



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**ESTUDO DOS PERÍODOS DE PRÉ-COLONIZAÇÃO E  
OVIPOSIÇÃO DE DÍPTEROS COLONIZADORES PRIMÁRIOS DE  
CADÁVERES DURANTE A NOITE E O DIA**

Trabalho submetido por  
**Ana Catarina Amaral Cadete**  
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

**janeiro de 2021**



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM  
CIÊNCIAS FORENSES**

**ESTUDO DOS PERÍODOS DE PRÉ-COLONIZAÇÃO E  
OVIPOSIÇÃO DE DÍPTEROS COLONIZADORES PRIMÁRIOS DE  
CADÁVERES DURANTE A NOITE E O DIA**

Trabalho submetido por  
**Ana Catarina Amaral Cadete**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Maria Teresa Rebelo (FCUL, CESAM)**

e coorientado por  
**Mestre Paulo Mascarenhas (IUEM)**

**janeiro de 2021**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, um agradecimento especial ao meu avô *Pais do Amaral*, que infelizmente não teve a oportunidade de me ver alcançar um objetivo que tanto desejei e que desde o início se mostrou presente para me ajudar.

Agradeço à minha mãe, *Anabela*, por me ter ajudado neste percurso que sempre ambicionei. Um enorme obrigada!

Aos *Primos*, agradeço pelo apoio incondicional! Obrigada por estarem na minha vida. Adoro-vos!

Obrigada à *Professora Doutora Maria Teresa Rebelo* por mais uma vez me ter recebido num estudo em Entomologia Forense e ao *Professor Paulo Mascarenhas* por ter despertado o interesse nesta área e ter acompanhado no decurso deste projeto.

Obrigada ao *Professor Doutor Alexandre Quintas*, coordenador do curso de Ciências Forenses e Criminais, sem ele, não teríamos a oportunidade de ingressar e fazer crescer nesta área.

Por fim, obrigada ao *Instituto Universitário Egas Moniz* por acolher os alunos do Mestrado em Tecnologias Laboratoriais em Ciências Forenses, bem como aos seus docentes, dando assim a oportunidade de termos uma formação de excelência.

## Resumo

Na presente dissertação, desenvolveu-se um estudo sobre a pré-colonização e oviposição de dípteros primários de cadáveres durante o período diurno e noturno, realizado inicialmente na Faculdade de Ciências de Lisboa (FCUL) e posteriormente no Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), entre dezembro e janeiro de 2019, e entre julho e setembro de 2020, respetivamente.

Na FCUL realizou-se um ensaio preliminar que visou coletar dípteros colonizadores primários atraídos para armadilhas iscadas com fígado de porco, para proceder à identificação das espécies mais abundantes na região da Grande Lisboa que devido à pandemia Covid-19 apenas decorreu no Outono.

No IUEM foram realizados seis ensaios para estudar a pré-colonização e oviposição de dípteros colonizadores primários que englobaram os períodos diurnos e noturnos, a diferentes temperaturas. Nestes ensaios, os dados meteorológicos e os registos fotográficos foram realizados com o auxílio do aparelho meteorológico Weather Station PCE-FWS 20 e a câmara Wingscapes® TimelapseCam Pro WCT-00126, respetivamente. Os espécimes foram recolhidos, identificados e preservados em álcool a 70%.

Não foi registada atividade noturna por parte dos dípteros colonizadores primários, mas apenas de uma família de dípteros não identificada, quando a temperatura média noturna foi de 26°C entre as 22h de 16 de julho de 2020 e as 7h de dia 17 de julho de 2020. Durante os estudos diurnos, verificou-se a presença maioritária da espécie *Lucilia sericata* (Meigen) nos ensaios realizados entre julho e setembro de 2020.

A análise de dados mostrou uma maior probabilidade de oviposição nas temperaturas mais elevadas. A precipitação e a humidade elevadas mostraram ter um impacto negativo na realização de oviposição, bem como no desenvolvimento dos ovos, sendo por isso fatores a ter em conta na determinação do intervalo *post mortem* (IPM).

**Palavras-chave:** Entomologia Forense, oviposição noturna, oviposição diurna, intervalo de pré-aparecimento

*Estudo dos períodos de pré-colonização e oviposição de dípteros colonizadores primários de cadáveres durante a noite e o dia*

## Abstract

In this thesis a study has been developed about pre-colonization and oviposition of primary diptera with forensic importance at daytime and nocturnal time performed initially at Faculty of Sciences of the University of Lisbon (FCUL) and later at the University Institute of Egas Moniz (IUEM) between December and January of 2019, and July and September of 2020, respectively.

At FCUL a preliminary test was performed which aimed to collect primary colonizing diptera attracted to baited traps with pig liver, to proceed to the identification of the most abundant species in the Great Lisbon, that due to the Covid-19 pandemic only took place in autumn.

In IUEM six experiments were performed to study the pre-colonization and oviposition of primary colonizing diptera at diurnal and nocturnal time at different temperatures. In these tests the meteorological data and photographic records were performed with the assistance of meteorological device Weather Station PCE-FWS 20 and Wingscapes® TimelapseCam Pro WCT-00126 camera, respectively. The specimens were collected, identified, and preserved in 70% alcohol.

No nocturnal activity was recorded by the primary colonizing diptera, but by an unidentified family when the average nocturnal temperature was 26°C (79°F) between 10pm of July 16<sup>th</sup> and 7am of July 17<sup>th</sup> of 2020. During daytime studies, it was found the majority presence of the species *Lucilia sericata* (Meigen) in tests carried out between July and September of 2020.

Data analysis showed a higher probability of oviposition at high temperatures. High rainfall and humidity shown to have a negative impact on oviposition as well as on egg development, which is why these factors have to be considered in determining the *post mortem* interval (PMI).

**Keywords:** Forensic entomology, nocturnal oviposition, diurnal oviposition, pre appearance interval

*Estudo dos períodos de pré-colonização e oviposição de dípteros colonizadores primários de cadáveres durante a noite e o dia*

## Índice

<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Índice</b> .....	5
<b>Índice de Figuras</b> .....	7
<b>Índice de Tabelas</b> .....	9
<b>Introdução</b> .....	11
<b>Materiais e Métodos</b> .....	19
<i>Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL)</i> .....	19
<i>Ensaio diurnos e noturnos no Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM)</i> .....	21
<i>Desenho Experimental</i> .....	22
<i>Análise Estatística</i> .....	23
<b>Resultados e Discussão</b> .....	25
<i>Identificação de espécimes coletados na Faculdade de Ciências de Lisboa</i> .....	25
<i>Identificação das espécies coletadas nos ensaios diurnos e noturnos no Instituto     Universitário Egas Moniz</i> .....	26
<b>Conclusão</b> .....	41
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	43

## ANEXOS

**Anexo I:** Cronograma dos ensaios diurnos e noturnos no IUEM

**Anexo II :** Insetos adultos recolhidos das armadilhas

**Anexo III:** Estruturas de dípteros imaturos

*Estudo dos períodos de pré-colonização e oviposição de dípteros colonizadores primários de cadáveres durante a noite e o dia*

## Índice de Figuras

**Figura 1** – Esquema das armadilhas nos ramos das árvores. Cada armadilha apresentava uma abertura lateral para permitir a entrada dos insetos, e dificultar a sua saída.

**Figura 2** - Localização da armadilhagem (marca amarela) na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (38°45'22"N 9°09'30"W).

**Figura 3** – Coloração das diferentes pupas, sendo a mais escura indicadora de maior maturação.

**Figura 4** – Localização da armadilha férrea (marca amarela) no Instituto Universitário Egas Moniz (38°40'01"N 9°12'02"W).

**Figura 5** – Armadilha férrea equipada com (a) estação meteorológica Weather Station PCE-FWS 20, (b) câmara Wingscapes® TimelapseCam Pro WCT-00126 e (c) caixa de Petri com fígado de porco.

**Figura 6** – Amostra de atividade noturna observada entre as 22h de dia 16 de julho e as 7h do dia seguinte.

**Figura 7** – Quinta armadilha colocada às 15h10min, com início de atividade às 15h17min.

**Figura 8** – Oviposição realizada por mais do que um díptero fêmea duas horas após o início do quinto ensaio.

**Figura 9** – Submersão dos ovos causada pela precipitação durante as primeiras horas da manhã.

**Figura 10** – *Sex-ratio* do primeiro (A), segundo (B) e sexto (C) ensaios.

**Figura 11** – Registo de atividade a partir das 06h40min da manhã de 17 de julho de 2020, com nascer-do-sol registado às 06h26min.

**Figura 12** – Registo da última actividade no dia 3 de agosto de 2020 às 20h29min, com pôr-do-sol registado às 20h42min.

*Estudo dos períodos de pré-colonização e oviposição de dípteros colonizadores primários de cadáveres durante a noite e o dia*

## **Índice de Tabelas**

**Tabela 1** – Dípteros recolhidos das armadilhas colocadas na FCUL a 3 de dezembro de 2019.

**Tabela 2** – Diversidade de insetos eclodidos das armadilhas a 26 de dezembro de 2019.

**Tabela 3** – Diversidade de insetos adultos fêmea capturados na armadilha do sexto ensaio.

**Tabela 4** - Diversidade de dípteros adultos eclodidos.

**Tabela 5** - Valores médios das temperaturas diurnas e noturnas, da velocidade do vento, da humidade e das pressões atmosféricas dos seis ensaios

**Tabela 6** –Horário do nascer e pôr-do-sol nos diferentes ensaios.

**Tabela 7** – Resultados da análise logística para a realização de atividade (dados diurnos).

**Tabela 8** – Estimativa da oviposição efetuada durante o dia em relação à humidade, ponto de condensação da água e total de moscas que a realizaram.

**Tabela 9** – Valores médios de temperatura, humidade e ponto de condensação da água durante a atividade (a) e oviposição (b) na ausência de luz.

**Tabela 10** – Valores médios de temperatura, humidade e ponto de condensação da água durante a atividade (a) e oviposição (b) na presença de luz.

**Tabela 11** – Média de tempo de realização de oviposição nos cinco ensaios durante o período diurno.

*Estudo dos períodos de pré-colonização e oviposição de dípteros colonizadores primários de cadáveres durante a noite e o dia*

## Introdução

A Entomologia Forense consiste no estudo de insetos e outros artrópodes associados ao processo da decomposição de cadáveres e contribui para a resolução de investigações civis e criminais (Amendt *et al.*, 2004; Harnden & Tomberlin, 2016).

Embora o primeiro caso registado seja datado do século XIII na China (Rebello *et al.*, 2014), esta disciplina ganhou relevância apenas no final do século XIX com a avaliação da sucessão de insetos nos cadáveres, estabelecendo adequadamente a ciência da entomologia forense (Amendt *et al.*, 2004; Harnden & Tomberlin, 2016).

Após a morte de um humano ou animal, o corpo sofre várias mudanças causadas pela autólise dos tecidos, iniciando a deterioração interna e alterando, assim, a natureza física e/ou a aparência do corpo (Goff, 2010). A decomposição é um processo contínuo, distinguido por mudanças físicas e químicas que são únicas em cada organismo, mas os processos envolventes são idênticos (Rivers & Dahlem, 2014; Vass, 2001). As mudanças químicas são classificadas em duas categorias: autólise e putrefação. A primeira, assenta na autodigestão ou destruição de uma célula provocada pela ação enzimática na própria célula. Apesar da autodigestão ser uma ação rara nas células vivas ou *ante mortem* (anterior à morte), esta está associada às alterações *post mortem* (após a morte) (Rivers & Dahlem, 2014). A segunda, é definida pela degeneração química dos tecidos moles predominantemente catalisada por ação microbiana, e classificada pela destruição das proteínas nestes mesmos tecidos e geralmente apresenta um início retardado em relação à autólise, devido depender da atividade de microrganismos. Do ponto de vista bioquímico, a destruição das células e tecidos *post mortem* é ainda dependente de dois fatores: abióticos e bióticos. A decomposição abiótica depende da ação química da autólise e putrefação, bem como os processos físicos associados com o ambiente e micro-habitat onde se encontra o corpo, enquanto a decomposição biótica assenta na degradação catabólica do material orgânico auxiliado por organismos vivos que incluem bactérias, fungos, insetos e vertebrados (Rivers & Dahlem, 2014).

A morte é geralmente marcada pela cessação da atividade do sistema cardiovascular. Em minutos, o teor de oxigénio (O<sub>2</sub>) diminui, resultando no aumento de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e conseqüentemente acidificação dos fluídos. Apesar de a morte significar a total perda de regulação celular, a atividade enzimática intracelular perdura. Lípases, protéases, e outras enzimas são libertados por lisossomas para o citoplasma iniciando a autólise das células, processo que é influenciado pela temperatura

(Michalski & Nadolski, 2018) e pela abundância de enzimas presentes nos diferentes sistemas.

Após a morte, o corpo cessa a regulação da temperatura interna e esta começa a aproximar-se da temperatura ambiente (*algor mortis*) (Christensen *et al.*, 2019; Goff, 2010; Rivers & Dahlem, 2014) num período entre dezoito e vinte horas, dependendo do tamanho do indivíduo e da exposição solar. O intervalo *post mortem* (IPM) poderá ser estimado a partir da temperatura do fígado, mas com a limitação deste ter de ser calculado até às dezoito horas após a morte (Goff, 2010).

