

Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte  
Mestrado em Ciências Forenses

Efeito da fluoxetina no desenvolvimento de  
formas imaturas de *Calliphora vicina*  
(Diptera: Calliphoridae)



**Orientadora:** Doutora Marisa Freitas

**Coorientador:** Mestre José Grosso-Silva

**Discente:** Isa Dias, nº 19017

Gandra, 28 de Fevereiro de 2014





Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte  
Mestrado em Ciências Forenses

**Curso:** Mestrado em Ciências Forenses

**Título:** Efeito da fluoxetina no desenvolvimento de formas imaturas da mosca *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae)

**Imagem da capa:** *Calliphora vicina* fêmea a realizar a postura de ovos. (Imagem obtida no decorrer dos ensaios)

**Orientadora:** Doutora Marisa Freitas

**Coorientador:** Mestre José Grosso-Silva

**Discente:** Isa Dias, nº 19017

Gandra, 28 de Fevereiro de 2014



## RESUMO

A entomologia forense é a aplicação do estudo da biologia de insetos e outros artrópodes em processos criminais, ajudando a determinar o local e tempo dos incidentes de acordo com a fauna encontrada no local de crime e o estágio de desenvolvimento desta.

Existem estudos na literatura científica que evidenciam que o desenvolvimento de artrópodes é alterado quando certos compostos se encontram presentes na sua fonte de alimentação. Essas alterações podem prejudicar a estimativa do intervalo *postmortem*. Assim sendo, é muito importante a existência de uma base de dados com informação completa relativa aos insetos de interesse forense, adequada a cada área geográfica e com as alterações que certos compostos exercem sobre o desenvolvimento das larvas.

Como tal, o principal objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da fluoxetina, um dos antidepressivos mais utilizados em Portugal, no desenvolvimento de formas imaturas de *Calliphora vicina*, para auxílio em investigações forenses. Utilizou-se a espécie *Calliphora vicina*, uma mosca de referência nesta área, pois é uma das primeiras espécies a chegar a um cadáver. A fonte de alimentação das larvas foi músculo de porco triturado com adição de fluoxetina em variadas concentrações. Foram realizadas amostragens no início do estágio *postfeeding*, para pesagem e medição, e foram registados os tempos entre cada estágio. Algumas concentrações do composto testado evidenciaram alterações no desenvolvimento das larvas, nomeadamente na diminuição do peso e tamanho e no aumento dos graus-horas acumulados necessários ao seu desenvolvimento.

Os resultados obtidos são pioneiros e constituem um contributo importante para o conhecimento do grau de interferência da fluoxetina no desenvolvimento de formas imaturas de *Calliphora vicina*. Desta forma, pode-se minimizar erros na estimativa do intervalo *postmortem* mínimo, quando baseado no padrão de desenvolvimento desta mosca.

Palavras-chave: Entomotoxicologia forense, *Calliphora vicina*, fluoxetina



## ABSTRACT

Forensic entomology is the application of the study of the biology of insects and other arthropods in criminal cases, helping to determine time and place of the incident, according to the fauna found on the crime scene and their stage of development.

There are reports in scientific literature that show that the development of arthropods is changed when certain compounds are present in their food source. These changes could affect the estimation of the postmortem interval. Therefore, the existence of a database with complete information on insects of forensic interest is very important, being suitable to each geographical area, with the changes exerted by certain compounds on the development of larvae.

Therefore, the main objective of this work was to study the effect of fluoxetine on the development of the immature forms of *Calliphora vicina*, as a way to aid forensic investigations. The species *Calliphora vicina* was used, as it is a reference fly in forensics being one of the first species to reach a corpse. The larval source of nourishment was minced pork muscle, to which fluoxetine was added in variable concentrations. Samplings were made at the beginning of the postfeeding stadium, for weighing and measurement, and the times between the stages were recorded. Some concentrations of the compound tested showed changes in larval development, namely a decrease in weight and size and an increase in the accumulated degree hours required for their development.

These results constitute the first and an important contribution to the knowledge of the degree of interference of fluoxetine on the development of immature *Calliphora vicina*. As such, errors in estimating the minimum postmortem interval based on the pattern of development of this fly could be minimized.

