



Avaliação da taxa de desenvolvimento de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), sob a óptica da matemática, criados em regime de alternância de temperaturas

Giovanna Yoshida*, Samara F. Kiihl, Patrícia J. Thyssen

Resumo

Dípteros ganham importância na área forense em razão de serem os primeiros organismos a colonizar um corpo, podendo trazer informações substanciais para estimar o intervalo pós-morte (IPM). Para tanto, é primordial o conhecimento acerca da biologia das espécies necrófagas, isto é, do seu tempo de vida, e como alguns parâmetros como a temperatura, podem interferir neste ciclo. Este estudo teve como objetivo avaliar a taxa de desenvolvimento de larvas de três estágios de desenvolvimento de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), sob a óptica da matemática, criadas em temperaturas alternadas. Para tanto, foram avaliados modelos de regressão linear inversa com base no registro de ganho de massa corpórea ou de dados do comprimento larval, e modelos de regressão linear múltipla com base no registro do ganho de massa e usando dados do comprimento (duas variáveis) simultaneamente. Os modelos aqui obtidos certamente serão úteis para aumentar a acurácia do IPM em casos de morte violenta, quando este usar como base a idade do imaturo que está se desenvolvendo no cadáver.

Palavras-chave:

Entomologia forense, intervalo pós-morte, insetos necrófagos.

Introdução

No contexto forense, o estudo de insetos e outros artrópodes, associado aos demais procedimentos periciais, tem como principal propósito levantar informações e vestígios que possam ter valia para o andamento ou conclusão de um processo investigativo¹. Por exemplo, insetos necrófagos encontrados num corpo podem fornecer informações, entre outros, sobre o intervalo pós-morte (IPM).

O cálculo do IPM, quando baseado em informações fornecidas pelos insetos, pode ser feito levando em conta a sucessão de espécies de artrópodes na colonização de um corpo²; ou a partir do conhecimento da idade dos imaturos que ali se alimentam³. Os dípteros, principalmente da família Calliphoridae, são os mais utilizados por serem os primeiros a colonizar um cadáver, além de serem os mais abundantes⁴.

Assim, para o cálculo do IPM, além de um bom conhecimento em taxonomia, um entomologista forense também deverá ter acesso a dados sobre a biologia de insetos necrófagos, sabendo que este último pode ser influenciado por parâmetros tais como temperatura, umidade relativa, fotoperíodo e latitude⁵⁻⁹. Isso porque os insetos são heterotérmicos, o que quer dizer que seu metabolismo sofre forte influência da temperatura¹⁰. Essa condição faz com que a temperatura na qual os insetos se desenvolvem seja um dos fatores mais estudados na área forense.

Diferentes espécies necessitam acumular uma certa quantidade de calor para completar cada estágio de seu desenvolvimento pós-embrionário, deste modo tem seu próprio requerimento total de energia dependente da temperatura na qual se encontram. Em outras palavras, isso quer dizer que uma vez conhecida a temperatura, torna-se possível obter a idade do inseto em questão, des-

de que seus limiares térmicos inferior e superior e sua faixa ótima de crescimento.

Atualmente, diversos estudos se concentraram na obtenção de modelos para interpretar a taxa de desenvolvimento dos insetos em temperaturas constantes, mas não sob alternância de temperaturas, o que poderia representar uma situação mais próxima das circunstâncias reais em que os mesmos podem ser encontrados. Tendo em vista a falta de dados sobre o padrão de desenvolvimento dos imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae), uma espécie necrófaga com grande relevância forense no Brasil, e que estudos que enfoquem a obtenção de dados diversos sobre a entomofauna detritívora são de grande importância para a formação de um banco de dados que auxilie em investigações médico-criminais¹², mais pesquisas que visem ampliar o conhecimento sobre a biologia de espécies devem ser realizadas. Assim, neste estudo objetivou-se, sob a ótica da matemática, avaliar a taxa de desenvolvimento de larvas de *C. macellaria* criadas sob alternância de temperaturas. Para tanto, foram avaliados modelos de regressão linear inversa com base no registro de ganho de massa corpórea ou de dados do comprimento larval, e modelos de regressão linear múltipla com base no registro do ganho de massa e usando dados do comprimento (duas variáveis) simultaneamente.