A paragem da circulação sanguínea conduz à deposição do sangue e outros fluídos nas partes inferiores do corpo por ação da gravidade, sendo este processo referido como *livor mortis*. Este processo observa-se aproximadamente uma hora após a morte e continua entre nove a doze horas após a morte, exibindo uma descoloração onde o sangue se encontra depositado (Christensen *et al.*, 2019; Goff, 2010; Rivers & Dahlem, 2014). O enrijecimento dos músculos ou *rigor mortis* é causado pelas mudanças das miofibrilas dos tecidos musculares (Goff, 2010). Os músculos requerem a molécula denominada de adenosina trifosfato (ATP) para que ocorra a contração no músculo. Após a morte, as reservas corporais de ATP esgotam-se e os músculos continuam contraídos até as fibras musculares iniciarem a sua própria decomposição (Christensen *et al.*, 2019). O *rigor mortis* normalmente tem uma duração de vinte e quatro a oitenta horas, onde posteriormente os músculos começam novamente a relaxar. Este tempo é influenciado pela temperatura e pelo estado metabólico do corpo. As temperaturas baixas tendem a acelerar a rigidez e a prolongar a sua duração, enquanto as temperaturas mais elevadas provocam o inverso (Goff, 2010).

Os fenómenos abióticos transformativos classificam-se em destruidores e conservadores. Nos fenómenos abióticos destruidores englobam-se claramente a autólise e a putrefação, bem como a maceração, onde se observa o destacamento de amplos retalhos de tegumentos cutâneos que se assemelham a luvas, ocorrendo quando há submersão do corpo em meio líquido contaminado (Christensen *et al.*, 2019; Goff, 2010). Por outro lado, como o nome refere, os fenómenos conservadores são processos que preservam o corpo, como a mumificação e a saponificação/adipocera. A primeira ocorre pelo processo natural em condições climáticas que favorecem a rápida desidratação do corpo, como temperaturas extremamente altas ou muito baixas, impedindo a ação bacteriana que promoveria a putrefação, porém, poderá observar-se atividade por parte dos insetos se o corpo ainda possuir fluidos corporais e restos de tecidos moles por baixo

da pele ressequida (Christensen *et al.*, 2019); Na segunda, o indivíduo apresenta uma consistência mole e quebradiça, de tonalidade amarelo-escuro dando aparência de cera ou sabão. Ocorre em solos argilosos e húmidos, a que os corpos foram submetidos. (ex: valas comuns).

Como já descrito, decomposição é um processo contínuo iniciando com a altura da morte e terminando na sua esqueletização. Segundo Goff (2010) e Christensen *et al.* (2019), ocorrem cinco fases de decomposição, porém, existem autores que contabilizam um número superior de fases, dependendo da sua região geográfica. Contudo, este processo geralmente divide-se em:

1. Fresca – inicia com o momento da morte e termina com o inchaço do corpo. Poderá observar-se a descoloração esverdeada do abdómen, *livor mortis*, “*tache noir*” e rutura da pele. Nesta fase, os primeiros insetos chegam ao corpo, começando a colonização nas aberturas naturais do corpo (nariz, orelhas, olhos, boca, ânus e genitais) ou nos traumas provados na altura da morte;
2. Gasosa – início da putrefação. Bactérias anaeróbias que se encontram no abdómen e outras regiões do corpo começam a alimentar-se a partir dos tecidos. O seu processo metabólico resulta na produção de gases ricos em amoníaco, causando o inchaço do abdómen, que por sua vez, causa pressão interna, conduzindo à libertação de fluidos pelas aberturas naturais bem como o odor característico a amoníaco. Alteração do pH solo, tornando-se alcalino;
3. Decomposição ativa – o inchaço corporal diminui e os restos mortais apresentam sinais de dissecação, onde se poderá observar a exposição óssea. Fungos podem estar presentes se se encontrarem num ambiente húmido. As larvas de dípteros abandonam o corpo para puparem, verificando-se um aumento da quantidade de coleópteros;
4. Pós-decomposição ativa – o corpo é reduzido a pele, cartilagem e osso. Não ocorre oviposição de insetos;
5. Esqueletização – restos ósseos e capilares. O solo retoma gradualmente o pH, podendo indicar posteriormente a presença de um cadáver. Os pupários vazios poderão ser úteis para análise toxicológica e para a estimativa do intervalo *post mortem* (IPM).

O intervalo *post mortem* (IPM) consiste no intervalo de tempo entre a morte e a descoberta do cadáver (Amendt *et al.*, 2011) e é baseado na previsibilidade das espécies que chegam ao corpo e resulta na sua sucessão durante a decomposição física ou estimada a partir do desenvolvimento larvar, ou seja, a partir de qualquer estadio da sua evolução larvar (Rivers & Dahlem, 2014g; Wells & LaMotte, 2010). No sentido mais amplo, o IPM é dividido em intervalo de pré-colonização (pré-CI) e intervalo de pós-colonização (pós-CI). O pré-CI trata-se de um intervalo desde a morte de um indivíduo até à sua colonização por artrópodes e o pós-CI como o intervalo de tempo da colonização dos artrópodes dos restos mortais até à sua dispersão (Tomberlin *et al.*, 2011).

A estimativa do intervalo *post mortem* mínimo (IPMmin) pode ser realizada nas primeiras semanas após a morte baseando-se na temperatura da cena de crime (Martín-Vega *et al.*, 2019) e no cálculo da idade dos insetos imaturos encontrados no cadáver (Bonacci *et al.*, 2016; Disney *et al.*, 2014; Harnden & Tomberlin, 2016). Contudo, o intervalo de atividade de insetos pode nem sempre corresponder ao IPMmin devido ao atraso dos insetos a encontrar o corpo, como por exemplo, em casos de enterro ou congelação do cadáver (Amendt *et al.*, 2011). É igualmente possível avaliar se ocorreu a transferência do corpo *post mortem*, bem como a presença de drogas ou venenos (Bugelli *et al.*, 2014). Nestes casos, a sucessão de artrópodes colonizadores é alterada, afetando, assim, o intervalo de pré-aparecimento (IPA) (Matuszewski, 2011; Matuszewski & Madra, 2015; Wells, 2019).

O desenvolvimento e crescimento dos insetos imaturos ocorre num padrão que permite estabelecer o período após a morte mínimo (Rivers & Dahlem, 2014a). Os dois grupos mais importantes para uma investigação forense são as espécies das ordens Diptera e Coleoptera. A primeira ordem é distinguida pelo único par de asas membranosas nos adultos, localizadas no mesotórax, enquanto os coleópteros adultos possuem, normalmente, quatro asas sendo o par de asas medianas (élitros) rígido.

Existem outros insetos que têm uma ligação direta com o fenómeno da cadaverização (Rebelo *et al.*, 2014) denominados por:

1. Necrófagos – a alimentação é realizada diretamente do corpo em decomposição, são bons indicadores do intervalo *post mortem*
2. Predadores e parasitas de necrófagos – como dípteros da família Calliphoridae, coleópteros das famílias Silphidae, Staphylinidae e Histeridae e a ordem Hymenoptera

3. Omnívoros – consomem indistintamente o cadáver ou os artrópodes associados, tais como as famílias Formicidae e Vespidae da ordem Hymenoptera
4. Acidentais – usam o corpo como extensão do seu habitat natural como aracnídeos e ácaros

As duas famílias de dípteros mais importantes para a determinação do IPM são as Calliphoridae e Sarcophagidae. As espécies da família Calliphoridae apresentam, geralmente, uma coloração metálica, enquanto as espécies da família Sarcophagidae são cinzentas, com característico abdómen axadrezado e de tamanho superior aos demais insetos importantes na área forense. Existem igualmente outras famílias como Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae, entre muitas outras com importância forense.

Na entomologia forense é importante compreender o que conduz os insetos ao corpo e o que os leva a colonizá-los. Os insetos usam os mesmos sentidos que os humanos, mas muito mais enfatizados, tornando-os mais sensíveis ao ambiente químico do que ao mundo visual (Rivers & Dahlem, 2014c), levando-os a localizar o corpo a partir dos compostos sulfurosos libertados pela putrefação, como sulfato de hidrogênio ( $H_2S$ ) e/ou dióxido de enxofre ( $SO_2$ ), bem como dióxido de carbono ( $CO_2$ ), metano ( $CH_4$ ), amônia ( $NH_4$ ) e hidrogênio ( $H_2$ ) (LeBlanc & Logan, 2010; Vass, 2001). Estes compostos são captados pelas antenas, que contêm quimiorreceptores, alertando para uma potencial fonte de alimento ou local de oviposição (Brundage & Byrd, 2016; Chaudhury *et al.*, 2015; LeBlanc & Logan, 2010; Lima & Von Zuben, 2016; Rivers & Dahlem, 2014c).

Os dípteros adultos das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae são geralmente os primeiros insetos a colonizar o cadáver, sendo, no geral, a visão e o olfato mais sensíveis nas fêmeas adultas devido ao ambiente de sucessão competitivo (Rivers & Dahlem, 2014c). As fêmeas da espécie *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) são atraídas pelos compostos trissulfeto de dimetilo ( $C_2H_6S_3$ ) e outros derivados de enxofre, enquanto as fêmeas de *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) são cativadas por dissulfureto de dimetilo ( $C_2H_6S_2$ ), fenol, entre outros (Chaudhury *et al.*, 2015), compostos voláteis encontrados em peixes, ratos ou fígado fresco (Rivers & Dahlem, 2014c), sendo que estes poderão influenciar na realização da oviposição ou larviposição, e igualmente atrair outros insetos, como os parasitoides. A região geográfica, as estações do ano, a exposição solar e a localização do cadáver influenciam as espécies que o alcançam, bem como a realização ou não da

oviposição/larviposição (Anderson, 2010; Bernhardt *et al.*, 2018; Martín-Vega *et al.*, 2019).

Quanto à reprodução de dípteros necrófagos, o cadáver pode constituir tanto alimento, como um possível local de ritual de oviposição. Segundo Wall *et al.* (2002) e Hans *et al.* (2018), algumas espécies necessitam de várias visitas ao corpo ou períodos extensos de alimentação para a maturação dos seus oócitos, condição denominada de anautogenia. Autogenia, é outro termo utilizado frequentemente em entomologia que descreve a condição em que um díptero fêmea adulto é capaz de produzir ovos sem se alimentar de sangue (Rivers & Dahlem, 2014d) sendo mais comum em fêmeas Calliphoridae do que Sarcophagidae, uma vez que a segunda família realiza larviposição, uma reprodução estratégica, onde as fêmeas produzem os ovos e os incuba internamente após a sua fertilização, depositando as larvas (Pimsler *et al.*, 2014) . Contudo, a presença de outros ovos, larvas ou outros indivíduos pode igualmente atrair fêmeas grávidas (Chrabidze *et al.*, 2015).

Após a oviposição/larviposição, a quantidade de larvas presente pode ser homogênea, ou seja, apenas se observa a presença de uma única espécie, ou mais comumente, heterogênea, composta por diversas espécies das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Fanniidae e outros grupos de micro dípteros (Rivers & Dahlem, 2014e).

Todavia, a temperatura é um fator importante no retardamento da decomposição do cadáver, uma vez que as bactérias e os insetos a temperaturas baixas cessam o seu crescimento e atividade (Goff, 2010; Vanin *et al.*, 2011). Quanto aos insetos, estes podem retomar a sua atividade quando a temperatura lhes for favorável, mas pode resultar na sua morte se as temperaturas forem muito elevadas (Rivers & Dahlem, 2014f).

Todos os insetos são poiquilotérmicos, o que significa que não têm a capacidade de regular a temperatura interna, mas no geral possuem enzimas que operam numa ampla gama de condições, uma adaptação para as temperaturas mais altas ou baixas que o seu ótimo fisiológico (Rivers & Dahlem, 2014f). Esta adaptação auxilia na deposição dos ovos em condições ambientais eventualmente adversas, que para além de serem colocados nas cavidades naturais, também ocorrem por baixo das roupas que o individuo possua, de forma que aqueles não sejam muito afetados pelas variações térmicas e possam maturar, e que posteriormente as larvas eclodidas possam migrar para as cavidades corporais como proteção contra as temperatura e/ou vento extremos. Tal como a

temperatura e o vento, a precipitação é igualmente uma barreira contra a atividade realizada pelos insetos (Goff, 2010; Rivers & Dahlem, 2014f).

Contudo, a presença de luz ou exposição solar (Lutz *et al.*, 2018) é mais um fator que influencia a realização de oviposição, uma vez que esta ação pode alterar o IPMmin em pelo menos doze horas (Barnes *et al.*, 2015; Greenberg, 1990; Zulaikha & Zuha, 2016), dado que geralmente se assume apenas a realização de oviposição num período diurno, dada a inatividade noturna na grande maioria das espécies com importância forense (Greenberg, 1990). Segundo um estudo efetuado por Berg & Benbow (2013), as fêmeas são atraídas pelas armadilhas durante a noite, contudo, a oviposição só ocorre após o amanhecer. Todavia, foi observada atividade noturna de *C. vicina* no estudo de Bonacci *et al.* (2016) em temperaturas compreendidas entre 12°C e 24°C.

No sul da Europa, particularmente na Península Ibérica, as condições climáticas divergem com a influência do Mar Mediterrâneo e do Oceano Atlântico, afetando a sucessão de insetos, alterando, conseqüentemente, a sucessão faunística nas diferentes estações do ano (Prado e Castro, 2012; Vanin *et al.*, 2011).

