

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Priscila Silveira Corrêa

**Análise de comportamento de ovipostura noturna de
Chrysomya megacephala F. (Diptera: Calliphoridae) e
suas consequências na Entomologia Forense**



Rio Claro
2019

PRISCILA SILVEIRA CORRÊA

Análise de comportamento de ovipostura noturna de *Chrysomya megacephala*
F. (Diptera: Calliphoridae) e suas consequências na Entomologia Forense

Orientador: Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2019

C824a	<p>Corrêa, Priscila Silveira</p> <p>Análise de comportamento de ovipostura noturna de <i>Chrysomya megacephala</i> F. (Diptera: Calliphoridae) e suas consequências na entomologia forense / Priscila Silveira Corrêa. -- Rio Claro, 2019</p> <p>25 f.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientador: Cláudio José von Zuben</p> <p>1. Entomologia Forense. 2. Comportamento. 3. Diptera. I.</p> <p>Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RESUMO

A ordem Diptera é uma das mais diversas dentre os insetos, e dentro da subordem Brachycera encontra-se a família Calliphoridae, mais conhecida como representante das moscas-varejeiras. Esses insetos são populares devido à preocupação com condições sanitárias precárias de diversos locais, mas também muito importantes devido a seu papel na investigação de crimes. *Chrysomya megacephala* é uma espécie nativa da região Oriental e Australásia e foi introduzida acidentalmente no Brasil por meio de navegações na década de 70 do século passado. Essa espécie é uma das primeiras a colonizar o cadáver, sendo que a colonização por insetos pode durar até a fase de esqueletização. Portanto, o conhecimento do início dessa colonização é incisivo para a determinação de um valor de IPM (intervalo de tempo entre a ocorrência da morte e o encontro do corpo pela perícia) acurado, realizada por meio da relação da massa e idade das fases de colonização do corpo pelos insetos. Apesar da atividade diurna desses insetos, as fêmeas durante a ausência de luz podem caminhar à procura de alimento ou substrato de oviposição. O objetivo deste trabalho consistiu em analisar o comportamento de frequência e quantificação da oviposição noturna de *C. megacephala* a partir da análise empírica da postura de ovos utilizando controle de luz e temperatura e posterior quantificação das massas de ovos e análises de comparação estatística. Foi observado que houve oviposição noturna em todos os grupos analisados, porém houve maior quantidade de ovos postos no grupo que recebeu o substrato de oviposição apenas durante a noite, em detrimento do grupo que recebeu substrato para oviposição em ambos os períodos do dia. A partir do conhecimento do comportamento de oviposição noturna, é possível a obtenção de um IPM mais acurado, podendo haver uma diferença de até 12h neste, e assim uma conclusão mais exata do período do dia em que ocorreu a morte e a consequente colonização do corpo pelos dípteros. A onipresença e abundância desta mosca em um vasto gradiente de condições colaboram para que essa seja uma espécie de garantida importância forense.

Palavras-chave: Diptera, comportamento de oviposição, Calliphoridae

ABSTRACT

The order Diptera is one of the most diverse order of insects, and within the suborder Brachycera is the family Calliphoridae, better known as a representative of blowflies, popular insects due to concerns about poor sanitation in many places, but also very important due to its role in the investigation of crimes. *Chrysomya megacephala* is a native species from the Eastern and Australasian regions and was accidentally introduced to Brazil through navigations in the 70's. This species is one of the first to colonize the corpse, and this colonization by insects may last until the eskeletonization phase. Therefore, knowledge of the onset of this colonization is crucial for the determination of an accurate PMI value (time interval between the occurrence of death and the body meeting by expertise), performed by the relation of the mass and age of the colonization phases of the body by the insects. Despite the daytime activity of these insects, females during low light may walk looking for food or oviposition substrate. The objective of this work was to analyze the behavior of nocturnal oviposition of *C. megacephala* from the empirical analysis of egg laying using light and temperature control and subsequent egg mass quantification and statistical comparison analysis. It was observed that there was nocturnal oviposition in all groups analyzed, but there were more eggs laid in the group that received the oviposition substrate only at night, in detriment of the group that received oviposition substrate in both periods of the day. From the knowledge of nocturnal oviposition behavior it is possible to obtain a more accurate PMI and thus a more accurate conclusion of the period of the day in which the death occurred and the consequent body colonization by the dipterans. The omnipresence and abundance of this fly in a wide range of conditions contributes to its forensic importance.

Keywords: Diptera, oviposition behaviour, Calliphoridae

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVO	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 Coleta e desenvolvimento dos indivíduos	9
3.2 Procedimentos experimentais	10
3.2.1 Oviposição noturna e diurna	10
3.2.2 Análise noturna da busca ativa por substrato de oviposição.....	12
3.2.3 Análises estatísticas.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	14
5. CONCLUSÕES	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

A Entomologia Forense, como conhecemos hoje em dia, tem uma vasta possibilidade de aplicação e não é utilizada apenas para a solução de crimes contra a pessoa, podendo ser dividida em entomologia forense urbana, de produtos estocados e médico-legal. Na entomologia forense urbana, há a inclusão de ações cíveis, como por exemplo os danos causados por cupins em imóveis, ou a infestação de pulgas em estabelecimentos, sendo que essa modalidade é bastante utilizada no mercado imobiliário. Já a entomologia forense de produtos estocados é responsável pelo estudo da contaminação de produtos industriais ou comerciais em estoque (principalmente alimentos), sendo sua aplicação muito vasta e muito recorrente no mercado industrial (LORD, STEVESSON, 1986). Também há a entomologia médico-legal, tratada neste trabalho, que visa a resolução de diversas questões criminais com o uso de insetos, podendo ser usada tanto para o cálculo do intervalo *post-mortem* (que consiste na estimativa de tempo entre a morte e o encontro do corpo por profissionais), quanto para a detecção de drogas e remédios em cadáveres, bem como em casos de maus tratos a crianças e incapazes, sendo sua aplicação diversa e flexível (LORD, STEVESSON, 1986).

