett. Appl. Microbiol., 1(1): 1-14.

BORROR, D.J.; DELONG, D. 1969. Introdução ao Estudo dos Insetos. São Paulo: Ed. Edgard Blucher.

BUSVINE, J.R. 1980. Insects and hygiene. In: Chapman and Hall, The biology and control of insect pests of medical and domestic importance. 3rd ed. London. Pp. 568.

BYRD, J.H.; TOMBERLIN, J.K. 2020. Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press.

CAFFO, B. 2015. Regression models for data science in R. A companion book for the Coursera Regression Models class.

CAMPOBASSO, C.P., DI VELLA, G. & INTRONA, F. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. Forensic Sci. Int. 120:18-27.

CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; GOFF, M.L.; LINHARES, A.X. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. Aggrawal's Int. J. For. Med. Toxicol., 5: 33-39.

CARVALHO, C.J.B.; RAFAEL, J.A.; COURI, M.S.; RICCARDI, P.R.; SILVA, V.C.; OLIVEIRA, S.S.; LAMAS, C.J.E. 2024. Cap. 36, Diptera Linnaeus, 1758, pp. 783-831. In: Rafael, J.A.; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B. de; Casari, S. & Constantino, R. (eds). Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. 2ª ed. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 880 pp.

CATTS, E.P.; GOFF, ML. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. Annu. Rev. Entomol., 37(1): 253-272.

CHEN, W.; YANG, L.; REN, L.; SHANG, Y.; WANG, S.; GUO, Y. 2019. Impact of constant versus fluctuating temperatures on the development and life history parameters of *Aldrichina graham* (Diptera: Calliphoridae). Insects, 10(7): 184.

CLARKSON, C.A.; HOBISCHAK, N.R.; ANDERSON, G.S. 2004. A comparison of the development rate of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) raised under constant and fluctuating temperature regimes. Canadian Soc. For. Sci. J., 37(2), 95-101.

COURTNEY, G.W.; PAPE, T.; SKEVINGTON, J.H.; SINCLAIR, B.J. 2017. Biodiversity of Diptera. Insect biodiversity: science and society, 1, 229-278.

DADOUR, I. R.; COOK, D.F.; WIRTH, N. 2001. Rates of development of *Hydrotaea rostrata* under summer and winter (cyclic and constant) temperature regimes. Med. Vet. Entomol., 15(2): 177-182.

ERZINCLLIOĜLU, Y.Z. 1983. The application of entomology to forensic medicine. Med. Sci. Law., 23(1): 57-63.

ERZINCLLIOĜLU, Y.Z. 1996. Blowflies. Slough, England: Richmond Publishing Co. Ltd.

FERRAR, P. 1987. A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera Cyclorrhapha. Copenhagen: EJ Brill/Scandinavian Science Press.

FLOREZ, E.B.; WOLFF, M. 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. Neotrop. Entomol., 38(3): 418-29.

GENNARD, D. 2007. Forensic entomology: an introduction. Chichester, England: John Wiley & Sons.

GREENBERG, B. 2002. Problems in estimating the time of death. In: GREENBERG, B.; KUNICH, J.C. Entomology and the law: flies as forensic indicators. Cambridge: Cambridge Univ. Press.

GREENWELL, B.M.; SCHUBERT-KABBAN, C.M. 2014. investr: an R package for inverse estimation. R Journal.

GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J. 2011. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. Disponível em: <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil>

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.; BARROS, T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LÉON, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 23(2): 150-156.

GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N. 1999. Myiasis in man and animals in the Neotropical region. São Paulo: Plêiade, FAPESP. 308p.

IKEMOTO, T.; TAKAI, K. 2000. A New Linearized Formula for the Law of Total Effective Temperature and the Evaluation of Line-Fitting Methods with Both Variables Subject to Error. Environ. Entomol., 29(4): 671-682.

INPE. 2021. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em <https://www.cptec.inpe.br/>

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. 2017. Package 'factoextra'. Extract and visualize the results of multivariate data analyses. <http://www.sthda.com/english/rpkgs/factoextra>

KNOTT, G.D. 2000. Interpolating cubic splines (Vol. 18). Springer Science & Business Media.

KOTZÉ, Z.; TOMBERLIN, J.K. 2019. Influence of substrate age on oviposition behavior of a specialist carrion colonizer, *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol., 57(3): 686-690.

LECHETA, M.C.; THYSSEN, P.J.; MOURA, M.O. 2015. The effect of temperature on development of *Sarconesia chlorogaster*, a blowfly of forensic importance. Forensic Sci.