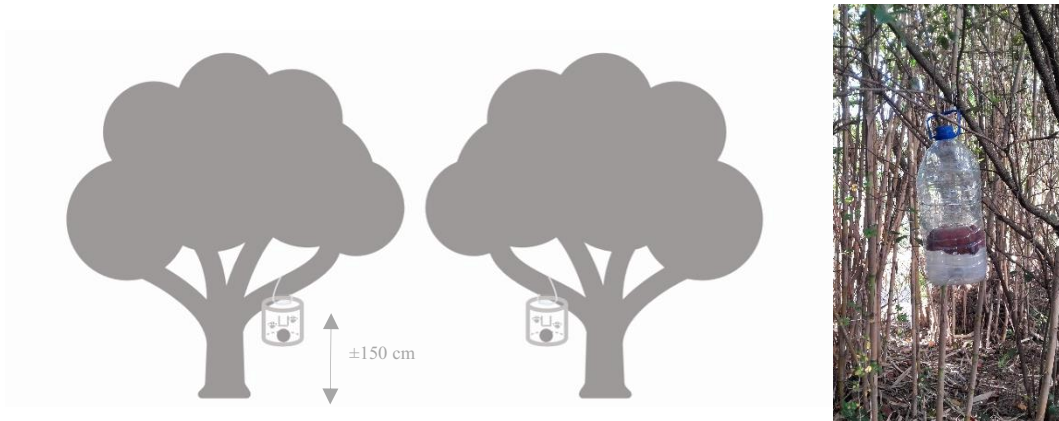
Uma vez que o IPM é influenciado pelo tempo de pré-colonização e oviposição, este estudo teve o intuito de analisar o tempo que os dípteros colonizadores primários demoram a colonizar e a realizar a oviposição no cadáver, e se esta ocorre no período noturno. Adicionalmente, verificou-se o *sex-ratio* dos dípteros que eclodiram das oviposições, e que foram atraídos para as armadilhas no período diurno.



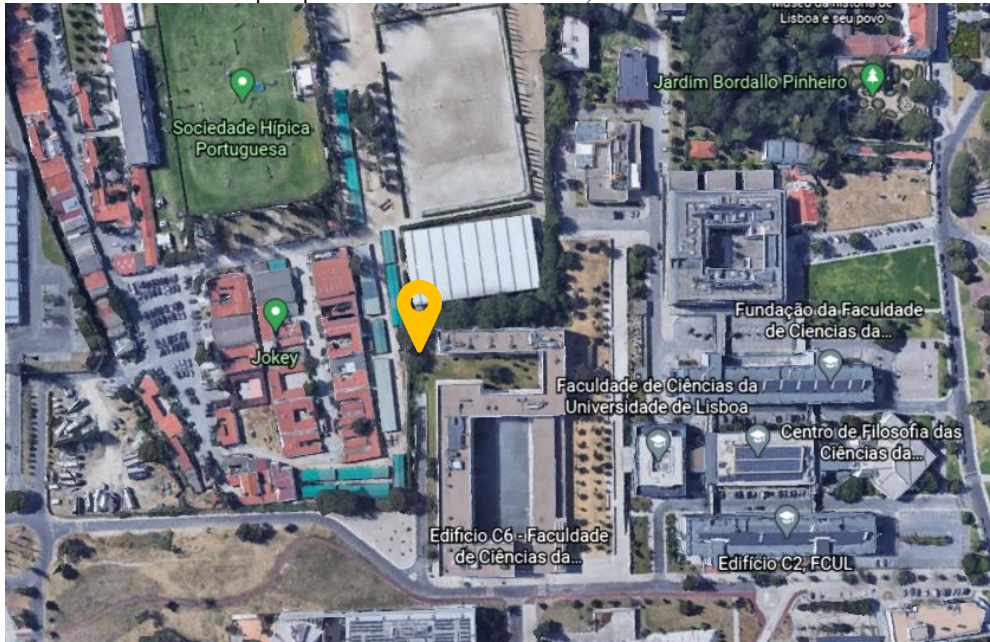
## Materials e Métodos

### *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL)*

No dia 3 de dezembro de 2019, prepararam-se duas garrafas de plástico de 1L que continham cerca de 300g de fígado de porco já em decomposição. Estas armadilhas foram de seguida presas a ramos de árvores (**Figura 1**) numa zona imperturbável da FCUL, junto à Sociedade Hípica (**Figura 2**), tendo-se registado a temperatura exterior.



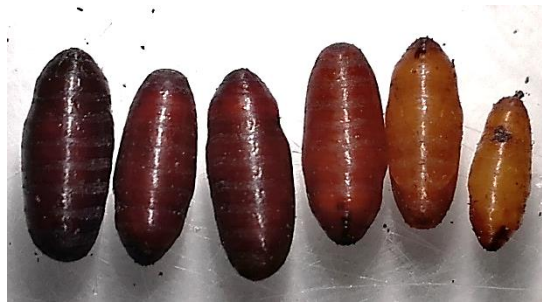
**Figura 1** – Esquema da colocação das armadilhas nos ramos das árvores. Cada armadilha apresentava uma abertura lateral para permitir a entrada dos insetos, e dificultar a sua saída.



**Figura 2** – Localização da armadilhagem (marca amarela) na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (38°45'22"N 9°09'30"W).

As armadilhas foram recolhidas ao fim de sete dias e retiraram-se os dípteros adultos presentes, para preservação em álcool a 70% para posterior identificação. O conteúdo de cada armadilha foi depois transferido para um recipiente plástico e selado com fita-cola. As larvas presentes nos iscos foram alimentadas com fígado de porco fresco (500g) durante dois dias. Ao fim deste período, as larvas atingiram o estadio de pré-pupa e, foram transferidas para recipientes plásticos com substrato, selados com tampa (previamente furadas para auxiliar a circulação de ar) e fita-cola. Passados oito dias as pupas apresentaram uma coloração mais escura, indicativa de maturação, e peneirou-se o substrato de forma a isolá-las (**Figura 3**).

Três dias após o isolamento das pupas observou-se a presença de dípteros adultos em ambas as caixas, que, juntamente com os exemplares recolhidos nas armadilhas foram identificadas com o auxílio do microscópio estereoscópico Nikon SMZ645, seguindo as chaves de identificação de Szpila (2015) e Szpila (sd).



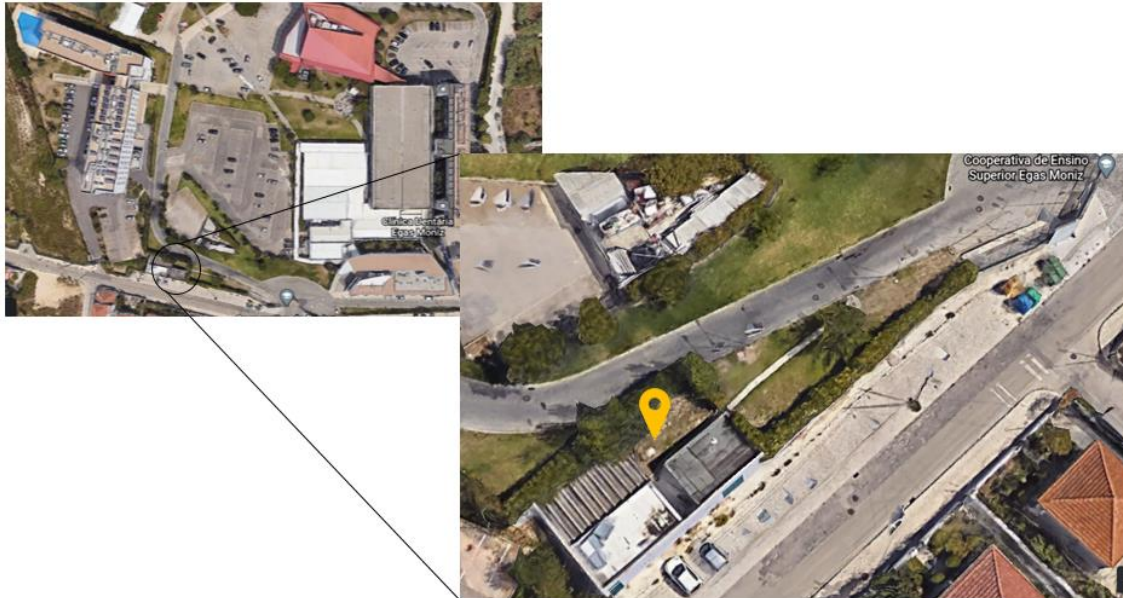
**Figura 3** – Coloração das diferentes pupas, sendo a mais escura indicadora de maior maturação.

Todos os espécimes foram documentados em fotografias (**ANEXO II**) quanto às suas características mais relevantes, com o auxílio do microscópio eletrónico Zeiss SteREO Lumar.V12. O tratamento de imagens foi efetuado com o software Fiji (Image J).

Não se realizaram mais capturas de colonizadores primários como estava previsto, no Inverno, Primavera e Verão, devido ao confinamento decretado na sequência da pandemia de Covid-19.

*Ensaio diurnos e noturnos no Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM)*

Numa zona de acesso restrito do campus do Instituto Universitário Egas Moniz (**Figura 4**), instalou-se, em julho de 2020, uma armadilha férrea, com condições para os dípteros adultos circularem livremente no isco, bem como para a colocação de uma estação meteorológica (Weather Station PCE-FWS 20) e uma câmara (Wingscapes® TimelapseCam Pro WCT-00126) (**Figura 5**) programada para fotografar de minuto a minuto.



**Figura 4** – Localização da armadilha férrea (marca amarela) no Instituto Universitário Egas Moniz (38°40'01"N 9°12'02"W).



**Figura 5** – Armadilha férrea equipada com (a) estação meteorológica Weather Station PCE-FWS 20, (b) câmara Wingscapes® TimelapseCam Pro WCT-00126 e (c) caixa de Petri com figado de porco.

### *Desenho Experimental*

Após os testes preliminares à tecnologia utilizada, foi realizado um total de seis ensaios, entre 13 de julho e 8 de setembro, duas delas em dias com temperaturas médias altas (29°C), outras duas em períodos com temperaturas baixas (22,5°C), e as últimas duas em dias com temperaturas moderadas (26°C). Mediu-se igualmente a humidade, a velocidade do vento, a precipitação e a pressão atmosférica. As armadilhas foram colocadas entre as 19h e as 20h e recolhidas no dia seguinte após a confirmação visual de oviposição, ou ao final desse dia, na ausência desta (**Anexo I**). Realizou-se, para cada ensaio, o cálculo de *sex-ratio* dos dípteros adultos eclodidos.

O primeiro ensaio ocorreu entre dia 13 e 14 julho de 2020. Os ovos foram transferidos para uma caixa de Petri contendo soro de cavalo e deixados à temperatura ambiente no laboratório ( $T \pm 25^\circ\text{C}$ ). Na sua eclosão, as larvas foram alimentadas com fígado de porco fresco. Os adultos foram capturados vinte dias depois e colocados num tubo Falcon de 1,5mL com algodão embebido em éter. Foram, com o auxílio do estereomicroscópio Leika EZ4 identificados até à espécie usando a chave dicotómica de Szpila (sd,a) e realizou-se de seguida a sexagem dos exemplares.

A segunda armadilha foi colocada no dia 16 de julho de 2020 e recolhida no dia seguinte. Tal como no ensaio anterior, os ovos foram transferidos para uma caixa de Petri e deixados à temperatura ambiente ( $T \pm 24^\circ\text{C}$ ) e as larvas alimentadas com fígado de porco fresco. Neste ensaio, as larvas foram divididas em duas frações: a primeira fração continuou a ser alimentada com fígado de porco até atingir o estado pré-pupa e inseridas num meio com serradura (substrato) até atingir o estado adulto. A segunda fração foi utilizada para identificação específica a partir do estado larvar. Estes exemplares foram transferidos para um tubo de Falcon 1,5mL com algodão embebido em clorofórmio. Seguidamente, realizou-se um corte do terceiro ao nono segmento torácico em cada larva, e submergiu-se numa solução de KOH 10% durante 24h. Foram lavadas com água destilada e removeram-se os tecidos interiores. Posteriormente, procedeu-se à separação das peças bucais e dos espiráculos posteriores, preparando-as para observação microscópica com glicerina líquida (87%). A identificação seguiu a chave de Szpila (2010) e Thyssen (2010). Os dípteros adultos eclodiram após dezassete dias e foram anestesiados com algodão embebido em éter e foram preservados em álcool 70% para identificação específica seguindo Szpila (sd,a) e sexagem.

O terceiro ensaio foi realizado no dia 27 de julho de 2020 e os exemplares recolhidos no dia seguinte, e por sua vez, os ovos foram transferidos para uma caixa de Petri e deixados à temperatura ambiente no laboratório ( $T \pm 23^{\circ}\text{C}$ ). O mesmo método foi aplicado para a quarta armadilha, colocada no 3 de agosto de 2020 e recolhida no dia seguinte.

O quinto ensaio foi realizado nos dias 11 e 12 de agosto de 2020. A armadilha foi colocada mais cedo (15h10min) para verificar se os dípteros fêmea chegariam ao isco grávidas e depositariam de imediato os seus ovos. Os ovos foram transferidos para uma caixa de Petri e deixados à temperatura ambiente no laboratório ( $T \pm 24^{\circ}\text{C}$ ).