Desde os tempos primórdios, há vestígios da Entomologia Forense sendo utilizada para a solução de crimes. Um dos casos mais antigos de aplicação desta ciência se deu na China, no século XIII, quando um investigador chamado Sung T'zu, se viu à frente de homicídio ocorrido em meio a uma plantação de arroz, em que se sabia apenas que o crime havia sido cometido com um objeto cortante. O crime pôde ser desvendado após o investigador pedir para que todos os trabalhadores colocassem suas foices no chão e as moscas apenas pousassem em uma delas, onde provavelmente continha resquícios de sangue, descobrindo-se assim, o assassino (PUJOL-LUZ et al., 2008).

No âmbito científico, a entomologia forense se tornou mundialmente conhecida com a publicação do livro “La faune des Cadavres”, de Mégnin (1894), no qual os insetos necrófagos foram divididos em oito legiões distintas, passíveis de uma sucessão previsível durante o processo de decomposição, e assim começou-se a estudar e a utilizar insetos para estimar o intervalo *post mortem* de um cadáver, dado

crucial para a solução de diversos crimes quando não há sangue, urina ou órgãos disponíveis para análise na resolução de casos de assassinatos, aumentando assim, sua importância em estudos médico-legais (KINTZ, 1990). Apesar deste trabalho ter sido um marco na descoberta da entomofauna europeia, os dados não são aplicáveis no Brasil, uma vez que o clima tropical interfere diretamente tanto no processo de decomposição quanto na sucessão da entomofauna.

No Brasil, há mais de um século, alguns cientistas realizaram pesquisas nessa área, apesar de diversos empecilhos no caminho devido à escassez de dados taxonômicos e biológicos; dentre eles, estão Roquete-Pinto (1908) e Oscar Freire (1914). Após estes trabalhos, somente houve contribuição científica relevante no ano de 1987, com a obra “Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do Estado de São Paulo, Brasil.” de Monteiro e Penereiro, na qual foi estudado o processo de decomposição e a fauna associada em carcaças de ratos. Após este estudo, houve a proposta de projetos de pesquisa na área em diversas instituições de ensino, que permitiram várias publicações, o que prossegue em crescimento até hoje.

Os insetos são os primeiros invertebrados a colonizarem corpos em decomposição, e a entomofauna de um cadáver nem sempre é composta por insetos que se alimentam dos tecidos decompostos, podendo ser constituída por insetos onívoros, que se alimentam tanto do cadáver em questão quanto da fauna associada a ele, como por exemplo formigas e vespas e alguns besouros (CATTS & GOFF, 1992; LECCESE, 2004). Também pode haver insetos parasitas e predadores, que se alimentam dos insetos exclusivamente necrófagos, como alguns coleópteros (Silphidae, Histeridae), alguns dípteros (Muscidae), himenópteros e dermápteros; também há a presença de fauna acidental, que são insetos e artrópodes que estão no corpo em decomposição simplesmente pelo fato dele estar presente como uma extensão de seu habitat normal; e há os insetos necrófagos propriamente ditos, que são aqueles que se alimentam do cadáver em processo de decomposição e o utilizam como substrato para oviposição (KEH, 1985).

A ordem Diptera é uma das mais diversas dentre os insetos, contendo aproximadamente 150 mil espécies dentro de 158 famílias distintas (YEATES, 2005). Essa ordem pode ser subdividida em subordens, Nematocera, conhecida como dípteros inferiores, e Brachycera, que engloba famílias de dípteros superiores ou

muscoïdes. Dentro da subordem Brachycera encontra-se a família Calliphoridae, mais conhecida como representante das moscas-varejeiras, insetos populares devido à preocupação com condições sanitárias de diversos locais (NORRIS, 1965), mas também muito importantes devido ao seu papel na investigação de crimes e na estimativa do IPM (intervalo *post mortem*), quando é conhecido anteriormente o padrão de sucessão entomológica no cadáver em questão ou a inferência da idade pela massa das larvas, podendo esses fatores serem responsáveis pela indicação de tempo de decomposição de um cadáver e portanto, importantes na resolução de inúmeros crimes (SCHOENLY, 1991; VON ZUBEN, et al., 1996).

Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) é uma espécie de mosca pertencente à família Calliphoridae, que tem sua origem na Australásia e foi acidentalmente introduzida na América através de navios, se tornando assim uma espécie invasora (GUIMARÃES *et al.*, 1978, 1979). O representante adulto possui a coloração azul-esverdeada ou roxa, espiráculo prototorácico escuro e olhos avermelhados; também apresenta antenas e genas amareladas (OLIVEIRA-COSTA, 2003). Suas larvas não possuem tubérculos e têm esclerito oral com uma mancha mais escurecida. O pupário é relativamente opaco e irregular, possuindo seis tubérculos (AMORIM & RIBEIRO, 2001). A espécie normalmente está associada à matéria em decomposição, não necessariamente apenas cadáveres, mas também pode ser encontrada em matéria orgânica diversa, como frutos ou fezes (SMITH, 1986). Mesmo sendo considerada uma espécie invasora no continente americano, *C. megacephala* é de grande importância forense, já que é um dos primeiros dípteros a colonizarem o cadáver, podendo ser um instrumento confiável na estimativa do intervalo *post-mortem* (IPM) (PÉREZ *et al.*, 2005).

Para que as moscas necrófagas possam exercer papéis principais na resolução de crimes e na estimativa confiável do IPM, é necessário que haja um banco de dados biológicos que descreva diversos comportamentos destes insetos e suas consequências. Um comportamento de inquestionável importância é o de ovipostura, ou oviposição, que é o primeiro estágio para a colonização do cadáver realizado por estas moscas pouco tempo após a morte da vítima, podendo durar até a fase de esqueletização, e seu conhecimento é incisivo para a determinação de um IPM acurado (CATTS, 1992). Diversos fatores podem influenciar no comportamento de ovipostura de moscas necrófagas, tais como olfato (BARTON, 1960), características

nutricionais e qualidade do sítio (ZUCOLOTO, 1991); até a temperatura pode ser um fator decisivo na escolha do local e horário deste comportamento (ODY, 2017). Outro fator que pode influenciar o comportamento de oviposição nas moscas necrófagas é a intensidade de luz e a possibilidade da ocorrência da oviposição durante o período noturno, com nenhuma ou pouquíssima incidência de luz (SINGH & BHARTI, 2001).