Material e Métodos

Coletas no campus da Universidade de Campinas (UNICAMP) foram feitas para a coleta da espécie alvo, identificada a partir de chaves taxonômicas¹². A obtenção das amostras e a observação e registro dos dados bionômicos destas foram conduzidos nas depen-



dências do Laboratório de Entomologia Integrativa do DBA/IB, UNICAMP, contando com equipamentos apropriados tais como câmaras climáticas, balanças analíticas de alta precisão e lupas equipadas com sistema de captura de imagem digital e mensuração calibrados da Zeiss®.

As amostras foram retiradas aleatoriamente a cada 12 horas (com o número total de observações sendo $N=240$) e não devolvidas aos potes de criação. Para a determinação do estágio larval (1°, 2° ou 3°) dos indivíduos de cada grupo, a quantidade de fendas estigmáticas no espiráculo posterior foi observada com o auxílio de um estereomicroscópio.

O ganho de massa (peso) e o comprimento das larvas foram analisados, separadamente e em conjunto, por modelos de regressão linear inversa e regressão linear múltipla, em relação ao tempo total de desenvolvimento nos diferentes grupos experimentais (pares de temperaturas), para obtenção de modelos para a estimativa da idade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a linguagem R¹³.

Resultados

Para estimar a idade larval com base somente no ganho de massa corpórea foi utilizado um modelo de regressão linear inversa. Como um único peso estava atrelado a duas idades diferentes, não era possível estimar apenas uma idade por peso, então foi necessário utilizar esta modelagem para inverter as variáveis resposta e explicativa, tornando-se viável a estimação de apenas um peso por idade, e depois utilizar a calibração para obter um estimador da idade para um peso específico.

Para realizar a calibração, foi necessário achar o melhor modelo que predissesse o peso pela idade primeiro. Assim, foram testados três modelos diferentes: regressão linear simples, polinomial com 2 graus e linear com B-Spline de 3 graus de liberdade. Os resíduos de todos os modelos variaram de 0,03 a -0,03, mas nenhum mostrou variância constante como desejado pelas condições de Gauss-Markov. Adicionalmente, outra variável parecia estar afetando o peso, além da idade.

Ao comparar os $R_{ajustado}^2$ foi possível observar que o modelo de regressão com B-Spline de 3 graus de liberdade ofereceu o melhor ajuste, tendo sido então utilizado para realizar a calibração, desde que o polinômio fosse monótono na região de interesse¹⁴. Como duas idades diferentes têm como resposta o mesmo peso, a função não é monótona, então foi necessário dividir a função em duas curvas monótonas.

Dado que apenas a calibração controlada foi considerada (isto é, a predição da idade só consegue ser realizada ao fixar um valor do peso), foi possível prever uma idade de cada vez, não sendo concebível a realização de uma tabela automática com todos os valores e predições.

Utilizando a função *invest* do pacote *investr*, foi possível achar a predição da idade, assim como um intervalo de 95% de confiança. Como exemplo foi utilizado o valor $peso = 0,05$. A Tabela 1 mostra os valores obtidos para cada função.

	Estimativa	Intervalo mais baixo	Intervalo mais alto
A	83,02454	80,16094	86,80176
B	107,3054	104,2804	109,7128

Tabela 1. Resultados da função *invest* para $peso = 0,05$ e $Idade_i \leq 96$ (A) e $Idade_i \geq 96$ (B).

Nas Figuras 1A e 1B é perceptível que foi possível estimar as duas idades associadas ao mesmo peso. Para que isso fosse possível, foi necessário assumir previamente uma idade mínima e máxima de modo a alcançar as duas estimativas diferentes.