A sexta e última armadilha, foi instalada no dia 18 de agosto de 2020 e recolhida no dia 21 de agosto de 2020. Este ensaio foi concebido para a captura de dípteros macho e fêmea adultos, com um recipiente de plástico, de forma a averiguar se os dípteros machos se deslocam ao cadáver para reprodução. No dia 21, observou-se uma grande quantidade de larvas em primeiro ou segundo estadio. Os dípteros adultos capturados foram transferidos para um recipiente com álcool 70% e posteriormente identificados. As larvas e o fígado foram transferidos para uma caixa com serradura. Efetuou-se a preparação microscópica de metade das larvas quando estas se encontravam no terceiro estadio com a solução de KOH 10% (24h), e realizou-se a sua identificação. Doze dias após a recolha da armadilha, deu-se a eclosão dos dípteros adultos, que foram anestesiados com algodão embebido em éter, imediatamente identificados quanto à espécie e sexo e preservados em álcool 70%.

Os espécimes recolhidos, foram fotografados quanto às suas características mais relevantes, que se encontram no **Anexo II**.

### *Análise Estatística*

Compararam-se através de testes t de Student (nível de significância de 0,05 com ajuste de Bonferroni para condições múltiplas) os valores médios da temperatura, humidade e ponto de orvalho para os períodos com e sem oviposição, durante todo o dia, ou exclusivamente para o período diurno. As diferenças significativas foram expressas na forma de subscritos diferentes (letras a e b) associados a cada par de médias.

Para avaliar o papel destes três fatores atmosféricos, juntamente com outros como a ocorrência de precipitação, intensidade do vento, pressão atmosférica, presença de formigas, presença de ovos e número de posturas observadas, na atividade dos dípteros, incluindo a oviposição, estes fatores foram incluídos em dois modelos logísticos tendo

como variáveis binárias dependentes a atividade geral e a oviposição, respetivamente. Os modelos logísticos permitiram a obtenção, para cada variável, da razão de chances (Odds Ratio; OR) como medida de associação à atividade ou oviposição. Como só ocorreu oviposição durante o período diurno, o modelo logístico para a oviposição foi apenas ajustado com dados obtidos durante o dia. Para evitar *overfitting*, procedeu-se no modelo, num processo por passos, à eliminação das variáveis independentes não significativas, de forma a representar em tabela apenas as variáveis (fatores) com papel relevante para a atividade geral dos dípteros, ou para a postura de ovos nos iscos. Os procedimentos estatísticos de comparação de médias foram realizados através do software SPSS® (versão 25; IBM Corp.), enquanto os modelos logísticos foram ajustados e otimizados em ambiente R (versão 4.02) através do software RStudio Desktop (versão 1.3.1073, B Corp.).

## Resultados e Discussão

Os estudos em entomologia forense são realizados maioritariamente com o recurso a carcaças de suínos. Isto deve-se ao facto da sua anatomofisiologia ser relativamente semelhante à de um ser humano e pela facilidade de obtenção, dado que em Portugal e muitos outros países, por razões éticas, não se disponibilizam corpos humanos para realizar estes estudos. Matuszewski *et al.* (2019), concluíram que o uso de análogos ao ser humano, como suínos, são mais fáceis de replicar e práticos para o controlo dos factores de estudo em entomologia forense. Neste trabalho, foi utilizado fígado de porco em vez do seu músculo, que segundo Farinha *et al.* (2014), são os dois tipos de isco com melhores resultados neste âmbito. Porém, o fígado em relação ao músculo de porco tem uma tendência acrescida de colonização de dípteros primários devido aos compostos orgânicos voláteis libertados durante a sua decomposição.

### *Identificação de espécimes coletados na Faculdade de Ciências de Lisboa*

O estudo na FCUL foi realizado inicialmente com a finalidade de identificar as espécies que poderiam surgir ao longo deste projeto, entre dezembro e maio. Contudo, devido à situação pandémica por Covid-19, apenas se realizou a amostragem de Outono e por isso teve pouca relevância, uma vez que os ensaios de oviposição diurna e noturna apenas puderam ser realizados no Verão, em julho de 2020, não correspondendo à mesma estação do ano.

As armadilhas coletaram no início de dezembro de 2019, dípteros adultos e imaturos pertencentes a diversas famílias taxonómicas. Nos adultos recolhidos, verificou-se a presença das espécies *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) pertencentes à família Calliphoridae, *Fannia leucosticta* (Meigen) e *Fannia canicularis* (Linnaeus) da família Fannidae, a família Anthomyiidae e seis espécimes não identificados por estarem parcialmente danificados (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Dípteros recolhidos das armadilhas colocadas na FCUL a 3 de dezembro de 2019.

<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Género</b>	<b>Espécie</b>	<b>Número de espécimes</b>
<b>Diptera</b>	Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	<i>C. vicina</i>	10
			<i>C. vomitoria</i>	4
		<i>Chrysomya</i>	<i>C. albiceps</i>	4
			<i>C. megacephala</i>	2
	Fanniidae	<i>Fannia</i>	<i>F. canicularis</i>	4
			<i>F. leucosticta</i>	2
Anthomyiidae			14	
Não identificado			6	
<b>T = 46</b>				

Os adultos eclodidos foram identificados como *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Lucilia sericata* (Meigen), pertencentes à família Calliphoridae e da ordem Hymenoptera (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Diversidade de insetos eclodidos das armadilhas a 26 de dezembro de 2019.

<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Género</b>	<b>Espécie</b>
<b>Diptera</b>	Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	<i>C. vicina</i>
		<i>Chrysomya</i>	<i>C. albiceps</i>
		<i>Lucilia</i>	<i>L. sericata</i>
<b>Hymenoptera</b>	Braconidae	<i>Alysia</i>	<i>Alysia manducator</i>

*Identificação das espécies coletadas nos ensaios diurnos e noturnos no Instituto Universitário Egas Moniz*

No IUEM, os ovos do primeiro ensaio foram nutridos com soro de cavalo resultando no desenvolvimento e posterior identificação da espécie *Lucilia sericata* (N=85). A nutrição com este soro impediu o desenvolvimento da totalidade dos ovos, uma vez que poderá ter ocorrido uma submersão excessiva pelo que nos restantes ensaios os ovos foram colocados numa caixa de Petri junto a um pedaço de fígado de porco fresco.

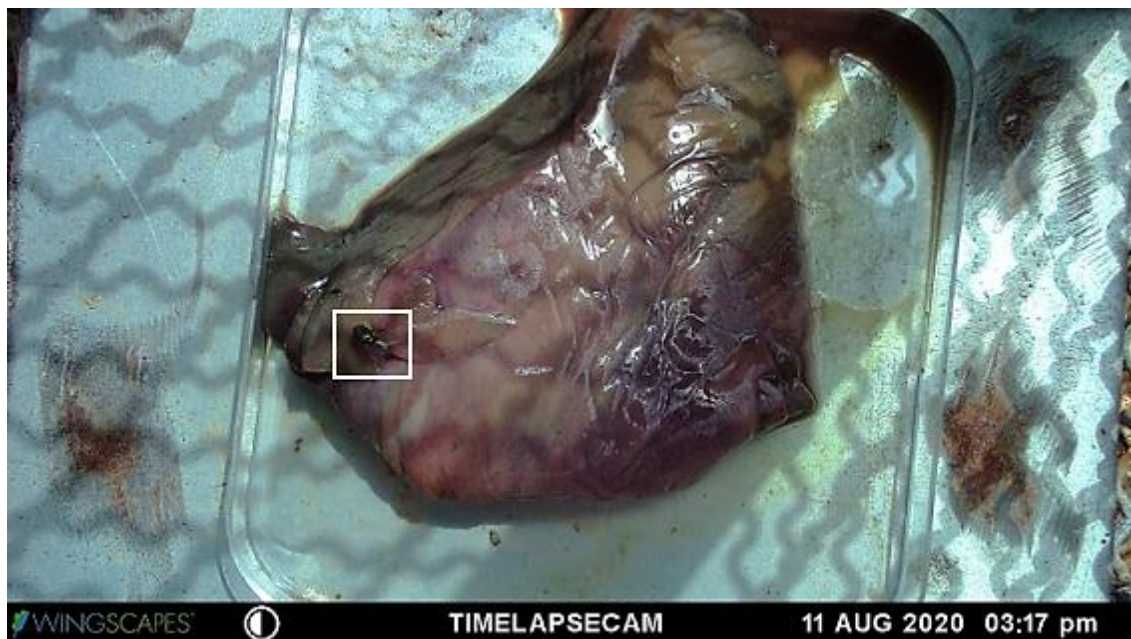
O segundo ensaio revelou atividade noturna (**Figura 6**), com oviposição, uma vez que não se observaram outros dípteros adultos até ao nascer-do-sol, mas não foi possível identificar a espécie do imaturo recolhido (**Anexo III**).



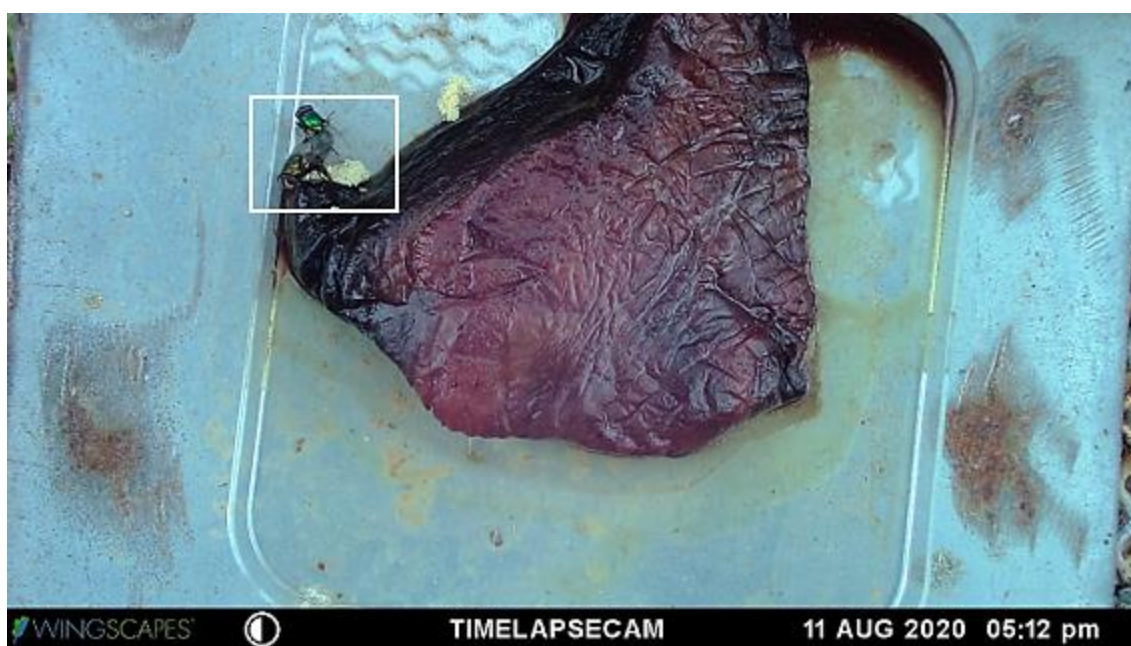
**Figura 6** – Amostra de atividade noturna observada entre as 22h de dia 16 de julho e as 7h do dia seguinte.

Foram também identificadas as espécies *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata* nas primeiras horas diurnas, porém, apenas *L. sericata* realizou oviposição, tendo-se identificado 169 larvas desta espécie, e 166 adultos (**Anexo III**).

Nos terceiro e quarto ensaios apenas se verificou a presença de ovos, mas não se registaram imagens de adultos. Observou-se a presença de formigas no isco na altura da recolha da armadilha, e a estação meteorológica registou um aumento da humidade nesses dias, tendo também os ovos estado diretamente expostos à luz solar. O quinto ensaio realizou-se com temperaturas mais baixas, com probabilidade acrescida de precipitação, e pareceu confirmar uma eventual escassez de atividade diurna e noturna neste tipo de condições atmosféricas, devido à reduzida atividade detetada. Uma vez que este ensaio teve início às 15h10min, verificou-se atividade quase imediata (**Figura 7**) e observou-se a oviposição duas horas após o início deste ensaio (**Figura 8**) onde estação meteorológica, registou uma temperatura de 23°C e humidade de 69%. Nas horas seguintes, a temperatura diminuiu enquanto a humidade aumentou até aos 90%.

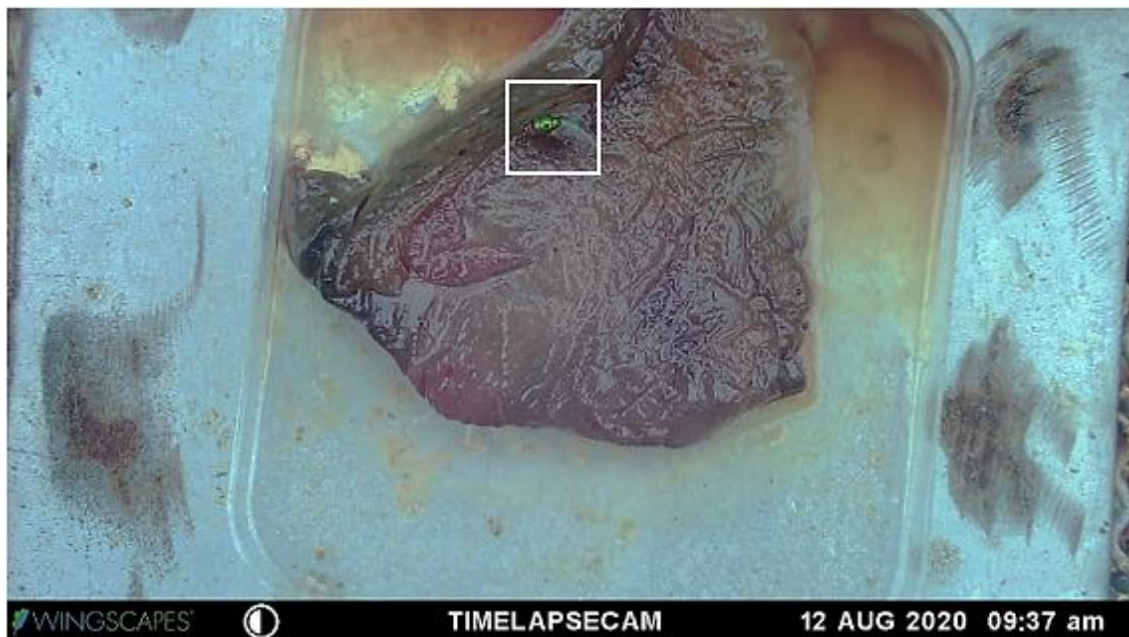


**Figura 7** – Quinta armadilha colocada às 15h10min, com início de atividade às 15h17min.



**Figura 8** – Oviposição realizada por mais do que um díptero fêmea duas horas após o início do quinto ensaio.

Contudo, com a precipitação, os ovos não se desenvolveram devido à sua submersão (**Figura 9**). Na presença deste fator atmosférico, houve um retardamento no início de atividade no isco, começando perto das 10h do dia 12 de agosto de 2020, e não nas primeiras horas de exposição solar.