A acurácia dos resultados destes estudos é fundamental para resoluções de questões jurídicas, uma vez que é o exato tempo da ovipostura que determinará a idade correta das larvas e, conseqüentemente, o intervalo de tempo entre o momento em que o cadáver foi colonizado e posteriormente encontrado. Considerando que a maior parte dos crimes ocorre dentro do período noturno, o estudo do comportamento noturno de dípteros se torna ainda mais relevante para a entomologia forense e no cálculo do IPM (CATTI, 1992), tendo em vista que para alguns especialistas, as moscas podem ser dadas como inativas à noite, resultando em uma possível alteração discrepante de 12 horas no cálculo no IPM (AMENDT, et al., 2008).

Alguns estudiosos afirmam, sob perspectiva empírica, que as moscas possuem apenas atividade de ovipostura diurna (OLIVEIRA-COSTA, et al., 2001; AMENDT, et al., 2008), enquanto outros conseguiram resultados antagônicos aos primeiros, com ovipostura noturna de algumas espécies, como *Lucillia sericata*, *Calliphora vomitoria*, *Calliphora vicina*, entre outras (GREENBERG, 1990; ODY, 2017); deve-se ressaltar que, mesmo sendo notável a diminuição metabólica destes dípteros com a diminuição da intensidade luminosa, é possível que algumas espécies realizem a ovipostura dentro do período noturno, salientando, desta forma, a importância de estudos deste tipo para a continuidade da aplicação correta de métodos dentro das ciências forenses no Brasil, para que possa ser, cada vez mais, expandida a acurácia das perícias nos laudos de crimes, reforçando sua decisiva importância em processos jurídicos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo consistiu na análise de comportamento de frequência e quantificação de oviposição e atividade noturna de *C. megacephala*, considerando diferentes cenários experimentais e atentando para a possível ocorrência de oviposição noturna, sua quantificação e análise, e as consequências desse comportamento na Entomologia Forense.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e desenvolvimento dos indivíduos

Indivíduos adultos de *C. megacephala* foram coletados nos arredores do Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, na Universidade Estadual Paulista, campus situado na cidade de Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil. Para a coleta foi utilizada carne bovina moída putrefata como isca em armadilhas feitas com garrafas PET e penduradas em árvores por períodos de 6 horas durante o dia. Após a coleta, os indivíduos da espécie desejada foram separados, identificados e mantidos em gaiolas teladas e devidamente fechadas (30 x 30 x 30cm), contendo água e açúcar *ad libitum* e sob temperaturas e fotoperíodos controlados, respectivamente a 25 ± 1 °C e fotofases de 12 horas (durante toda a fase de criação, para a realização dos experimentos propostos e durante os intervalos entre os experimentos, em todas as gerações).

Após o advento da oviposição em frascos com carne bovina moída e a obtenção de massas de ovos, foi feita a separação dessas massas de ovos e a transferência destas para potes de 750ml contendo carne moída (100g) e devidamente fechados com tecido. Todos os potes foram colocados em B.O.D.s com temperatura controlada de $27 \pm 0,5$ °C, e a partir do momento da dispersão inicial das larvas em busca de um sítio de pupação (final do terceiro instar larval), foi feita a transferência destas para potes maiores (2,5 litros) contendo serragem de madeira, novamente mantidos à temperatura de $27 \pm 0,5$ °C na B.O.D. Após os dípteros

atingirem o estágio de pupa, foi feita a transferência dos indivíduos para as gaiolas teladas até a emergência dos adultos, em sala climatizada com temperatura e luz controladas (25 ± 1 °C e fotofases de 12 horas), até a posterior oviposição. As fêmeas adultas, além da água (em frascos tampados com gaze) e do açúcar, foram alimentadas por 5 dias com fígado bovino cru (50g) para que ocorresse o desenvolvimento completo do ciclo gonotrófico (LINHARES, 1988) e após 10 dias do início da alimentação com o fígado, essas fêmeas estavam prontas para realizarem a oviposição em carne moída crua putrefata (50g). Após a oviposição e a emergência da geração F1, o processo foi repetido a fim de se obter a geração F2, que foi utilizada em todos os processos empíricos a seguir, pois apenas as moscas provenientes da geração F2 tiveram seu ciclo completo dentro de ambiente laboratorial e sob condições controladas.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Oviposição noturna e diurna

Primeiramente, foi feito um experimento dividido em duas partes, em que na primeira parte um número específico de moscas (30 fêmeas e 5 machos) foram mantidas em 12 gaiolas teladas, como é possível observar na Figura 1, e em ambiente climatizado e com iluminação controlada. Assim que as fêmeas alcançaram o estágio completo de desenvolvimento ovariano, elas foram submetidas à 12 horas de luz com substrato de carne bovina moída para oviposição e em seguida, submetidas a condições de escuro total por 12h com o um novo substrato de oviposição (também carne bovina moída). Ao mesmo tempo, na segunda parte do experimento, um outro conjunto de 12 gaiolas, com o mesmo número de espécimes, recebeu o substrato de oviposição somente durante as 12h de escuridão total para fins comparativos. No primeiro caso foi colocada uma porção de aproximadamente 40 gramas de carne moída crua (em estágio inicial de putrefação), que permanecia dentro das gaiolas das 18h às 6h, então esse substrato foi retirado e uma nova porção de 40 gramas de carne moída crua foi colocada, permanecendo nas gaiolas até às 18h, completando um dia

inteiro. No segundo caso foi colocada a porção de 40 gramas de carne moída crua apenas às 18h e retirada às 6h durante todos os dias de realização do experimento. Todas as massas de ovos obtidas foram pesadas em uma balança analítica de alta precisão e quantificadas para análises estatísticas. O período também foi levado em conta, uma vez que foram pesadas todas as massas de ovos postas nas 12h de luz e também nas 12h de escuridão total para o primeiro caso e todas as massas de ovos postas sob 12h de escuro para o segundo caso. Para ambos os casos, foram consideradas posturas por um total de cinco dias consecutivos, sendo assim, no primeiro caso foram obtidas posturas referentes à cinco dias e cinco noites por cada gaiola, totalizando um total de dez medições de massa; já no segundo caso, no qual somente foi medida a massa de ovos obtida durante 12h de escuro, houve apenas cinco obtenções de valores de massa por cada gaiola, referentes às 5 noites analisadas. Foram analisadas 12 repetições para cada caso (12 gaiolas).