Keywords: Forensic Entomotoxicology, *Calliphora vicina*, Fluoxetine





## **AGRADECIMENTOS**

Os meus agradecimentos a todos os que possibilitaram a realização desta tese nomeadamente:

Aos meus orientadores, Doutora Marisa Freitas e Mestre José Grosso-Silva, por me auxiliarem sempre que precisei;

Ao Doutor Ricardo Dinis por me ajudar em pormenores, que para mim eram muito importantes, e sempre que lhe pedi ajuda;

Ao Dr. Rui Sousa por me ajudar em tudo o que precisei e me apresentar soluções aos meus problemas;

À D. Paula Abreu e ao Dr. Rui por disponibilizarem um laboratório para trabalhar;

Aos amigos e funcionários da CESPU, Doutora Maria José, D. Matilde, D. Margarida, D. Beta, Sr. João, Sr. Jorge, Sr. Carlos, D. Ermelinda, entre muitos outros, que me ajudaram em várias coisas e de várias formas, e animaram enquanto realizei a parte prática;

À Vanessa, Diana e Cláudia que me ajudaram quando lhes pedi um sítio para passar uns dias e resolver o que precisava ser resolvido;

Aos meus pais, Ilda e Francisco, e irmão, Bruno, que me apoiaram incondicionalmente;

Aos meus avós, Maria da Luz e José, por fazerem do quintal deles um local fantástico, aos olhos duma criança, para encontrar "bichinhos".

Deixo os meus sinceros agradecimentos a todos os que não foram citados mas que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 ENTOMOLOGIA FORENSE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1 HISTÓRIA DA ENTOMOLOGIA FORENSE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.2 FASES E FATORES QUE AFETAM A DECOMPOSIÇÃO E COLONIZAÇÃO DE UM CADÁVER</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.3 CONTRIBUIÇÃO DA ENTOMOLOGIA FORENSE PARA A RESOLUÇÃO DE CRIMES</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 ENTOMOTOXICOLOGIA FORENSE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 CALLIPHORA VICINA</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3.1 CICLO DE VIDA DA CALLIPHORA VICINA</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS LARVAS E DOS ADULTOS DE CALLIPHORA VICINA E DISTINÇÃO DE OUTRAS ESPÉCIES</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4 FLUOXETINA</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4.1 ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4.2 PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4.2.1 MECANISMO DE AÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4.2.2 EFEITOS FARMACODINÂMICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.3 TOXICOCINÉTICA</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4.3.1 ABSORÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4.3.2 DISTRIBUIÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4.3.3 METABOLISMO</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4.3.3.1 INTERAÇÃO COM OUTROS COMPOSTOS</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4.3.4 ELIMINAÇÃO</b> .....	<b>25</b>

<b>1.5 DEFINIÇÃO E JUSTIFICAÇÃO DOS OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>1.6 ESTRUTURA DA TESE .....</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 ARMADILHAS DE RECOLHA.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE TRABALHO .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.1 CRIAÇÃO DE LARVAS DE CALLIPHORA VICINA .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FLUOXETINA NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE CALLIPHORA VICINA .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.3 MORTE DAS LARVAS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>34</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FLUOXETINA NO DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE CALLIPHORA VICINA .....</b>	<b>35</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6. PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético  
5-HT - serotonina  
5-HTP - 5-hidroxitriptofano  
AADC - descarboxilase de aminoácidos aromáticos  
AC - adenilato ciclase  
ADN - ácido desoxirribonucleico  
ANOVA - análise de variância  
CYP - citocromo P450  
DAG - diacilglicerol  
DL - dose letal  
EL - estágio larvar  
FDA - Food and Drug Administration  
GDA - graus-dias acumulados  
GHA - graus-horas acumulados  
IP<sub>3</sub> - inositol 1,4,5-trifosfato  
IPM - intervalo *postmortem*  
MAO - monoamina oxidase  
NaCl - cloreto de sódio  
PIP<sub>2</sub> - fosfatidilinositol 2,4-bifosfato  
Ref - referências  
SD - desvio padrão  
SSRI - inibidor seletivo da recaptção de serotonina  
 $t_{1/2}$  - tempo de semi-vida  
TCA - antidepressivos tricíclicos  
Temp - temperatura  
TH - trifosfato hidroxilase  
TRYP - triptofano  
V<sub>d</sub> - volume de distribuição