Med. Pathol., 11(4): 538-543.

LEITÃO-FILHO, H.; MORELLATO, P.C. 1995. Ecologia e preservação de uma área de floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra. 1ª ed. Campinas: Ed. UNICAMP.

MARCONDES, C.B.; THYSSEN, P.J. 2017. Flies. In: Marcondes, C.B. (Ed.), Arthropod Borne Diseases. Springer Int. Publish., Switzerland, pp. 475–502.

MARINHO, M.A.T.; JUNQUEIRA, A.C.M.; PAULO, D.F.; ESPOSITO, M.C.; VILLET, M.H.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L. 2012. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. Mol. Phylogen. Evol., 65(3): 840-854.

MARINHO M.A.T, MADEIRA-OTT T. 2025. Calliphoridae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/732>. Acesso em: 06 mai. 2025.

MASIERO, F.S.; AGUIAR, E.S.V.; PEREIRA, D.I.B.; THYSSEN, P.J. 2020. First report on the use of larvae of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) for wound treatment in veterinary practice. J. Med. Entomol., 57(3): 965-968.

MATUSZEWSKI, S. 2021. Post-mortem interval estimation based on insect evidence: current challenges. Insects, 12(4): 314.

MEGNIN, J. 1894. La faune des cadavres: application de l'entomologie a la medecine legale. Encyclopédie Scientifique des Aides Memoires. Masson et Gauthiers-Villars, Paris, 214p.

MEIRA, L. M. R.; BARBOSA, T. M.; JALES, J. T.; SANTOS, A. N.; GAMA, R.A. 2020. Insects Associated to Crime Scenes in the Northeast of Brazil: Consolidation of Collaboration Between Entomologists and Criminal Investigation Institutes, *Journal of Medical Entomology*, 57(4): 1012–1020.

MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I.M. 2007. Climatologia: noções básicas e climas do Brasil. 1ª ed: Oficina de textos. São Paulo, 2007.

MORETTI, T.C.; THYSSEN, P.J.; SOLIS, D.R. 2009. Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). Entomol. Gen., 31: 349-353.

NASSU, M.P.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. 2014. Developmental rate of immatures of two fly species of forensic importance: *Sarcophaga* (*Liopygia*) *ruficornis* and *Microcerella halli* (Diptera: Sarcophagidae). Parasitol. Res., 113(1), 217-222.

NGOEN-KLAN, R., MOOPHAYAK, K., KLONG-KLAEW, T., IRVINE, K.N., SUKONTASON, K.L., PRANGKIO, C., SOMBOON, P., SUKONTASON, K. 2011. Do climatic and physical factors affect populations of the blow fly *Chrysomya megacephala* and house fly *Musca domestica*? Parasitol. Res., 109: 1279-1292.

NUORTEVA, P. 1977. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. *In*: TEDESHI, G.C., ECKERT, W.G. & TEDESHI, L.G. Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards. Vol. II. Philadelphia: Saunders, pp. 1072-1095.

OLIVEIRA-COSTA, J.; MELLO-PATIU, C.A.D. 2004. Application of forensic entomology to estimate of the postmortem interval (PMI) in homicide investigations by the Rio de Janeiro Police Department in Brazil. *Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, *5*(1), 40-44.

OLIVEIRA, T. C., & VASCONCELOS, S. D. 2010. Insects (Diptera) associated with

cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, *198*(1-3), 97-102.

PRAUTZSCH, H.; BOEHM, W.; PALUSZNY, M. 2002. Bézier and B-spline techniques. Springer Science & Business Media.

R CORE TEAM. 2017. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>

SEN, A.; SRIVASTAVA, M. 2012. Regression analysis: theory, methods, and applications. Springer Science & Business Media.

SMITH, K.G.V. 1986. A Manual of Forensic Entomology. New York: Comstock Publishing Associates.

SOUZA, C.M.; LIMA, C.G.; ALVES-JR, M.J.; ARRAIS-SILVA, W.W.; GIORGIO, S.; LINHARES, A.X.; THYSSEN, P.J. 2013. Standardization of histological procedures for the detection of toxic substances by immunohistochemistry in dipteran larvae of forensic importance. J. Forensic Sci., 58(4): 1015-1021.

TALEBITOOTI, R.; SHOJAEEFARD, M.H.; YARMOHAMMADISATRI, S. 2015. Shape design optimization of cylindrical tank using b-spline curves. Computers & Fluids, 109: 100-112.