Os números das massas de ovos obtidas no primeiro conjunto de gaiolas (primeira parte do experimento) foram separados em dois grupos para dar prosseguimento às análises estatísticas; o primeiro grupo (Grupo 1) consistia nas massas de ovos obtidas e pesadas apenas durante as 12h de luz do conjunto de gaiolas que receberam o substrato em ambos os períodos do dia, e o segundo grupo (Grupo 2) consistia nas massas de ovos obtidas apenas durante à noite do mesmo conjunto de gaiolas que recebeu o substrato em ambos os períodos do dia. Já o segundo conjunto, de outras 12 gaiolas, que recebeu o substrato de oviposição apenas durante a noite, separou-se apenas um grupo com os número de massas de ovos obtidas à noite, denominado de Grupo 3. O Grupo 1, portanto, refere-se às massas de ovos retiradas de oviposições realizadas apenas durante o dia de gaiolas que receberam o substrato de oviposição tanto de dia quanto à noite, sendo assim, de gaiolas cujas fêmeas estariam susceptíveis a ovipor em qualquer período do dia, já o grupo 2 refere-se às massas de ovos deste mesmo conjunto de gaiolas retiradas de oviposições realizadas apenas no período noturno (sob total ausência de luz) e o Grupo 3 refere-se às massas de ovos retiradas do conjunto de gaiolas que somente receberam o substrato de oviposição durante o período noturno, ou seja, de fêmeas que só podiam ovipor à noite.

Fonte: própria.

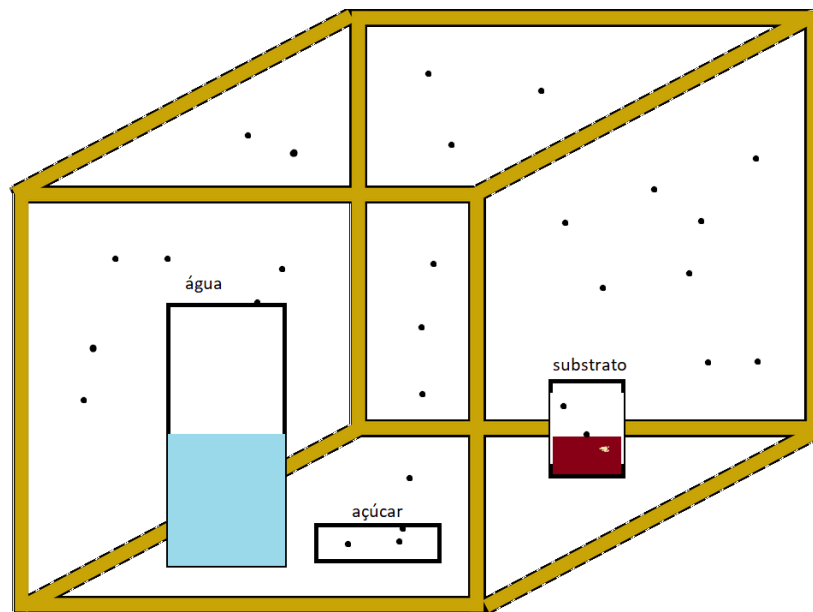


Figura 1. Esquema da gaiola telada onde foi realizado o experimento 1.

3.2.2 Análise noturna da busca ativa por substrato de oviposição

Neste experimento, que foi realizado apenas sob total ausência de luz por 12h, foi montada uma estrutura na qual foram utilizadas três gaiolas teladas unidas simetricamente por dois canos PVC de um metro cada um, sendo que em uma das gaiolas ficaram um total de 20 fêmeas selecionadas aleatoriamente para esse experimento (todas tendo completado o desenvolvimento ovariano); essa gaiola ficou conectada a uma segunda gaiola que se encontrava completamente vazia (para controle estatístico) e a uma terceira gaiola (como mostrado na Figura 2) com o substrato de oviposição durante as 12 horas de escuridão (o substrato de oviposição nesse caso consistiu em 40 gramas de carne moída em estágio inicial de putrefação).

Neste experimento, foi analisada a capacidade de busca ativa por substrato de oviposição na ausência de luz. Ao final das 12h de escuro total, foi observada a presença ou ausência de moscas nas gaiolas contendo o substrato de oviposição, e também foram quantificadas (pesadas) as massas de ovos obtidas no substrato de oviposição para futuras análises estatísticas, tendo sido analisado, então, se houve ou não locomoção das moscas para as gaiolas inicialmente vazias. Portanto, neste experimento foi analisada uma possível busca ativa por substrato (mesmo não

havendo oviposição) pela presença das moscas nas gaiolas contendo o substrato de oviposição, sendo que também foi analisada a possível busca ativa com realização de oviposição por parte das fêmeas selecionadas. O substrato de oviposição foi colocado pontualmente às 18h e retirado às 6h do dia seguinte durante a realização do experimento; e durante as 12h de luz do dia, as 20 fêmeas selecionadas aleatoriamente para o experimento receberam apenas açúcar e água para sua sobrevivência e foram mantidas em apenas uma gaiola para aguardar a continuação do experimento sob 12h de escuro. Este experimento foi feito por cinco noites, intercalando um dia entre cada uma delas. Foram realizadas 12 repetições.

Fonte: própria.