**Figura 9** – Submersão dos ovos causada pela precipitação durante as primeiras horas da manhã.

O último ensaio foi realizado numa armadilha preparada para capturar ambos os sexos. Contudo, apenas foram encontradas fêmeas (**Tabela 3**). A armadilha foi recolhida já com larvas de primeiro e segundo estadio, para além da presença de himenópteros parasitas da espécie *Nasonia vitripennis* (Walker). Quando as larvas apresentaram o estadio de pré-pupa, foram identificadas como pertencentes à espécie *Lucilia sericata* e ao género *Sarcophaga* (**Anexo III**).

**Tabela 3** – Diversidade de insetos adultos fêmea capturados na armadilha do sexto ensaio.

Ordem	Família	Género	Espécie	N (fêmeas)	
Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	<i>C. vicina</i>	2	
			<i>Chrysomya</i>	<i>Ch. albiceps</i>	2
			<i>Lucilia</i>	<i>L.sericata</i>	80
		Sarcophagidae	<i>Sarcophaga sp.</i>	3	
		Muscidae		1	
			<i>Phaonia</i>	<i>P. subventa</i>	14
		Fanniidae	<i>Fannia sp.</i>	4	
			<i>Fannia</i>	<i>Fannia canicularis</i>	5
		Anthomyiidae		4	
	Hymenoptera	Pteromalidae	<i>Nasonia</i>	<i>Nasonia vitripennis</i>	7
				<b>T = 122</b>	

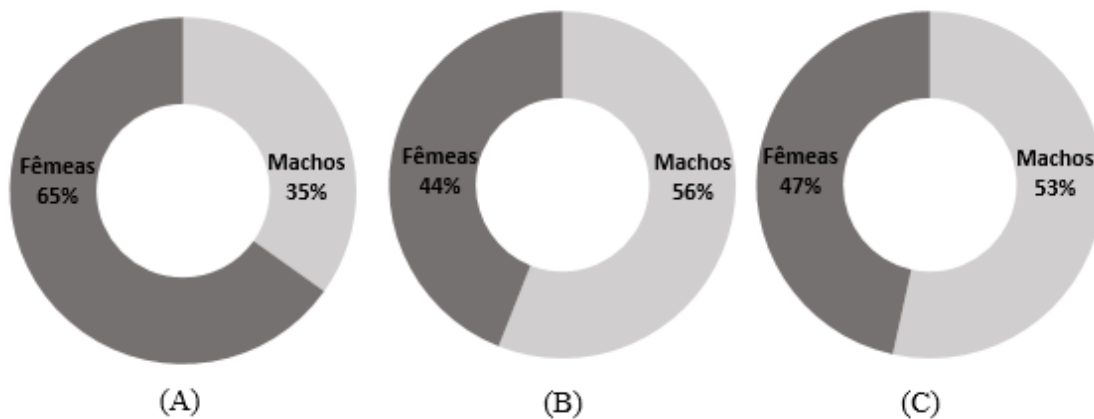
Com a eclosão das pupas dos dípteros, identificaram-se as espécies *Lucilia sericata*, *Calliphora vicina* e *Sarcophaga argyrostoma* (**Tabela 4**).

**Tabela 4** – Diversidade de dípteros adultos eclodidos.

Ordem	Família	Género	Espécie	N
Diptera	Calliphoridae	<i>Calliphora</i>	<i>C. vicina</i>	1
		<i>Lucilia</i>	<i>L. sericata</i>	404
	Sarcophagidae	<i>Sarcophaga</i>	<i>S. argyrostoma</i>	3
				<b>T = 408</b>

Devido à má vedação da caixa com as larvas, houve perda de uma parte de espécimes adultos quando estes eclodiram das pupas.

Em todas as amostragens com resultados positivos, foi realizado o cálculo de *sex-ratio* (**Figura 10**), dos adultos que eclodiram dos ovos depositados nos diversos iscos.



**Figura 10** – *Sex-ratio* do primeiro (A), segundo (B) e sexto (C) ensaios.

Como se observa na **Figura 10**, existe uma proporção maior de machos em relação à de fêmeas, com excepção do primeiro ensaio em que se verificou o oposto.

Os resultados obtidos, mostraram diferentes abundâncias de dípteros primários ao longo deste estudo, variando ligeiramente de acordo com a zona geográfica e estação do ano, como seria expectável. Verificou-se a maior abundância da espécie *Lucilia sericata* (Meigen), que é descrita como sendo abundante em praticamente todos os tipos de habitat, mas mais comumente encontrada em ambientes urbanos, visitando os cadáveres expostos à luz solar (Fischer, 2000) e um dos dípteros de interesse forense mais comuns na Europa. Apesar de preferir exposição solar, a deposição dos ovos é efetuada em partes do corpo com pouca incidência solar (Byrd & Castner, 2010), como se observou neste estudo realizado no Verão, em que apesar das temperaturas relativamente elevadas, a oviposição foi realizada em zonas de sombra do isco, resultando na espécie mais abundante.

Quanto ao género *Calliphora*, *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) e *Calliphora vomitoria* (Linnaeus) são as espécies mais comuns na Península Ibérica, sendo que a primeira é frequentemente encontrada tanto em ambientes interiores como ambientes exteriores nos meses mais frios em locais com sombra e urbanos, colonizando abundantemente cadáveres, enquanto a segunda se encontra durante a Primavera e Outono, de uma forma menos frequente. No estudo preliminar na FCUL, realizado no Outono, verificou-se a presença de dez espécimes de *C. vicina* e quatro de *C. vomitoria*, enquanto no sexto ensaio realizado no IUEM, no Verão, somente dois espécimes de *C. vicina* foram recolhidos, corroborando a presença destas espécies em ambientes mais frescos.

*Chrysomya albiceps* (Wiedemann) é uma espécie presente na Europa podendo ser encontrada entre maio e dezembro. Esta espécie foi capturada tanto no Outono como no Verão. No IUEM, esta espécie foi observada em menor quantidade devido à precipitação ocorrida no último ensaio. Recentemente, outra espécie deste género foi introduzida na Península Ibérica, *Chrysomya megacephala* (Fabricius), possivelmente proveniente das ilhas Canárias, restrita a Espanha, Portugal e Malta (Velásquez *et al.*, 2010). Os machos e fêmeas desta espécie são atraídos por frutas, urina, material fecal e restos mortais. A sua atividade ocorre durante a tarde, durante as primeiras horas da manhã e no pôr-do-sol (Byrd & Castner, 2010). Contudo, foi capturada somente no Outono, indicando a sua sobrevivência a temperaturas mais baixas.

O género *Sarcophaga* (Meigen) pode ser encontrado durante todo o ano em Portugal especialmente no Verão, normalmente associada à matéria orgânica de origem animal como se verificou no sexto ensaio realizado no IUEM, em que surgiu a espécie *Sarcophaga argyrostoma* (Robineau-Desvoidy).

As famílias Muscidae e Fanniidae são igualmente importantes na determinação do IPM. Apesar de alguns espécimes encontrados estarem degradados, identificou-se a espécie *Phaonia subventa* (Harris). Esta espécie é comum em zonas rurais durante as estações mais quentes apesar de ter sido observada a uma temperatura mais baixa no sexto ensaio no IUEM. Da família Fanniidae, identificaram-se as espécies *Fannia canicularis* (Linnaeus) e *Fannia leucosticta* (Meigen). Os restantes dípteros do género *Fannia* não foram possíveis de identificar devido à falta de integridade das estruturas anatómicas necessária para a sua identificação específica. As duas espécies do género *Fannia* encontradas são normalmente observadas em alturas do ano em que as temperaturas são

mais baixas, como se verificou nesta no teste preliminar realizado na FCUL e no sexto ensaio no IUEM, em que as temperaturas foram mais baixas.

Em todas as espécies de vespas, abelhas e formigas, os machos são originários de ovos não fertilizados (haplóides) enquanto as fêmeas desenvolvem-se a partir de ovos fertilizados (diplóides) (Rivers & Dahlem, 2014a). Dos parasitóides encontrados, as fêmeas de *Nasonia vitripennis* (Walker) efetuam a oviposição nas pupas dos dípteros presentes no cadáver. Esta microvespa perfura o pupário do hospedeiro com o ovipositor, e deposita os seus ovos na superfície da pupa. Os ovos eclodem e as suas larvas alimentam-se do díptero no estadio de pupa, matando-o (Grassberger & Frank, 2003). Contudo, a presença desta espécie não influenciou a eclosão dos dípteros primários dado que os espécimes adultos foram recolhidos na totalidade antes de as larvas atingirem o estadio de pré-pupa. Por outro lado, a espécie *Alysia manducator* Panz (Hymenoptera: Braconidae) caminha pelo corpo em decomposição, perfurando as larvas que ali se encontram (Reznik *et al.*, 2016). Verificou-se a eclosão desta espécie juntamente com os restantes dípteros no ensaio realizado na FCUL.

Apesar de se ter recolhido espécimes imaturos no segundo ensaio, a sua identificação específica apenas teria sido possível com análise molecular, nomeadamente do gene mitocondrial que expressa a enzima citocromo oxidase I (COI) (Tuccia *et al.*, 2016). O mesmo método deveria ser aplicado para os restantes micro dípteros encontrados neste estudo, uma vez que poderão ter um interesse forense acrescido.

A altura em que ocorre a oviposição é um fator importante para o cálculo correto do intervalo *post mortem* mínimo (IPMmin), dependendo da temperatura e da exposição solar. Estudos realizados com luz solar e luz artificial, mostraram não haver resultados significativos na densidade de ovos depositados nestas duas situações (Berg & Benbow, 2013). Embora o estudo realizado no norte da Índia por Singh & Bharti (2001) tenha mostrado atividade noturna dos primeiros dípteros e a realização de oviposição noturna, muitos estudos em diversos pontos geográficos mostraram a escassez de oviposição durante o período noturno, nomeadamente, no Reino Unido (Barnes *et al.*, 2015) e no Brasil (Soares & Vasconcelos, 2016).

No segundo ensaio, observou-se actividade noturna com oviposição em que temperatura média noturna foi de 26°C. A presença de luz da via pública junto ao isco pode ter influenciado a presença das moscas durante o período noturno, uma vez que os dípteros têm a capacidade de ajustar os seus comportamentos de acordo com a exposição à luz a partir das células fotoreceptoras localizadas nos olhos. Apesar de Mazzotta *et al.*

(2020) referirem ainda a importância da fase da lua, estes autores mencionam atividade destes dípteros em lua cheia, o que não se verificou neste ensaio, uma vez que nesta noite a lua encontrava-se em quarto crescente.

Verificou-se durante este estudo, que existiu atividade dos insectos quando as temperaturas eram favoráveis, mas não quando se registou uma elevada precipitação (**Tabela 5**), iniciando esta atividade a partir do nascer-do-sol até ao pôr-do-sol (**Tabela 6**).

**Tabela 5** – Valores médios das temperaturas diurnas e noturnas, da velocidade do vento, da humidade e das pressões atmosféricas dos seis ensaios.