THYSSEN, P.J. 2010. Keys for Identification of Immature Insects *In*: AMENDT, J., GOFF, M.L., CAMPOBASSO, C.P., GRASSBERGER, M. Current concepts in forensic entomology. Netherlands: Springer, pp. 25-42.

THYSSEN, P.J. 2011. Entomologia Forense. In: MARCONDES, C.B. (ed.) Entomologia Médica e Veterinária, 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, Brazil, pp .129-137.

THYSSEN, P.J., MORETTI, T.D., UETA, M.T., RIBEIRO, O.B. 2004. O papel de insetos (Blattodea, Diptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. Cad. Saude Publ., 20: 1096-1102.

THYSSEN, P.J.; NASSU, M.P.; COSTELLA, A.M.U.; COSTELLA, M.L. 2012. Record of oral myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): case evidencing negligence in the treatment of incapable. Parasitol. Res., 111(2): 957-959.

THYSSEN, P.J.; AQUINO, M.F.K.; PURGATO, N.C.S.; MARTINS, E.; COSTA, A.A.; LIMA, C.G.P.; DIAS, C.R. 2018. Implications of entomological evidence during the investigation of five cases of violent death in Southern Brazil. J. Forensic Sci. Res., 2: 1-8.

THYSSEN, P.J.; MASIERO, F.S.; STADLER, F. 2022. Bioprospecting and Testing of New Fly Species for Maggot Therapy. In: STADLER, F. (Org.). A Complete Guide to Maggot Therapy: Clinical Practice, Therapeutic Principles, Production, Distribution, and Ethics. 1ed.Cambridge: Open Book Publishers, pp. 195-234.

VON ZUBEN, C. J., BASSANEZI, R. C., & VON ZUBEN, F. J. 1998. Theoretical approaches to forensic entomology: II. Mathematical model of larval development. Journal of Applied Entomology, 122(1-5), 275-278.

WAGNER, T.L.;WU, H.I.; SHARPE, P.J.H.; SCHOOLFIELD, R.M.; COULSON, R.N. 1984. Modeling insect developmental rates: A literature review and application of the biophysical model. Ann. Entomol. Soc. Am., 77: 208-225.

WOLFF, M.; KOSMANN, C. 2016. Families Calliphoridae and Mesembrinellidae. Zootaxa, 4122(1): 856-875.

ANEXOS

Comprovante de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A8D7C44

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	**A8D7C44**
Usuário:	**UNICAMP**
CPF/CNPJ:	**46.068.425/0001-33**
Objeto do Acesso:	**Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:	**Pesquisa**

Espécie
Calliphora lopesi
Calliphora vicina
Chrysomya albiceps
Chrysomya megacephala
Chrysomya putoria
Cochliomyia hominivorax
Cochliomyia macellaria
Sarconesia chlorogaster
Paralucilia pseudolyrcea
Hemilucilia segmentaria
Hemilucilia semidiaphana
Paralucilia fulvinota
Lucilia spp.

Calliphora spp
Chrysomya spp.
Cochliomyia spp
Chloroprocta idioidea
Compsomyiops spp
Hemilucilia spp
Paralucilia spp.
Roraimomusca roraima
Sarconesia spp
Sarcophagidae spp
Muscidae spp.
Fanniidae spp.

Título da Atividade:	**Novas abordagens a partir da taxonomia e diversidade de moscas necrófagas (Diptera, Calyptratae): o que a biologia tem a oferecer à segurança pública na resolução de casos forenses**

Equipe

Taís Madeira Ott	**UNICAMP**
Patricia Jacqueline Thysse	**UNICAMP**
Gabriela da Silva Zampim	**UNICAMP**
Aline Marrara do Prado	**UNICAMP**
Marcelo Soares da Silva	**UNICAMP**

Data do Cadastro:	**28/11/2022 15:22:14**
Situação do Cadastro:	**Concluído**

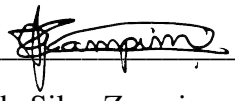
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **8:49** de **17/11/2023**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - **SISGEN**

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o conteúdo constante da Dissertação de Mestrado intitulada **Avaliação do desenvolvimento pós-embrionário da espécie de importância forense, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Insecta, Diptera, Calliphoridae), sob temperaturas controladas e flutuantes** não foi submetido para ou publicado em nenhum veículo ou periódico científico. Por essa razão, não infringe os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora. Sem mais nada a declarar, firmamos o presente

Campinas, SP, 28 de Julho de 2025.

Assinatura: 

Autora: Gabriela da Silva Zampim
RG n.º 44.010.863-9

Assinatura:

Autora: Patricia Jacqueline Thyssen
RG n.º 22.771.091-5