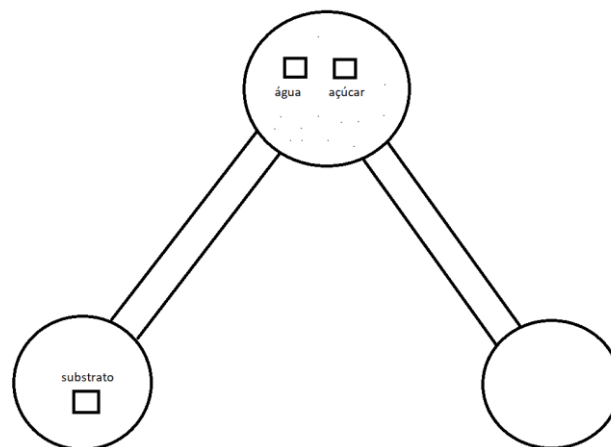


Figura 2. Esquema do experimento 2, na qual os círculos correspondem às gaiolas utilizadas.

3.2.3 Análises estatísticas

Foi utilizado o teste de normalidade dos dados de Liliefors para testar a normalidade dos grupos e escolher o teste estatístico utilizado posteriormente. Então, para todos os tópicos considerados, com o objetivo de se fazer comparação entre grupos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, método não-paramétrico utilizado para comparar duas ou mais amostras independentes (SIEGEL, 1975).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Referente aos resultados do experimento um, de análise de oviposição noturna e diurna, pode-se observar na Tabela 1 os valores brutos das massas de ovos pesadas em cada grupo do experimento 1 (a chave na tabela demonstra os cinco dias e/ou as cinco noites em que o experimento foi realizado, sendo o conjunto de cinco dias referente às medições de uma única repetição, totalizando 12 repetições, ou seja, 12 gaiolas utilizadas em cada caso). As médias das massas de ovos podem ser observadas na Tabela 2, em que nota-se uma maior média no grupo 1 em relação à média do grupo 2.

Tabela 1. Número de massa (em gramas) de oviposição de grada grupo de moscas por dia de experimento.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Dia 1	0,389	0	0,216
Dia 2	0,279	0	0,127
Dia 3	0,025	0	0,033
Dia 4	0,016	0,258	0,271
Dia 5	0,012	0	0,034
Dia 1	0	0,016	0
Dia 2	0,059	0	0,031
Dia 3	0	0,045	0,033
Dia 4	0,337	0,062	0,032
Dia 5	0	0	0,021
Dia 1	0,025	0	0
Dia 2	0,192	0	0
Dia 3	0	0	0,016
Dia 4	0	0	0,031
Dia 5	0,033	0	0
Dia 1	0	0	0,033
Dia 2	0,075	0	0
Dia 3	0	0,017	0,024
Dia 4	0,044	0	0
Dia 5	0	0	0
Dia 1	0	0	0,074
Dia 2	0,051	0	0
Dia 3	0	0	0
Dia 4	0	0,021	0,023
Dia 5	0	0	0
Dia 1	0,069	0	0,011
Dia 2	0,038	0	0
Dia 3	0,037	0	0

Dia 4	0	0	0
Dia 5	0	0,052	0
Dia 1	0,011	0	0,03
Dia 2	0,074	0,015	0
Dia 3	0	0	0
Dia 4	0	0	0
Dia 5	0	0	0
Dia 1	0,034	0	0
Dia 2	0,034	0,067	0,042
Dia 3	0	0	0
Dia 4	0	0	0
Dia 5	0,016	0	0,017
Dia 1	0,023	0	0
Dia 2	0	0	0
Dia 3	0	0	0,011
Dia 4	0,011	0	0,023
Dia 5	0	0	0
Dia 1	0,012	0	0
Dia 2	0	0	0
Dia 3	0	0,018	0,015
Dia 4	0,022	0	0
Dia 5	0,031	0	0,013
Dia 1	0,0283	0	0
Dia 2	0	0	0
Dia 3	0	0	0,064
Dia 4	0,029	0	0
Dia 5	0	0,012	0
Dia 1	0,08	0	0
Dia 2	0,037	0	0,154
Dia 3	0	0	0
Dia 4	0,068	0	0
Dia 5	0	0,032	0

Tabela 2. Médias aritméticas e desvio padrão das massas de ovos dos 3 grupos estudados.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Média Aritmética	0,0365±0,0768	0,0103±0,0359	0,023±0,0506

E como pode-se observar, antes de qualquer análise estatística dos resultados obtidos, ocorre sim a oviposição noturna das fêmeas analisadas, respondendo à pergunta inicial do trabalho. A partir disso, foi possível descobrir se a presença ou não de substrato de oviposição durante o dia influencia as oviposições realizadas durante a noite e se a ausência de substrato durante o dia influencia esse processo de postura de ovos por parte das fêmeas.

Para isso, além da média aritmética utilizou-se um teste de normalidade para saber qual teste de comparação estatística deveria ser utilizado, paramétrico ou não paramétrico. Para tanto foi realizado o teste de normalidade de Liefors, cujos resultados podem ser observados na Tabela 3, na qual todos os grupos apresentaram valores baixos de p, tendo a normalidade sido rejeitada em todos os grupos analisados.

Tabela 3. Análise estatística do teste de normalidade de Liefors.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tamanho da amostra =	60	60	60
Desvio máximo =	0,3172	0,4124	0,3249
Valor crítico (0.05) =	0,1144	0,1144	0,1144
Valor crítico (0.01) =	0,1331	0,1331	0,1331
p(valor)	< 0.01	< 0.01	< 0.01

A partir da rejeição de normalidade de todos os grupos, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, e com esse teste foi possível analisar o quanto cada grupo difere entre si com relação às massas de ovos depositadas (Tabela 4.)

Tabela 4. Quadro da análise estatística do teste de Kruskal Wallis.