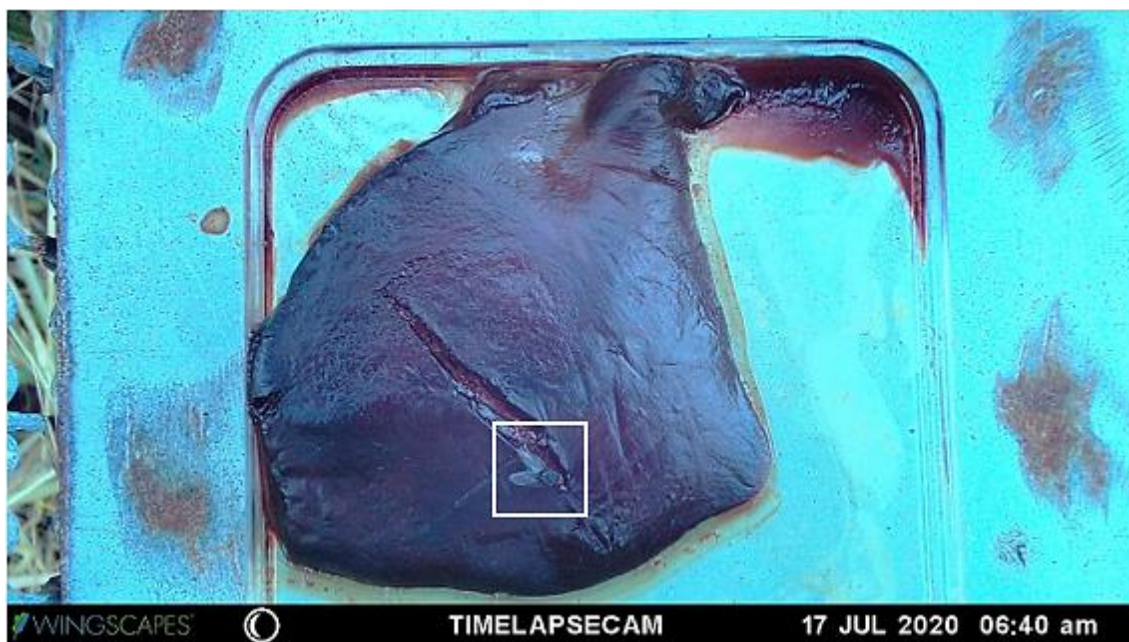
Ensaio	Temperatura diurna (°C)	Temperatura noturna (°C)	Velocidade do vento (km/h)	Humidade (%)	Pressão atmosférica relativa (hpa)	Pressão atmosférica absoluta (hpa)
1	23,6	25,1	0	57,5	1012,4	1003,1
2	29	26	-	27	-	-
3	24	21	1,1	88	1015,2	1006,3
4	29,5	20	-	83	-	-
5	18,8	19,3	0	90	1014,4	1001,6
6	22,5	20,3	1,1	90	1008	999,7

Na **Tabela 5**, observa-se a ausência de dados relativos à velocidade do vento e às pressões atmosféricas, nos ensaios dois e quatro uma vez que a estação meteorológica não os registou. Contudo, dado que a armadilha férrea se encontrava num local abrigado, a velocidade do vento não parece ter tido relevância neste estudo.

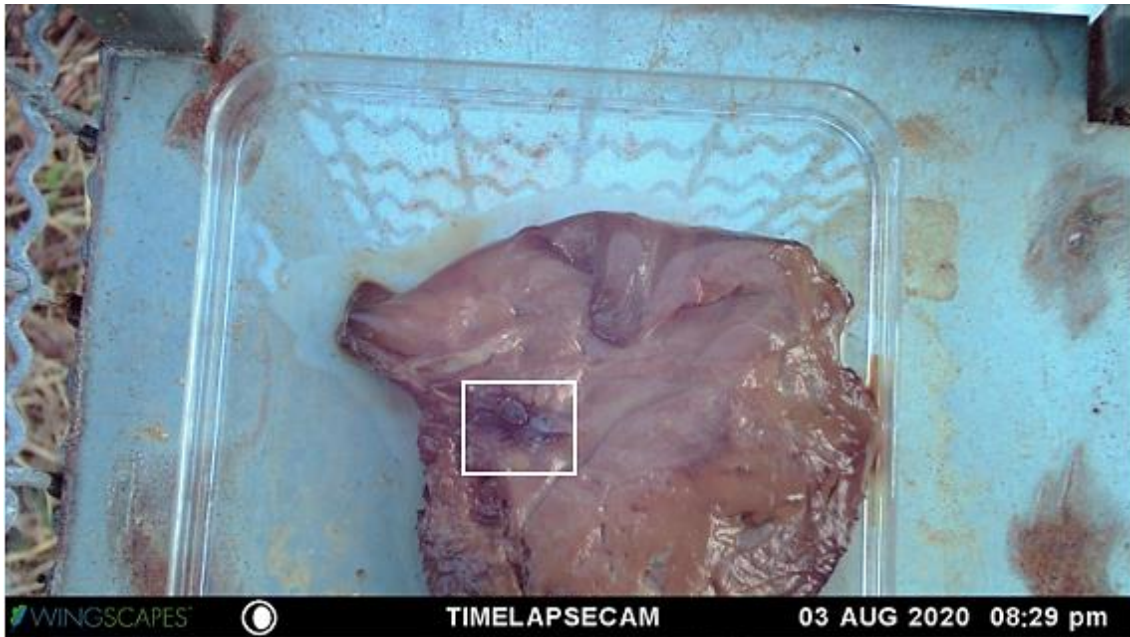
**Tabela 6** – Horário do nascer e pôr-do-sol nos diferentes ensaios.

<b>Ensaio</b>	<b>Datas</b>	<b>Nascer-do-sol</b>	<b>Pôr-do-sol</b>
<b>1</b>	13/07/2020	06h23min	20h58min
	14/07/2020	06h24min	20h58min
<b>2</b>	16/07/2020	06h25min	20h57min
	17/07/2020	06h26min	20h56min
<b>3</b>	27/07/2020	06h34min	20h49min
	28/07/2020	06h35min	20h48min
<b>4</b>	03/08/2020	06h40min	20h42min
	04/08/2020	06h41min	20h41min
<b>5</b>	11/08/2020	06h47min	20h35min
	12/08/2020	06h48min	20h31min
<b>6</b>	18/08/2020	06h53min	20h24min
	19/08/2020	06h54min	20h22min
	20/08/2020	06h55min	20h21min
	21/08/2020	06h56min	20h19min

Como se pode verificar nas **Figura 11** e **Figura 12**, a atividade recomeçou nas primeiras horas diurnas e cessou nos primeiros momentos noturnos pelos primeiros dípteros colonizadores de cadáveres.



**Figura 11** – Registo de atividade a partir das 06h40min da manhã de 17 de julho de 2020, com nascer-do-sol registado às 06h26min.



**Figura 12** – Registo da última actividade no dia 3 de agosto de 2020 às 20h29min, com pôr-do-sol registado às 20h42min.

Apesar de nas figuras 11 e 12 se observar a presença do género *Calliphora*, nos outros ensaios foram igualmente observados os géneros *Lucilia* e *Sarcophaga*.

As variáveis que resultaram significativas da análise logística relativamente à atividade dos insetos no isco e a realização de oviposição foram dependentes do ponto de condensação da água, precipitação e total de moscas que efetuaram oviposição (**Tabela 7**).

Esta análise foi realizada para os primeiros cinco ensaios, uma vez que o último teve como finalidade a determinação do *sex-ratio* dos dípteros primários e no segundo descartou-se a presença dos microdípteros, por não serem dípteros colonizadores primários de cadáveres. Devido ao facto de estes terem sido descartados, os resultados surgem todos negativos para atividade noturna, e conseqüentemente efetuou-se somente a análise para o período diurno. Teve-se igualmente em consideração o total de dípteros que realizaram oviposição, sendo assim, uma medida cumulativa indireta.

O teste t de Student é um teste de hipóteses usado para rejeitar ou não uma hipótese nula ( $H_0$ ). Esta, normalmente corresponde à ausência de diferença nas características ou nos resultados de interesse. Qualquer hipótese diferenciada de uma hipótese nula designa-se de hipótese alternativa ( $H_1$ ). Se a hipótese nula for efetivamente verdadeira vai servir como medida de obtenção do valor de  $p$  (*p-value*), ou seja, significância estatística. Este valor é considerado como sendo estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ , isto é, a hipótese nula é rejeitada a 5% quando o *p-value* é inferior a 5%. A correção de Bonferroni

ajusta o intervalo de confiança para 95%, evitando que o teste t obter uma diferença significativa quando não existe, ou seja, um falso positivo, para uma análise simultânea de variáveis (Martins, 2016).

A razão de chances (*odds ratio*; OR) é a probabilidade da ocorrência de um evento em relação à probabilidade de esse evento não ocorrer. A OR é interpretada por: OR<1 (pouco provável de ocorra o evento), OR=1 (não existe associação) e OR>1 (há associação, sendo mais forte quanto maior for o número) (Szumilas, 2010).

**Tabela 7** – Resultados da análise logística para a realização de atividade (dados diurnos).

<b>Coeficientes</b>	<b>Razão de Chances (Odds Ratio)</b>	<b>Significância (p)</b>
Ponto de condensação da água	1,68	0,00
Precipitação	0,00	0,00
Presença de ovos no isco	1,90	0,01

A partir da **Tabela 7**, verifica-se uma associação entre o ponto de condensação e a realização de atividade em que a probabilidade de esta ocorrer é igual a 68%. A atividade é improvável que ocorra na presença de precipitação, influenciando em 90% a presença de ovos no isco.

Quanto à oviposição, estimou-se a significância quanto à humidade, ponto de condensação da água e total de moscas que a realizaram (**Tabela 8**).

**Tabela 8**– Estimativa da oviposição efetuada durante o dia em relação à humidade, ponto de condensação da água e total de moscas que a realizaram.

<b>Coeficientes</b>	<b>Razão de Chances (Odds Ratio)</b>	<b>Significância (p)</b>
Humidade	0,95	0,00
Ponto de condensação da água	1,42	0,01
Presença de ovos no isco	1,43	0,01

Verifica-se a partir dos dados da **Tabela 8** que há uma redução de oviposição na ordem dos 5% em relação ao aumento da humidade. Contudo, há um incremento na probabilidade de oviposição de 42% quando o ponto de condensação sobe uma unidade, e a realização de oviposição aumenta em 43% quando já houve oviposição previamente no isco.

As **Tabela 9** e **10** apresentam os valores médios da atividade e oviposição na ausência e presença de luz, respetivamente.

**Tabela 9** – Valores médios de temperatura, humidade e ponto de condensação da água durante a atividade (a) e oviposição (b) na ausência de luz.

(a)	Sem Atividade			Atividade		
	Válido N	Média	Desvio Padrão	Válido N	Média	Desvio Padrão
<b>Temperatura</b>	96	21,9	4	2	26,5	7,8
<b>Humidade</b>	96	72	25	2	52	44
<b>Ponto de condensação</b>	96	15,2	3,7	2	12,5	7,8

(b)	Sem Oviposição			Oviposição		
	Válido N	Média	Desvio Padrão	Válido N	Média	Desvio Padrão
<b>Temperatura</b>	98	22,1	4,1	0	-	-
<b>Humidade</b>	98	71	25	0	-	-
<b>Ponto de condensação</b>	98	15,2	3,7	0	-	-

Os dados da **Tabela 9** mostram que não se verifica atividade nem oviposição com humidade a 72% e 71% para uma probabilidade inferior a 0,05.

**Tabela 10** – Valores médios de temperatura, humidade e ponto de condensação da água durante a atividade (a) e oviposição (b) na presença de luz.

(a)	Sem Atividade			Atividade		
	Válido N	Média	Desvio Padrão	Válido N	Média	Desvio Padrão
<b>Temperatura</b>	23	25	6,3	79	26,2	5,3
<b>Humidade</b>	23	63	29	79	58	22
<b>Ponto de condensação</b>	23	15,2	3,2	79	15,8	3,1

(b)	Sem Oviposição			Oviposição		
	Válido N	Média	Desvio Padrão	Válido N	Média	Desvio Padrão
<b>Temperatura</b>	72	27,8	5,4	30	28,7	4,9
<b>Humidade</b>	72	64	24	30	47	19
<b>Ponto de condensação</b>	72	15,9	3,1	30	14,9	3,2

Os dados da **Tabela 10** mostram que se verifica atividade de insetos quando a percentagem de humidade se encontra mais baixa, bem como uma probabilidade de realização de oviposição elevada quando a temperatura média é aproximadamente 29°C, humidade a 47% e condensação da água a 14,9°C.

Como existem poucos dados quanto à presença de formigas e chuva/precipitação, decidiu-se a não inclusão destas variáveis nos modelos.

A partir das imagens registadas pela câmara Wingscapes® TimelapseCam Pro WCT-00126 foi possível observar a que horas o primeiro díptero fêmea realizou oviposição no isco dos cinco ensaios. Calculou a média de horas (**Tabela 11**) desde o nascer-do-sol até à primeira oviposição para os primeiros quatro ensaios, com exceção do quinto ensaio onde a oviposição foi efetuada antes do pôr-do-sol.

**Tabela 11** – Média de tempo de realização de oviposição nos cinco ensaios durante o período diurno.

<b>Ensaio</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Tempo (horas)</b>
<b>1</b>	150	2,3
<b>2</b>	540	9
<b>3</b>	390	6,3
<b>4</b>	300	5
<b>5</b>	120	2
		<b>T = 5h</b>

Constatou-se que, de acordo com o intervalo de tempo entre o início de atividade e a oviposição, os dípteros fêmea demoraram em média cinco horas até efetuarem a oviposição. Complementando os valores médios da **Tabela 11** com os dados da **Tabela 5**, verifica-se uma duração de tempo maior para a realização de oviposição quando as temperaturas são mais elevadas e percentagem de humidade mais baixa, como no segundo ensaio, ou humidade mais elevada, como nos terceiro e quarto ensaios.

A armadilha foi colocada numa zona abrigada, onde, segundo o aparelho meteorológico Weather Station PCE-FWS 20, não houve variações assinaláveis quanto ao vento, levando à exclusão deste parâmetro nos modelos preditivos.

Outro fator importante para a obtenção destes resultados foi o facto de este estudo ter sido realizado somente no verão, entre os meses de julho e setembro de 2020, em vez do que estava inicialmente previsto, entre os meses de março e maio do mesmo ano,

devido à pandemia por COVID-19. Se o presente estudo tivesse sido realizado no Inverno, na Primavera e no Verão, provavelmente ter-se-ia encontrado resultados para diferenças maiores de temperatura e outras condições atmosféricas, que conduziria a maior variação de insetos com interesse forense. Igualmente, ter-se-ia obtido dados mais robustos para os modelos preditivos perante os diferentes parâmetros atmosféricos. Por isso, mais estudos semelhantes ao realizado deverão ser executados nas diferentes estações do ano.