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida duma mosca da família Calliphoridae ( <i>Chrysomya megacephala</i> ). .....	11
<b>Tabela 1:</b> Duração de desenvolvimento de <i>Calliphora vicina</i> a diversas temperaturas.. ...	11
<b>Figura 2:</b> Desenvolvimento de larvas de <i>C. vicina</i> a temperaturas constantes.....	12
<b>Figura 3:</b> Vista posterior de larva de <i>Calliphora</i> com os espiráculos posteriores visíveis .	14
<b>Figura 4:</b> A - Exemplar adulto de <i>Calliphora vicina</i> ; B - Asa de <i>Calliphora vicina</i> . ....	15
<b>Figura 5:</b> Estrutura química de fluoxetina.....	17
<b>Figura 6:</b> Esquema dos processos associados com a neurotransmissão serotoninérgica. ...	19
<b>Figura 7:</b> Estrutura química de fluoxetina e metabolito ativo norfluoxetina. ....	23
<b>Figura 8:</b> Metabolismo da fluoxetina e isoenzimas CYP.....	24
<b>Figura 9:</b> Localização do local de captura de moscas. ....	27
<b>Figura 10:</b> Material utilizado para a elaboração de armadilhas exteriores.....	28
<b>Figura 11:</b> Armadilha exterior.....	29
<b>Figura 12:</b> Local de observação à lupa.....	29
<b>Figura 13:</b> Local de morte das larvas por água quente. ....	30
<b>Figura 14:</b> Local de morte das larvas por congelação.....	31
<b>Figura 15:</b> Local de recolha de moscas das armadilhas e de ovos dos recipientes.....	31
<b>Figura 16:</b> Disposição do interior das caixas com cobertura plástica. ....	33
<b>Figura 17:</b> Balança e paquímetro.....	34
<b>Figura 18:</b> Ciclo de vida de <i>Calliphora vicina</i> .....	35
<b>Figura 19:</b> Larvas e pupas observadas em ensaios preliminares. ....	36
<b>Tabela 2:</b> Temperaturas observadas nos ensaios. ....	36
<b>Figura 20:</b> Comprimento das larvas no início do estágio <i>postfeeding</i> na presença e ausência (controlo) de fluoxetina (7,5–90,0 µg/g).....	37
<b>Figura 21:</b> Peso das larvas no início do estágio <i>postfeeding</i> na presença e ausência (controlo) de fluoxetina (7,5–90,0 µg/g).....	38
<b>Figura 22:</b> Graus-horas acumulados (GHA) necessários ao desenvolvimento das larvas no início do estágio <i>postfeeding</i> na presença e ausência (controlo) de fluoxetina (7,5–90,0 µg/g).....	39



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Entomologia Forense

A entomologia forense tem a sua base na interação entre insetos, ciência e o sistema judicial [1]. Uma das áreas de ação da entomologia forense é a vertente médico-criminal, que é a área em que se insere este trabalho, pois é a que utiliza os insetos como auxílio para a resolução de crimes, principalmente na estimativa do intervalo *postmortem* (IPM) [1-3].

É impossível dizer, com completa certeza, quando a morte ocorreu, exceto em casos em que esta é presenciada. Apesar disso, através de achados no cadáver e no local do crime é possível estimar um intervalo de tempo em que é mais provável a morte ter ocorrido. Quanto menos tempo tiver decorrido após a morte mais precisa será essa estimativa. Esse intervalo é obtido pela conjugação de vários dados obtidos pela observação do cadáver e do local de morte, nomeadamente, *rigor mortis*, *livor mortis*, *algor mortis*, e decomposição, atendendo-se às condições ambientais do local, sendo a temperatura um fator de elevada importância [4, 5]. Um cadáver pode também ser considerado um micro-habitat temporário, uma fonte de alimento em rápida mudança para variadas formas de vida [6, 7].

A maioria dos animais que aparece na carne em decomposição são artrópodes [6, 7] e dentro destes, os insetos são o grupo predominante, quer em termos de indivíduos presentes, como em biomassa (peso total de indivíduos) e em diversidade (número de espécies). Em média, cerca de 85% dos animais presentes num cadáver são insetos [7]. Estes são essenciais na reciclagem de material orgânico na natureza, dedicando-se à sua degradação em elementos mais simples [7].

#### 1.1.1 História da Entomologia Forense

Os registos mais antigos ligados à entomologia forense datam do séc. XIII, referindo-se a um homicídio ocorrido numa vila chinesa e investigado por Sung Tz'u [7-10]. O homicídio foi realizado com uma foice e após várias investigações e interrogações infrutíferas, todos os aldeões e as suas respetivas foices foram reunidos. Devido à existência de vestígios não visíveis de sangue na pega e na lâmina da foice do crime, esta atraiu moscas. Confrontado com estes dados, o dono da foice confessou o crime [7-10].