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	pvalor
Grupos (1 e 2) =	30,5667	0,0013
Grupos (1 e 3) =	11,2583	0,2366
Grupos (2 e 3) =	19,3083	0,0424

De acordo com a análise estatística, quando o valor de p é inferior à 0,05 significa que os grupos se distinguem entre si, já quando o pvalor é superior à 0,05 significa que os grupos não possuem diferença significativa entre si. Sendo assim, analisando os valores de p na Tabela 4, é possível se chegar à conclusão de que o Grupo 1 e o Grupo 3 não têm diferenças significativas entre si, ou seja, o grupo que tinha disponível o substrato de oviposição durante o dia (1) não difere significativamente do grupo que tinha disponível o substrato de oviposição somente à noite (3). Em contrapartida, o Grupo 2 é aquele que difere dos outros dois grupos, ou seja, as moscas que tinham o substrato de oviposição disponível de dia e de noite ovipuseram uma quantidade maior de ovos durante o dia do que durante a noite, já que o Grupo 2 representa as massas de ovos obtidas durante a noite das moscas que tinham o substrato de oviposição disponível em ambos os períodos do dia. Em relação

ao Grupo 3 (que se refere às massas de ovos obtidas durante à noite de moscas que somente tinham o substrato de oviposição disponível nesse período), o Grupo 2 também possui diferença significativa, o que indica que as moscas ovipõem uma maior massa de ovos durante a noite (quando é oferecido a elas o substrato de oviposição apenas nesse período) do que quando elas podiam ovipor tanto de dia como à noite. Caso o substrato seja oferecido também de dia, a massa de ovos será maior durante o dia, como observado nos experimentos.

No experimento 2, de análise noturna de busca ativa por substrato de oviposição, foram feitas 12 repetições, durante 5 noites e neste segundo experimento praticamente todos os resultados foram negativos, tornando não aplicável nenhum teste estatístico para análise, pela falta de resultados positivos. Sendo assim, é possível afirmar que não houve locomoção significativa das fêmeas pelo cano PVC até as gaiolas, vazias ou com substrato de oviposição, e portanto, também não foi possível obter resultado estatisticamente significativo para oviposição no substrato presente em uma das gaiolas. Nas 12 repetições analisadas por 5 dias cada, em apenas dois dias foram observadas moscas nas gaiolas contendo substrato de oviposição, sendo uma mosca em cada um dos dias, e nenhuma das duas moscas realizou oviposição no substrato.

Já havia sido observada oviposição noturna de *C. megacephala* em experimentos realizados em campo, como é possível observar no trabalho de Singh e Barthi (2001), realizado na Índia, no qual iscas foram colocadas sob uma plataforma isolada por adesivos (para impedir predação de outros animais); nesse trabalho, além de ovos de *C. megacephala*, também foram obtidos ovos de *Calliphora vicina* e *Chrysomya rufiacies*. Também foram catalogadas oviposições noturnas de *C. megacephala* nos trabalhos de Byrd (1998) e Williams (2017), todos em condições de campo ao ar livre e sem condições controladas.

Outros trabalhos registraram atividade noturna e oviposição de outras moscas da família Calliphoridae, como o caso de Amendt (2008), que obteve oviposição noturna em duas ocasiões em situação de completa escuridão (as duas com fêmeas da espécie *Lucilia sericata*, que ovipuseram em gaiolas de plástico a 25 °C sob condições controladas de laboratório. Neste mesmo trabalho, também foi observada uma fêmea da mesma espécie ovipondo em uma isca logo após o nascer do sol, às 6h da manhã.

No caso do trabalho de George (2012), não foi obtido nenhum dado de atividade de oviposição noturna de nenhuma espécie em campo, mas em laboratório, quando foram colocadas iscas dentro de gaiolas; o resultado foi positivo para a atividade de oviposição, sugerindo que as moscas somente colonizaram restos mortais quando eles estão dispostos a uma curta distância de sua localização primária de descanso ou quando as moscas podem caminhar facilmente até o local onde se encontra o substrato de oviposição, guiadas provavelmente por sistemas olfativos. Também pode-se citar o trabalho de Greenberg (2012), no qual três espécies de grande importância forense (*Calliphora vicina*, *Phaenicia sericata* e *Phormia regina*) ovipuseram nas horas mais escuras da noite, embaixo de arbustos e também sob a luz artificial de um beco, considerando então oviposição apenas em campo.

Sendo assim, é possível criar um paralelo de alguns destes resultados obtidos por outros autores com os deste presente trabalho, uma vez que durante toda a realização do primeiro experimento em que foram colocadas iscas de oviposição dentro das gaiolas, foi obtido resultado positivo para a oviposição em todos os grupos analisados, mostrando assim que a espécie analisada ovipõe à noite, se comportando de forma semelhante a alguns trabalhos citados anteriormente.

Porém, no segundo experimento, no qual as gaiolas foram separadas por canos de um metro de comprimento, praticamente não foi detectada nenhuma movimentação nos canos por parte das moscas, tanto movimentação de caminhada quanto para a atividade de oviposição, sugerindo uma baixa metabólica desses dípteros no escuro ou talvez uma falha na percepção do odor dos substratos de oviposição colocados a essa distância e oferecidos às moscas.

Por muito tempo, considerou-se que as moscas Calliphoridae são inativas à noite e, portanto, um indivíduo morto durante esse período da noite somente seria colonizado pelos dípteros ao amanhecer, e isso pode acarretar uma grande discrepância entre o valor dado pelo cálculo do IPM e o tempo exato da morte (até 12h de diferença) (NUORTEVA, 1977). Sabe-se que as moscas-varejeiras usam sinais visuais e olfativos de forma combinada ao se aproximarem de um possível local de oviposição (AAK, *et al.*, 2011). Porém, na escuridão completa prevalecerão os sentidos olfativos dos dípteros, já que os sinais visuais não serão de grande relevância nesse ambiente sem luz, como demonstrado nas pesquisas feitas por Wooldridge e colaboradores (2007), que também demonstraram que além das moscas utilizarem

mais o olfato na ausência de luz, elas seriam incapazes de voar, mantendo assim uma movimentação de caminhada. Por este motivo, cadáveres encontrados ao chão seriam mais susceptíveis à colonização noturna do que aqueles suspensos por algum tipo de plataforma sobre o chão; no entanto, essa afirmação não foi confirmada pelos experimentos realizados por Singh e Bharti (2001), nos quais foi positivo o resultado para oviposição noturna em iscas localizadas acima do solo.