## Conclusão

Este estudo teve como finalidade analisar os diferentes fatores que condicionam o período de pré-colonização e oviposição por parte de dípteros primários na colonização de cadáveres, durante o dia e a noite.

Verificou-se no período diurno a presença maioritária da família Calliphoridae, nomeadamente as espécies *Lucilia sericata* (Meigen), *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius). A espécie *Sarcophaga argyrostoma* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Sarcophagidae) e as espécies *Fannia canicularis* (Linnaeus) e *Fannia leucosticta* (Meigen) (Diptera: Fanniidae) foram identificadas, bem como a espécie *Phaonia subventa* (Harris) da família Muscidae, e ainda microdípteros da família Anthomyiidae.

Observou-se atividade noturna, contudo apenas se efetuou uma análise estatística para dípteros de interesse forense primários, descartando a família de microdípteros para os modelos preditivos. Assim, mais estudos englobando as espécies desta ordem devem ser realizados.

Em cada armadilha confirmou-se que o início de atividade no isco começava no nascer e permanecia até ao pôr-do-sol, e a oviposição foi realizada, em média, cinco horas após o início da actividade, possivelmente devido à incidência solar na armadilha que não era uniforme na totalidade do isco. A humidade e precipitação foram outros fatores importantes neste estudo, uma vez que se observou a diminuição de actividade nas alturas de maior precipitação, retomando com a sua cessação. A precipitação é igualmente importante no desenvolvimento dos ovos, pois a sua submersão impediu-os de eclodir.

O presente estudo foi realizado somente no verão devido à situação pandémica por COVID-19, sendo assim necessários mais estudos futuros para as diferentes estações do ano.

Conclui-se assim, que de acordo com os resultados obtidos neste estudo os dípteros primários não apresentaram atividade noturna, um fator relevante e a ter de ser considerado nos cálculos do intervalo *post mortem* (IPM).



## Referências Bibliográficas

- Amendt, J., Krettek, R. & Zehner, R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 91(2), 51–65.
- Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., & Hall, M. J. R. (2011). Forensic entomology: Applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7(4), 379–392.
- Anderson, G. S. (2010). Factors That Influence Insect Succession on Carrion. In J. H. Byrd & J. L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, 2nd ed., pp. 201–250. CRC Press, Boca Raton.
- Barnes, K. M., Grace, K. A. & Bulling, M. T. (2015). Nocturnal Oviposition Behavior of Forensically Important Diptera in Central England. *Journal of Forensic Sciences*, 60(6), 1601–1604.
- Berg, M. C. & Benbow, M. E. (2013). Environmental factors associated with *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) oviposition. *Journal of Medical Entomology*, 50(2), 451–457.
- Bernhardt, V., Bálint, M., Verhoff, M. A. & Amendt, J. (2018). Species diversity and tissue specific dispersal of necrophagous Diptera on human bodies. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 14(1), 76–84.
- Bonacci, T., Storino, P., Scalercio, S. & Brandmayr, P. (2016). Darkness as factor influencing the oviposition delay in *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 44, 98–102.
- Brundage, A. & Byrd, J. H. (2016). Forensic Entomology in Animal Cruelty Cases. *Veterinary Pathology*, 53(5), 898–909.
- Byrd, J. H. & Castner, J. L. (2010). Insects of Forensic Importance. In J. H. Byrd & J. L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, 2nd ed., pp. 39–126. CRC Press, Boca Raton.



- Chaudhury, M. F., Zhu, J. J. & Skoda, S. R. (2015). Response of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) to Screwworm Oviposition Attractant. *Journal of Medical Entomology*, 52(4), 527–531.
- Chrabidze, D., Depeme, A., Devigne, C. & Hedouin, V. (2015). Do necrophagous blowflies (Diptera: Calliphoridae) lay their eggs in wounds? Experimental data and implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, 253, 71–75.
- Christensen, A. M., Passalacqua, N. V. & Bartelink, E. J. (2019). Forensic taphonomy. In A. M. Christensen, N. V. Passalacqua, & E. J. Bartelink (Eds.), *Forensic Anthropology: Current Methods and Practice*, 2nd ed., pp. 145–181. Academic Press, London.
- Farinha, A., Dourado, C. G., Centeio, N., Oliveira, A. R., Dias, D. & Rebelo, M. T. (2014). Small Bait Traps as Accurate Predictors of Dipteran Early Colonizers in Forensic Studies. *Journal of Insect Science*, 14(77), 1–16.
- Fischer, O. A. (2000). Blowflies of the genera *Calliphora*, *Lucilia* and *Protophormia* (Diptera, Calliphoridae) in South-Moravian urban and rural areas with respect to *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876. *Acta Veterinaria Brno*, 69(3), 225–231.
- Goff, M. (2010). Early postmortem changes and stages of decomposition. In J. Amendt, C. P. Campobasso, M. L. Goff, & M. Grassberger (Eds.), *Current Concepts in Forensic Entomology*, pp. 1–24. Springer, London.
- Grassberger, M. & Frank, C. (2003). Temperature-related development of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* as forensic indicator. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), 257–262.
- Greenberg, B. (1990). Nocturnal oviposition behavior of blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 27(5), 807–810.



- Hans, K. R., Lebouthillier, R. & VanLaerhoven, S. L. (2018). Effect of Temperature on Oviposition Behavior and Egg Load of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 56(2), 441–447.
- Harnden, L. M. & Tomberlin, J. K. (2016). Effects of temperature and diet on black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), development. *Forensic Science International*, 266, 109–116.
- LeBlanc, H. N. & Logan, J. G. (2010). Exploiting Insect Olfaction in Forensic Entomology. In J. Amendt, C. P. Campobasso, M. Goff, & M. Grassberger (Eds.), *Current Concepts in Forensic Entomology*, pp. 205–221. Springer, London.
- Lima, T. & Von Zuben, C. J. (2016). *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) Oviposition Behavior in Previous Oviposition Situation. *Neotropical Entomology*, 45(5), 612–617.
- Lutz, L. Verhoff, M. A., & Amendt, J. (2018). Environmental factors influencing flight activity of forensically important female blow flies in Central Europe. *International Journal of Legal Medicine*, 133(4), 1267–1278.
- Martins, A. Q. (2016). *Estatística Aplicada com o S.P.S.S.* ResearchGate.
- Martín-Vega, D., Baz, A., Cifrián, B., Gómez-Gómez, A. & Díaz-Aranda, L. M. (2019). Long-term insect successional patterns on pig carcasses in central Spain. *International Journal of Legal Medicine*, 133(5), 1581–1592.
- Matuszewski, S. (2011). Estimating the pre-appearance interval from temperature in *Necrodes littoralis* L. (Coleoptera: Silphidae). *Forensic Science International*, 212, 180–188.
- Matuszewski, S. & Madra, A. (2015). Factors affecting quality of temperature models for the pre-appearance interval of forensically useful insects. *Forensic Entomology, An Introduction*, 247, 28–35.
- Matuszewski, S., Hall, M. J. R., Moreau, G., Schoenly, K. G., Tarone, A. M. & Villet, M. H. (2019). Pigs vs people: the use of pigs as analogues for humans in forensic entomology and taphonomy research. *International Journal of Legal Medicine*, 134(2), 793–810.



- Mazzotta, G. M., Damulewicz, M. & Cusumano, P. (2020). Better Sleep at Night: How Light Influences Sleep in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, 11(September), 1–20.
- Michalski, M. & Nadolski, J. (2018). Thermal conditions in selected urban and semi-natural habitats, important for the forensic entomology. *Forensic Science International*, 287, 153–162.
- Pimsler, M. L., Pape, T., Johnston, J. S., Robert, A., Parrott, J. J., Restuccia, D. & Tarone, A. M. (2014). Structural and Genetic Investigation of the Egg and First-Instar Larva of an Egg-Laying Population of *Blaesoxipha plinthopyga* (Diptera: Sarcophagidae), a Species of Forensic Importance. *Journal of Medical Entomology*, 51(6), 1283–1295.
- Prado e Castro, C., Serrano, A., da Silva, P. M. & García, M. D. (2012). Carrion flies of forensic interest: a study of seasonal community composition and succession in Lisbon, Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(4), 417–431.
- Rebelo, M. T., Meireles, J., Moreira, A. & Pereira, I. (2014). Entomologia Forense Médico-Veterinária Veterinary Medical Forensic Entomology, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 109, 62–69.
- Reznik, S. Y., Chernoguz, D. G. & Zinovjeva, K. B. (2016). Oviposition Preferences and Optimal Synchronization in *Alysia manducator* (Hymenoptera: Braconidae), a Parasitoid of the Blowfly, *Calliphora vicina*. *Wiley*, 65(1), 81–88.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014). Postmortem Decomposition of Human Remains and Vertebrate Carrion. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology*, pp. 176–187. Wiley Blackwell, New York.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014a). Biology, Taxonomy, and Natural History of Forensically Important Insects. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology*, pp. 69–89. Wiley Blackwell, New York.



- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014b). Introduction to Entomology. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology*, pp. 55–56. Wiley Blackwell, New York.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014c). Chemical Attraction and Communication. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology*, pp. 120–124. Wiley Blackwell, New York.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014d). Reproductive Strategies of Necrophagous flies. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology* pp. 95–98. USA: Wiley Blackwell, New York.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014e). Biology of the Maggot Mass. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology*, pp. 131–133. Wiley Blackwell, New York.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014f). Temperature Tolerances of Necrophagous Flies. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology*, pp. 152–161. Wiley Blackwell, New York.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014g). Postmortem Interval. In D. B. Rivers & G. A. Dahlem (Eds.), *The Science of Forensic Entomology*, pp. 215–229. Wiley Blackwell, New York.
- Singh, D. & Bharti, M. (2001). Further observations on the nocturnal oviposition behaviour of blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120(1–2), 124–126.
- Soares, T. F. & Vasconcelos, S. D. (2016). Diurnal and Nocturnal Flight Activity of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) in a Rainforest Fragment in Brazil: Implications for the Colonization of Homicide Victims. *Journal of Forensic Sciences*, 61(6), 1571–1577.



- Szpila, K. (2010). Key for the identification of third instars of european blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. In J. Amendt, C. P. Campobasso, M. L. Goff, & M. Grassberger (Eds.), *Current Concepts in Forensic Entomology*, pp. 43-56. Springer, London.
- Szpila, K. (2015). *Key for identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera, Calliphoridae) of forensic importance - Adult flies*. Department of Animal Ecology, Nicolaus Copernicus University: Institute of Ecology and Environmental Protection.
- Szpila, K. (sd). *Key to families of the European Diptera of forensic importance*. Department of Animal Ecology, Nicolaus Copernicus University: Institute of Ecology and Environmental Protection.
- Szumilas, M. (2010). Explaining Odds Ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 19(3), 227–229.
- Thyssen, P. J. (2010). Keys for Identification of Immature Insects. In J. Amendt, C. P. Campobasso, M. L. Goff, & M. Grassberger (Eds.), *Current Concepts in Forensic Entomology*, pp. 25–42. Springer, London.
- Tomberlin, J. K., Mohr, R., Benbow, M. E., Tarone, A. M. & Vanlaerhoven, S. (2011). A Roadmap for Bridging Basic and Applied Research in Forensic Entomology. *Annual Review of Entomology*, 56, 401–421.
- Tuccia, F., Giordani, G. & Vanin, S. (2016). A combined protocol for identification of maggots of forensic interest. *Science and Justice*, 56(4), 264–268.
- Vanin, S., Gherardi, M., Bugelli, V. & Paolo, M. Di. (2011). Insects found on a human cadaver in central Italy including the blowfly *Calliphora loewi* (Diptera, Calliphoridae), a new species of forensic interest. *Forensic Science International*, 207(1–3).
- Vass, A. (2001). Beyond the grave: understanding human decomposition. *Microbiology Today*, 28(28), 190–192.



- Velásquez, Y., Magaña, C., Martínez-Sánchez, A. & Rojo, S. (2010). Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(3), 293–308.
- Wall, R., Wearmouth, V. J. & Smith, K. E. (2002). Reproductive allocation by the blow fly *Lucilia sericata* in response to protein limitation. *Physiological Entomology*, 27(4), 267–274.
- Wells, J. D. (2019). A Forensic Entomological Analysis Can Yield an Estimate of Postmortem Interval, and Not Just a Minimum Postmortem Interval: An Explanation and Illustration Using a Case. *Journal of Forensic Sciences*, 64(2), 634–637.
- Wells, J. D. & LaMotte, L. R. (2010). Estimating the Postmortem Interval. In J. H. Byrd & J. L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, 2nd ed., pp. 367–388. CRC Press, Boca Raton.
- Zulaikha, A. B. S. & Zuha, R. M. (2016). Nocturnal oviposition of the forensic scuttle fly, *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera: Phoridae) indoors. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(4), 489–491.