Francesco Redi realizou uma experiência, em 1668, utilizando carne exposta a moscas, com a qual deduziu a conexão entre a postura de ovos e a eclosão de larvas, pois até essa data pensava-se que as larvas apareciam por geração espontânea [7, 9]. Em 1848, Orfila, um médico francês, observou que os cadáveres eram habitados por variados artrópodes e que os mesmos eram importantes na sua decomposição [10, 11]. Orfila poderá ter sido o primeiro a introduzir o conhecimento de sucessão entomológica em cadáveres [11].

A primeira utilização de insetos numa investigação forense, desde o caso investigado por Sung Tz'u, foi em 1855 e ocorreu na Europa [6, 7, 10, 12]. Foi descoberto um corpo mumificado duma criança e, através dos insetos encontrados, Bergeret concluiu quando teria ocorrido a morte e, conseqüentemente, quem seriam os culpados [7, 12]. Os métodos utilizados por ele são essencialmente os mesmos utilizados pelos entomologistas forenses de hoje em dia na estimativa do IPM mínimo [7]. No entanto, as suas observações não se relacionavam com a sucessão de artrópodes num cadáver [10]. Nos finais do séc. XIX, Pierre Mégnin publicou alguns trabalhos referentes à importância da utilização da entomologia forense. Um dos seus trabalhos foi “La Faune des cadavres: application de l'entomologie à la médecine légale”, publicado em 1894 [10, 13]. O seu estudo baseou-se no facto de que o cálculo do IPM poderia ser realizado pela análise dos variados artrópodes que aparecem num corpo em decomposição, isto é, a sucessão de insetos [6, 7], sem considerar a idade dos mesmos. Hoje em dia utiliza-se este princípio conjuntamente com a idade dos artrópodes na determinação do IPM [7].

Os primeiros estudos realizados na Europa para o auxílio da determinação do IPM mínimo foram realizados por Leclerq e Leclerq [14], Leclerq [15], Nuorteva [16] e Nuorteva *et al.* [17], sendo seguidos por vários outros trabalhos [2, 6, 7, 9, 18, 19-31].

Uma das áreas mais relevantes da entomologia forense é a entomotoxicologia que consiste na aplicação de métodos analíticos da toxicologia a insetos de interesse forense [6, 32, 33]. Os primeiros estudos de entomotoxicologia forense na Europa foram realizados por Beyer *et al.* [34] e Nuorteva e Nuorteva [35] (a partir dum caso de 1977 [19]), sendo seguidos por vários outros trabalhos [36-43].

Em Portugal os estudos de sucessão em entomologia forense iniciaram-se em 2005 por Prado e Castro [44] através dos quais foram registadas novas espécies associadas a cadáveres, incluídas nas famílias Calliphoridae (11 espécies) [45, 46], Piophilidae (6 espécies) [47, 48] e Sarcophagidae (10 espécies) [49]. Estes estudos contribuíram grandemente para o conhecimento de dípteros atraídos para cadáveres em Portugal.



### **1.1.2 Fases e fatores que afetam a decomposição e colonização de um cadáver**

Alguns investigadores realizaram trabalhos no sentido de definir fases de decomposição de um cadáver e os artrópodes que se relacionam com cada uma delas [9, 18, 50-52]. Para cada fase de decomposição são atraídos artrópodes específicos. Contudo, um artrópode em particular pode ser encontrado em mais do que uma das fases, pois dependendo das condições em que o cadáver se encontre, pode ser atrativo para uma determinada espécie em várias fases de decomposição [9]. A ação dos artrópodes vai tornar o cadáver apelativo aos artrópodes seguintes que procuram o cadáver para alimentação [53]. A duração de cada fase de decomposição vai depender de vários fatores, nomeadamente da estação do ano, do estado do cadáver (exposto, enterrado, submerso, envolto em algo, mumificado), das condições climáticas, da localização ambiental (bosques, prados) e da localização geográfica [9, 54-58]. A própria decomposição do cadáver pode ser influenciada pela ação dos artrópodes [18, 53] e a sua ausência no cadáver pode contribuir para o atraso da putrefação [56].

A colonização segue um padrão se o corpo estiver intacto, sem feridas ou hemorragias externas. As moscas têm preferência por zonas húmidas do cadáver para postura. Os primeiros locais a serem colonizados são os orifícios naturais: os olhos, a boca, o nariz e as orelhas [4, 7, 29, 30, 56]. Se o ânus e os genitais estiverem expostos também serão colonizados [7]. Sangue, feridas [4, 7, 29, 30, 56] e pregas corporais (axilas, por exemplo) proporcionam outros locais de colonização [4, 7, 56].