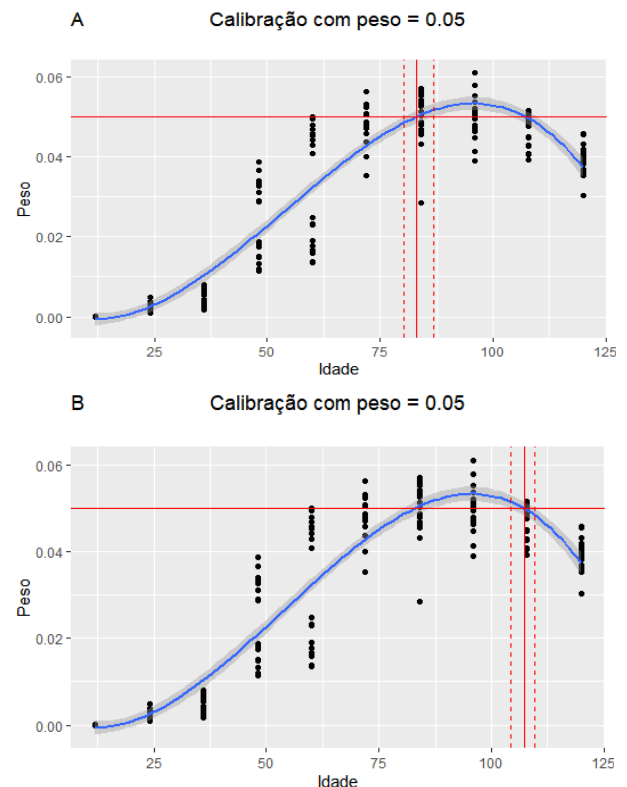


Figura 1. Representação gráfica da regressão com B-Spline de 3 graus de liberdade utilizando o peso larval sobreposta com a calibração do $peso = 0,05$ (A) com o intervalo $Idade_i \leq 96$; (B) com o intervalo $Idade_i \geq 96$.

Assim como feito para a estimação da idade larval com base somente no ganho de massa corpórea, baseando-se somente no comprimento também foi utilizado um modelo de regressão linear inversa, já que um único comprimento estava atrelado a duas idades di-



ferentes. Assim, foi necessário utilizar a mesma modelagem anterior para inverter as variáveis resposta e explicativa. Nesse contexto, os resíduos de todos os modelos também foram pequenos, variando de 5 a -5, mas nenhum deles possuiu variância constante como desejado pelas condições de Gauss-Markov. Ademais, apesar de estarem mais espaçados que os modelos com peso, os resíduos aparentaram seguir uma função, indicando que uma outra variável poderia estar afetando o comprimento, além da idade.

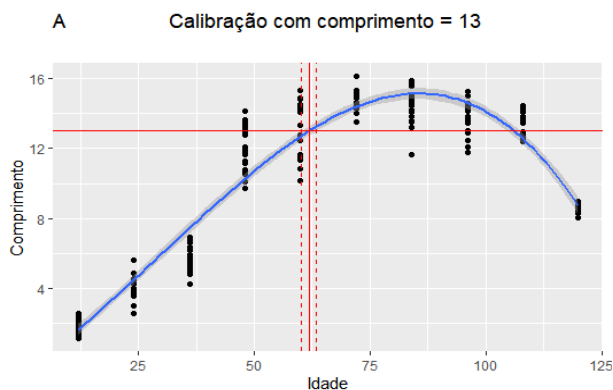
Comparando os $R_{ajustado}^2$, notou-se que a regressão com B-splines de 3 graus de liberdade obteve o melhor resultado, mas novamente a curva do ajuste também não era monótona. Dessa forma, foi necessário dividir a função em duas curvas monótonas.

Utilizando mais uma vez a função *invest* do pacote *investr*, foi possível achar a predição do comprimento, assim como um intervalo de 95% de confiança. Como exemplo foi utilizado o valor *comprimento* = 13. A Tabela 2 mostra os valores obtidos para cada função.

	Estimativa	Intervalo mais baixo	Intervalo mais alto
A	61,83542	60,26271	63,46271
B	106,1305	104,7015	107,4638

Tabela 2. Resultados da função *invest* para *comprimento* = 13 e $Idade_i \leq 84$ (A) e $Idade_i \geq 84$ (B).

Nas Figuras 2A e 2B é perceptível que foi possível estimar as duas idades associadas ao mesmo comprimento. Para tal, foi necessário assumir previamente uma idade mínima e máxima de modo a alcançar estas duas estimativas diferentes.



B Calibração com comprimento = 13

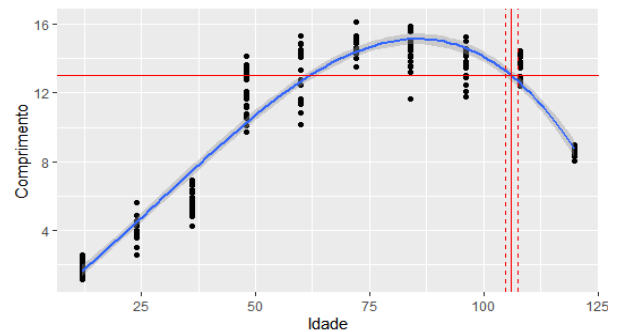


Figura 2. Representação gráfica da regressão com B-Splines de 3 graus de liberdade utilizando o comprimento larval sobreposta com a calibração do *comprimento* = 13 (A) com o intervalo $Idade_i \leq 84$; (B) com o intervalo $Idade_i \geq 84$.