Devido às adaptações desses insetos em relação à falta de luz no ambiente, é mais provável que eles colonizem os substratos de oviposição quando estes se encontrem a uma curta distância de sua localização inicial após o começo do período noturno, pela facilidade de caminhada até o local e também pela facilidade de detecção do substrato por vias olfativas, já que a visão é prejudicada com a falta de luz (BUCHNER, 1979). Experimentos realizados por Baldrige (2006) em campo, demonstraram que as moscas podiam encontrar o cadáver durante o dia, se estabelecer nele e ovipor durante à noite, fazendo desnecessária nesse caso uma busca ativa pelo substrato, tanto por caminhada quanto por voo.

No primeiro experimento deste trabalho foi possível observar que as moscas apenas ovipuseram em situações na qual o substrato de oviposição foi colocado dentro da gaiola onde elas já se encontravam, facilitando assim o encontro do substrato e a posterior oviposição. Porém, no segundo experimento não houve busca ativa (significativa estatisticamente) pelo substrato de oviposição, e, portanto, também não houve oviposição.

É também de grande importância salientar que a temperatura pode ter grande influência no comportamento noturno de moscas Calliphoridae, tanto no comportamento de busca por substratos de oviposição quanto pelo comportamento de postura de seus ovos. Várias espécies de moscas se mostraram incapazes de voar em ambientes sem luz abaixo de 15 °C e algumas espécies, como *Chrysomya albiceps*, se mostraram incapazes de voar abaixo dos 21 °C (WILLIAMS, 2002; RICHARDS; 2009).

Porém, houve experimentos realizados em campo, como o de Williams, em 2017, em que foram gravadas em vídeos moscas voando à noite em temperaturas acima de 20 °C e em laboratório, foi possível o registro de moscas caminhando até a isca e ovipondo mesmo com temperaturas abaixo de 20 °C, com as iscas localizadas

dentro das gaiolas. Experimentos também demonstraram um aumento na probabilidade de oviposição de acordo com o aumento da temperatura, subindo de 11-33% na faixa dos 20 °C para 45-50% na faixa dos 25-27 °C (WILLIAMS, 2017). Segundo experimentos realizados por Barnes (2015), a ovipostura de moscas Calliphoridae foi realizada durante o dia até o limite de 17 °C e não foram obtidos dados de ovipostura noturna, visto que à noite a temperatura no local variava entre 1 °C e 16 °C, refletindo em uma baixa no metabolismo nas moscas e influenciando diretamente em seu comportamento. Nos experimentos realizados neste trabalho, a temperatura sempre esteve controlada em torno dos 25 °C e os resultados para a oviposição foram positivos tanto sob luz do dia quanto sob escuridão total com as iscas dentro da gaiola, não demandando busca ativa, como observado nos resultados referentes ao experimento 1.

Também é de extrema importância a análise dos ciclos circadianos dessas moscas, ou seja, dos ritmos de atividade noturna e de sono. Já foi comprovado que as moscas possuem ciclo circadiano definido e esse sono pode ser interrompido assim como o sono dos mamíferos (HENDRICKS, 2000). O fato das moscas possuírem ciclos circadianos definidos pode ser um empecilho para a realização de oviposição noturna com ou sem busca ativa pelo substrato de oviposição; no entanto, esses ritmos podem sofrer modificações com a existência de luz artificial em ambientes urbanos ou por meio de mutações genéticas (WILLIAMS, 2017). Porém, no presente trabalho foi observado que as moscas ovipuseram sob completa ausência de luz como evidenciado nos resultados referentes ao primeiro experimento, no qual as iscas foram colocadas dentro das gaiolas. No entanto, no mesmo experimento foi relatado que as moscas que possuíam a possibilidade de ovipor durante o dia e também durante a noite, ovipuseram maiores massas de ovos durante o dia; já as moscas que somente tinham a opção de ovipor à noite, ovipuseram uma quantidade de ovos estatisticamente semelhante às massas de ovos obtidas durante o dia das moscas que possuíam o substrato de oviposição em ambos os períodos do dia, sugerindo que o ciclo circadiano desses dípteros é alterado para a realização de oviposição noturna apenas quando não há a possibilidade de oviposição diurna e quando o substrato também é oferecido durante a noite.

5. CONCLUSÕES

- Observou-se que pode ocorrer oviposição durante a noite na espécie estudada e portanto, isso deve ser levado em conta no cálculo do intervalo pós-morte, uma vez que a determinação deste intervalo é baseada nos espécimes mais antigos encontrados no local (e estes podendo ser provenientes de oviposição noturna pode haver uma diferença de até 12 horas na estimativa do IPM, sendo essa diferença crucial para a resolução de crimes).
- Há maiores probabilidades das moscas colocarem ovos no período noturno se o substrato de oviposição se encontrar em um lugar de fácil acesso a partir de caminhadas e com curta distância do ambiente inicial do repouso após o pôr do sol, ajudando assim no cálculo de um IPM mais preciso e consequentemente na resolução de crimes, levando em conta o ambiente em que o cadáver foi encontrado e as condições do local antes da morte, com a possível presença desses dípteros antes ou depois da morte.
- São necessários mais experimentos na área a fim de esclarecer outros pontos da história natural desses dípteros para que, se torne ainda mais acurado o cálculo do IPM e mais abrangente o conhecimento do comportamento dessas moscas e suas consequências na aplicação da Entomologia Forense em casos reais.

6. Referências Bibliográficas

AAK A, KNUDSEN G. K., Sex differences in olfaction-mediated visual acuity in blowflies and its consequences for gender-specific trapping. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 139(1), p. 25–34, 2011.

AMENDT, J. et al. The nocturnal oviposition behavior of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Central Europe and its forensic implications. **Forensic Science International**, v. 175, p. 61–64, 2008.

AMORIM, J. A. & RIBEIRO, O. B. Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 780-784, 2001.

BALDRIDGE R. S., WALLACE S. G., KIRKPATRICK R., Investigation of nocturnal oviposition by necrophilous flies in central Texas, **Journal of Forensic Sciences**, v. 51, p. 125-126, 2006.