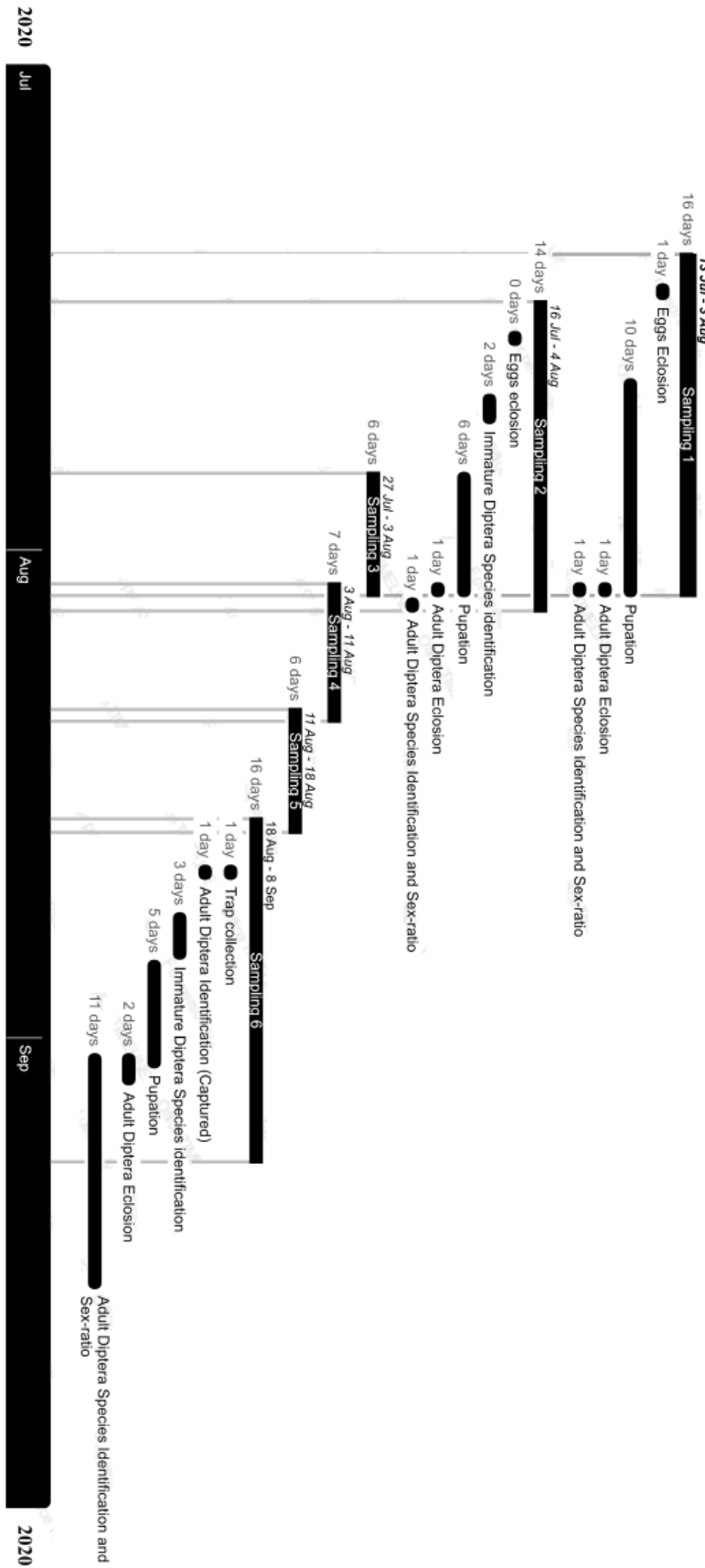
## **ANEXOS**

**Anexo I** – Cronograma dos ensaios diurnos e noturnos no IUEM

**Anexo II** – Insetos adultos recolhidos das armadilhas

**Anexo III** – Estruturas de dípteros imaturos

Anexo I: Cronograma dos ensaios diurnos e noturnos no IUEM



**Anexo II : Insetos adultos recolhidos das armadilhas**



Imagem A: A - *Calliphora vicina*. B – asa pormenorizada- basicosta laranja; C – crista facial, bordo bucal e parte anterior da dilatação genal laranja; D – calípteras superior e inferior escuras e espiráculo torácico anterior laranja.



Imagem B: A – *Calliphora vomitoria*; B – asa pormenorizada – basicosta escura ; C – calípteras superior e inferior escuras; D - crista facial, bordo bucal e parte anterior da dilatação genal escura com cerdas laranja; espiráculo torácico anterior escuro.

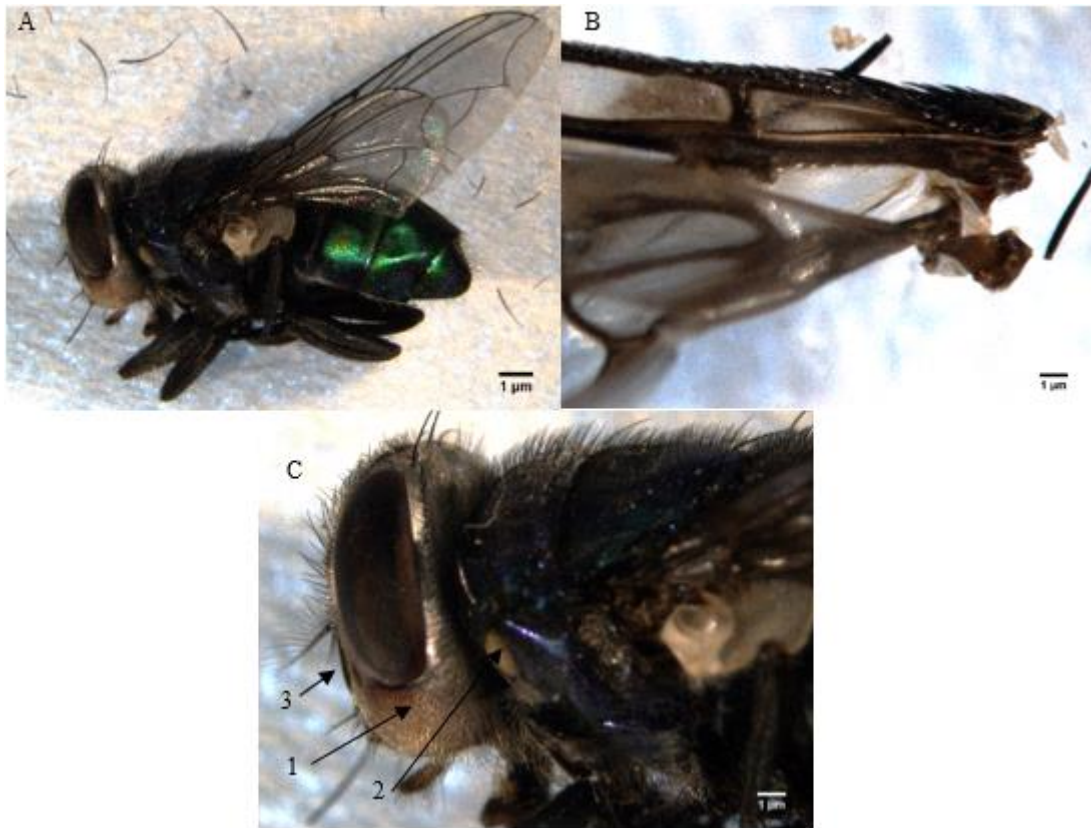


Imagem C: A – *Chrysomya albiceps*; B – nervura tronco com cerdas; C – (1) dilatação genal amarelada, (2) espiráculo torácico anterior amarelo, (3) terceiro segmento da antena escuro.

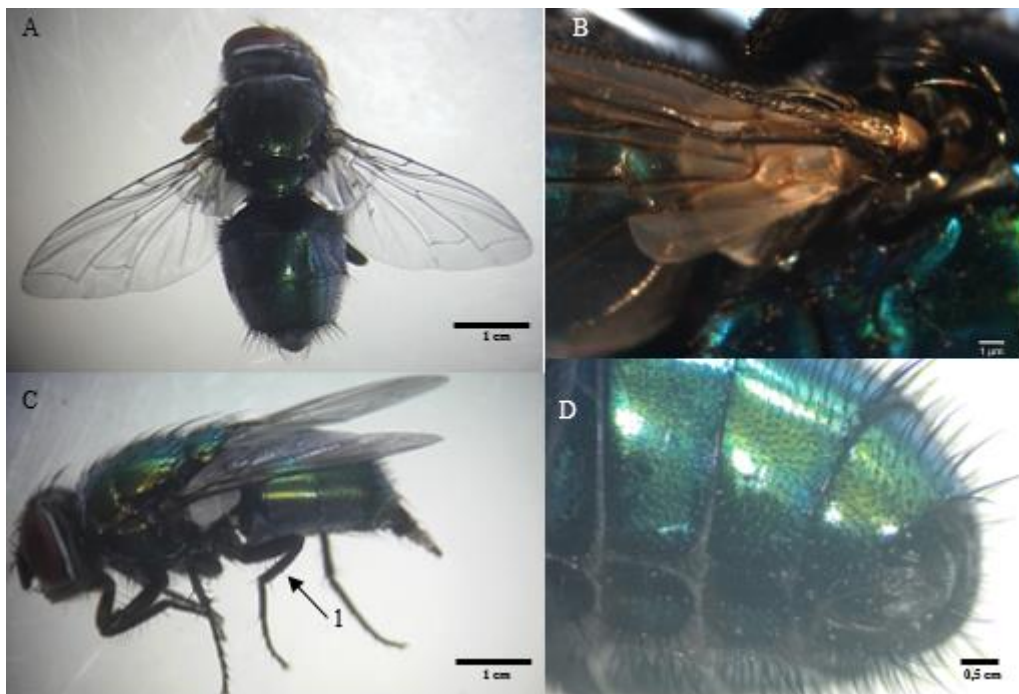


Imagem D: A – *Lucilia sericata*; B – basicosta amarela e calípteras brancas; C – (1) cerda dorsal na tíbia mediana e genitália feminina; D – genitália masculina.

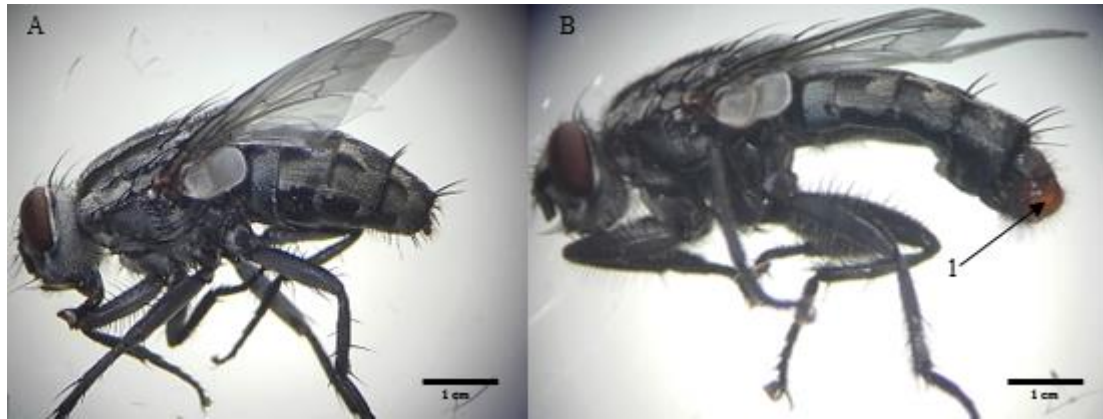


Imagem E: *Sarcophaga argyrostoma*: A – fêmea; B – macho, (1) epandrium vermelho



Imagem F: Muscidae



Imagem G: A – *Fannia canicularis*, (1) abdómen sem manchas castanhas; B – cabeça pormenorizada; C – Asa pormenorizada.



Imagem H: A – *Fannia leucosticta*, (1) abdómen com manchas castanhas; B – asa pormenorizada; C - cabeça pormenorizada



Imagem I: Anthomyiidae



Imagem J: *Alysia manducator*



Imagem L: *Nasonia vitripennis*

**Anexo III: Estruturas de dípteros imaturos**

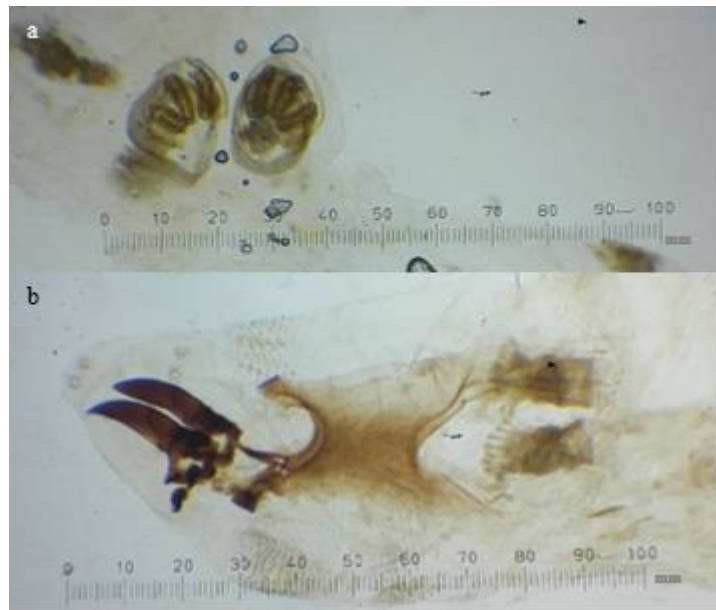


Imagem A: Espécime imaturo não identificado recolhido da segunda armadilha. Espiráculos posteriores (a) e estrutura mandibular (b) a 100x.



Imagem B: *Lucilia sericata*  
Espiráculos posteriores (a) e estrutura mandibular (b) a 100x.



Imagem C: Sarcophagidae

Espiráculos posteriores (a), estrutura mandibular (b) e espiráculo anterior (c). A estrutura mandibular e espiráculo anterior observados a 100x.