Observando os resíduos de ambos os modelos finais acima (regressão com B-Splines de 3 graus de liberdade utilizando o peso e o comprimento separadamente), percebeu-se o efeito de alguma outra variável, uma vez que eles aparentaram seguir uma função. Assim sendo, foi feita uma regressão linear múltipla com a variável idade como resposta, e as variáveis peso e comprimento e a interação entre as duas como explicativas para checar se elas complementam uma à outra.

Dessa forma, queremos um modelo da forma:

$$Idade_i = \beta_0 + \beta_1 * peso_i + \beta_2 * comprimento_i + \beta_3 * peso_i * comprimento_i + e_i$$

Foi utilizada a função *lm* no RStudio e obteve-se que todos os estimadores do modelo foram significativos a um nível de 1% e também um $R_{ajustado}^2 = 0,9128$. Os valores dos estimadores foram: $\hat{\beta}_0 = 11,3251$, $\hat{\beta}_1 = 4319,0062$, $\hat{\beta}_2 = 1,1414$ e $\hat{\beta}_3 = -221,5901$, e temos como modelo de predição:

$$\widehat{Idade}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 * peso_i + \hat{\beta}_2 * comprimento_i + \hat{\beta}_3 * peso_i * comprimento_i$$

ou seja, a idade estimada base é de 11,325 h (intercepto); para cada 1 unidade incrementada no peso, aumenta-se 4319,0062 h na idade estimada; para cada 1 unidade incrementada no comprimento, aumenta-se 1,1414 h na idade estimada; e para cada interação de *peso* * *comprimento* diminui-se 221,5901 h na idade estimada.

Apesar do $R_{ajustado}^2$ ser alto e os estimadores serem significativos, notou-se que os resíduos não seguiam as condições de Gauss-Markov, além de aparentarem seguir uma função, como visto na Figura 3. Dessa forma, utilizar tanto peso quanto comprimento conjuntamente não resolveu o problema anterior, indicando que alguma outra variável teve efeito significativo na estimação da idade.

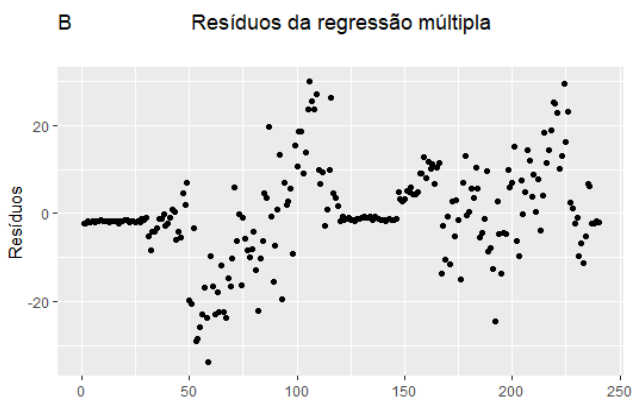


Figura 3. Representação gráfica dos resíduos do modelo de regressão múltipla.

Discussão

Entre uma das abordagens mais utilizadas para calcular e expressar o tempo de desenvolvimento dos insetos dentro de uma função matemática está o método denominado de graus-dias-acumulados (GDA), que de fato interpreta o desenvolvimento em função de uma variável como temperatura, peso, comprimento, entre outras¹⁵. Esse modelo, com base em regressões lineares inversas, requer poucos dados para a formulação e é fácil tanto para elaborar quanto para fazer uso para estimar a idade do inseto, resultando em valores aproximadamente acurados. O problema é que, em geral, o crescimento dos insetos com metamorfose completa não é retilíneo: inicia de forma ascendente e decresce à medida que está próximo de atingir a maturidade do estágio imaturo.