BARNES K. M., GRACE K. A., BULLING M. T., Nocturnal oviposition behavior of forensically important diptera in Central England, **Journal of Forensic Sciences**, 60 (6), 1601-1604, 2014.

BARTON-BROWNE, L. The role of olfaction in the stimulation of oviposition in the blowfly, *Phormiargina*. **Journal of Insect Physiology**, v. 5, p. 16-22, 1960.

BUCHNER E., PICK B., Visual movement detection under light- and dark adaptation in the fly, *Musca domestica*. **Journal of Comparative Physiology [A]**, v. 134 (1), p.45-54, 1979.

CATTS, E.P.; GOFF, M.L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 253-272, 1992.

GEORGE, K. A.; ARCHER, M. S.; TOOP, T. Nocturnal Colonization Behavior of Blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Southeastern Australia. **Journal of Forensic Sciences**, v. 58, p.112-116, 20 set. 2012.

GREENBERG, B. Nocturnal oviposition behavior of blow flies (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 5, p. 807-10, 1990.

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

GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P.; LINHARES, A. X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 22, n. 1, p. 53-60, 1978.

HENDRICKS JC, FINN S, PANCKERI KA, Chavkin J, Williams JA, Sehgal A, Pack A. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. **Neuron**. 2000;25:129-38

KEH, B. Scope and Applications of Forensic Entomology. **Annual Review of Entomology**, 30, p. 136-154, 1985.

KIRKPATRICK R. S. Nocturnal light and temperature influences on necrophagous, carrion-associating blow fly species (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance in central Texas. M.Sc. dissertation. College Station: Texas A&M University, p. 49, 2004.

LECCESE, A. Insects as forensic indicators: methodological aspects. **Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, v. 5, p. 33-39, 2004.

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

LORD, W. D.; & STEVENSON, J. R. Directory of Forensic Entomologists. Def. Pest Mgmt. Info. Anal. Center(eds), Washington: Walter Reed Army Medical Center, 1986.

MÉGNIN, J. 1894. La faune des cadavres: application de l'entomologie a la medecine legale. Encyclopedie Scientifique des Aides Memoires. Masson et Gauthiers-Villars, Paris, 2014.

MONTEIRO-FILHO, E. A.; PENEREIRO, J. Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia** 47: 289–295, 1987.

NORRIS, K. R. The Bionomics of blow flies. **Annual Review of Entomology**, v. 10, n. 1, p. 47–68, 1965.

P. NUORTEVA, Sarcosaprophagous insects as forensic indicators, in: C.G. Tedeschi, W.G. Eckert, L.G. Tedeschi (Eds.), **Forensic Medicine: A Study in Trauma and Environmental Hazards**, Saunders, Philadelphia, p. 1072-1095, 1977.

ODY, H., BULLING M. T., BARNES K. M. Effects of environmental temperature on oviposition behavior in three blow fly species of forensic importance. **Forensic Science International**, 2017.

OLIVEIRA-COSTA, J. Entomologia Forense Quanto os insetos são Vestígios. Millenium, p. 257, 2003.

PÉREZ, P. S., DUQUE, P., WOLFF, M., Successional Behavior and occurrence matrix of Carrion-Associated Arthropods in the Urban Area of Medellin, Colombia. **Journal of Forensic Sciences**, p. 50, 2005.

PUJOL-LUZ, R, J. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908 -2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, 52(4), p. 485-492, 2008.

P. KINTZ, B. GODELAR, A. TRACQUI, P. MANGIN, A.A. LUGNIER, A.J. CHAUMONT, Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine, **Journal of Forensic Sciences**. v. 35 p. 204-207, 1990.

RICHARDS CS, PRICE BW, VILLET MH. Thermal ecophysiology of seven carrion-feeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Southern Africa. **Entomologia Experimentalis et Applicata** p. 131:11-9, 2009.

ROQUETE-PINTO, E. Nota sobre a fauna cadavérica do Rio de Janeiro. **A Tribuna Médica**, v. 21, p. 410-416, 1908.

SIEGEL, Sidney. Estatística Não-paramétrica para as Ciências do Comportamento. São Paulo: McGraw-Hill, 1975.

SINGH D., BHARTI M., Further observations on the nocturnal oviposition behaviour of blow flies (Diptera: Calliphoridae), **Forensic Science International**, v. 120, p. 124-126, 2001.

SMITH, K. G. V. A manual of forensic entomology. Trustees of the British Museum, London, 1986.

SCHOENLY, K.; GRIEST, K.; RHINE, S. An Experimental Field Protocol for Investigating the Postmortem Interval Using Multidisciplinary Indicators. **Journal of Forensic Sciences**, v. 36, p. 1395-1415, 1991.

VON ZUBEN, C. J.; BASSANEZI, R. C.; REIS, S. F.; GODOY, W. A. C.; ZUBEN, F. J. V. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of post feeding larval dispersal. **Journal of Applied Entomology**, v. 120 p. 379-382, 1996.

YEATES, D. K.; WIEGMANN, B. *The Evolutionary Biology of Flies*. New York, United States of America: Columbia University Press, p. 430, 2005.

WOOLDRIDGE. J, SCRASE. L, WALL. R. Flight activity of the blowflies, *Calliphora vomitoria* and *Lucilia sericata*, in the dark. **Forensic Science International**, 3:94–7, 2007.

WILLIAMS. K. A., Spatial and temporal occurrence of forensically important South African blowflies (Diptera: Calliphoridae). M.Sc. thesis. Grahamstown: Rhodes University, p. 79, 2002.

WILLIAMS K. A., J. F. WALLMAN, B. D. LESSARD, C. R. J. KAVAZOS, D.N. MAZUNGULA, M. H. VILLET, Nocturnal oviposition behavior of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in the southern hemisphere (South Africa and Australia) and its forensic implications, **Forensic Science, Medicine and Pathology**, 2017.

Assinatura do aluno

Priscila Silveira Corrêa

Assinatura do orientador

Claudio José von Zuben