Os modelos aqui apresentados não têm um cálculo ou aplicação tão simples como o GDA, mas ganham mérito no que diz respeito à obtenção de valores consideravelmente acurados em quaisquer intervalos do desenvolvimento, não excluindo os extremos que usualmente são mais sensíveis. Outra vantagem é que podem fazer uso de variáveis que podem ser facilmente mensuráveis, tais como o peso e o comprimento larval, o que habitualmente não tem sido levado em conta no cálculo de GDA. Contudo, o comportamento dos resíduos é um parâmetro que deve ser bem observado, pois pode causar algum 'ruído'. Adicionar duas variáveis simultaneamente não resolveu este problema de ajuste, visto que os resíduos da regressão múltipla também não foram adequados.

Conclusão

O modelo de regressão inversa tendo como variável resposta o comprimento foi o que ofereceu o melhor ajuste para interpretar o desenvolvimento dos distintos estádios larvais de *C. macellaria*, levando em conta o $R^2_{ajustado}$ aqui registrado. Vale a pena chamar a atenção

para o fato de que embora o $R^2_{ajustado}$ obtido, a partir do modelo de regressão simples tendo como variável resposta o peso, ter sido maior do que aquele obtido pelo modelo de regressão simples do comprimento, após o ajuste dos dados em um polinômio, com a variável comprimento foi alcançada uma melhor estimativa para a idade esperada do inseto. Essas conclusões podem ser melhor visualizadas nas análises de resíduos, onde se observou que os resíduos dos modelos com comprimento tendem a ser mais esparsos (mesmo que não tão próximos do ideal).

Apoio e Agradecimentos

Nossos agradecimentos a todo apoio institucional, tanto no que diz respeito à infraestrutura, quanto à concessão do auxílio em forma de bolsa de estudo através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica/SAE vinculado à Pró-reitoria de Pesquisa da UNICAMP, o que nos permitiu desenvolver este estudo de excelência acadêmica e social.

¹ Thyssen, P.J. 2011. Entomologia Forense. In: Marcondes CB (org.) Entomologia Médica e Veterinária. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu. pp. 129-137.

² Méglin, P. Faune des cadavres. Application de L'entomologie a la Médecine Légale. G. Masson Editeurs, Paris. 1894. 214 p.

³ Catts, E.P. & Goff, M.L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. Annu. Rev. Entomol. 37: 253-272.

⁴ Carvalho, L.M.L.; Thyssen, P.J.; Linhares, A.X.; Palhares, F.A.B. 2000. A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95: 135-138.

⁵ Hanski, I. 1977. Biogeography and ecology of carrion flies in the Canary Islands. Ann. Entomol. Fenn., 43: 101-107.

⁶ Wells, J.D. & Kurahashi, H. 1994. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) development: Rate, variation and the implications for forensic entomology. Japanese J. Sanit. Zool., 45: 303-309.

⁷ Greenberg, B. 2002. Problems in estimating the time of death. In: GREENBERG, B.; KUNICH, J.C. 2002. Entomology and the law: flies as forensic indicators. Cambridge: University Press. 356p.

⁸ Mello, R.S., Borja, G.E.M., & Queiroz, M.M.C. 2012. How photoperiods affect the immature development of forensically important blowfly species *Chrysomya albiceps* (Calliphoridae). Parasitol. Res., 111: 1067-1073.

⁹ Campobasso, C. P., Vella, G. D., Introna, F. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. Forensic Sci. Int., 120: 18-27.

¹⁰ Wigglesworth, V.B. 1972. The principles of Insect Physiology. London: Chapman and Hall. pp. 663-669.

¹¹ Thyssen, P.J.; Aquino, M.F.K.; Purgato, N.C.S.; Martins, E.; Costa, A.A.; Lima, C.G.P.; Dias Fº, C.R. 2018. Implications of entomological evidence during the investigation of five cases of violent death in Southern Brazil. J. Forensic Sci. Res. 2: 1-8.

¹² Grella, M.D. & Thyssen, P.J. 2011. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. Disponível em: <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil> Acesso em 20 de abril de 2019.

¹³ R Core Team. 2017. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>

¹⁴ Seber, G. A., & Lee, A. J. 2012. Linear regression analysis (Vol. 329). John Wiley & Sons.

¹⁵ Wagner, T. L., Wu, H. I., Sharpe, P. J., Schoolfield, R. M., & Coulson, R. N. 1984. Modeling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. Annals of the Entomological Society of America, 77(2), 208-220.