As feridas provocadas *ante-* ou *perimortem* são mais atrativas do que as *postmortem* devido à presença de sangue. A ação dos insetos nas feridas pode alterar as características das mesmas, mas a sua ação durante os estádios iniciais de decomposição noutras áreas que não orifícios naturais alerta os investigadores para a possibilidade da existência de ferimentos *ante-* e *perimortem* (por exemplo, lesões provocadas por a vítima se ter defendido) [7].

O trabalho do entomologista forense é interpretar as variadas interações existentes entre os insetos e o cadáver durante a decomposição, distinguindo os insetos essenciais à investigação e os presentes acidentalmente, de forma a produzir dados que auxiliem na resolução de um crime [7]. Os artrópodes que se alimentam de cadáveres formam uma sucessão específica associada às várias fases de decomposição. O IPM mínimo pode ser calculado através da conjugação dos estudos realizados em sucessão entomológica associada às várias fases de decomposição, com o reconhecimento das diferentes espécies

associadas a cada uma das fases e o conhecimento dos tempos de desenvolvimento de cada espécie [9]. Esta interação dos insetos com o cadáver resulta em vagas sucessivas de colonização [10, 13, 18, 56, 59-61]. Tal como o processo de decomposição, as vagas de colonização também sofrem alterações, estando estas dependentes da localização geográfica, do tipo de morte, do tamanho do corpo e das condições ambientais (sendo a temperatura a mais importante). Estas alterações afetam o desenvolvimento das formas imaturas dos insetos que colonizam o cadáver, acelerando ou retardando, por sua vez, o processo de decomposição [62, 63].

Os insetos e outros artrópodes que colonizam cadáveres podem ser incluídos em quatro grupos, sendo eles os necrófagos, os seus predadores e parasitas, os omnívoros, e os adventícios/acidentais [6, 7, 9, 29, 56, 64, 65].

### **1.1.3 Contribuição da entomologia forense para a resolução de crimes**

A principal aplicação forense da entomologia baseia-se no estudo de sucessão dos insetos que colonizam o cadáver e das suas taxas de desenvolvimento, para a estimativa do IPM mínimo [66, 67]. O reconhecimento de quais as espécies presentes em cada fase e o conhecimento do tempo ocupado por cada espécie em cada fase possibilita a estimativa do IPM [9].

O IPM é o intervalo de tempo desde a morte até à descoberta do cadáver [30, 68]. A estimativa do IPM mínimo baseia-se no tempo necessário para as larvas dum cadáver se desenvolverem até ao estágio de crescimento mais velho, isto é, trata-se duma estimativa da idade das larvas mais velhas encontradas num cadáver [30, 69], dando a informação sobre a altura de colonização por parte desses insetos [65].

Como os dípteros são organismos poiquilotérmicos, o seu crescimento vai depender da temperatura [30, 69]. A taxa de desenvolvimento duma mosca também vai depender das características genéticas decorrentes de adaptações geográficas da mesma e de fatores ambientais. Para o cálculo da idade duma mosca devem utilizar-se dados da mesma espécie e da mesma zona geográfica, para reduzir a possibilidade de erros [30].

Existem duas formas de se estimar a idade dum inseto:

- ❖ Através de diagramas *isomegalen* ou *isomorfen*, com os quais se estima a idade da larva através do seu comprimento, peso, ou estágio de desenvolvimento, assumindo-se que se desenvolveram a uma temperatura constante [21, 65, 70].

- ❖ Através do método de adição térmica ou dos graus-horas acumulados, assumindo-se que a taxa de desenvolvimento é proporcional à temperatura dentro dum intervalo de temperatura específico [30, 65, 71].

O método mais usual para a estimativa da idade das larvas é através do método de adição térmica [69]. Os graus-horas acumulados (GHA) são a quantidade de calor necessário para o desenvolvimento do inseto. São obtidos pela multiplicação da temperatura média pela duração da exposição à temperatura em questão ( $GHA = \text{temperatura média} \times \text{duração de exposição}$ ) [30], desde a hora de postura até à emergência do adulto ou marcos de desenvolvimento como as mudas. O desenvolvimento dos insetos depende da temperatura, como tal este varia com as oscilações térmicas. Existe um limiar mínimo e máximo de desenvolvimento a partir do qual o inseto não se desenvolve ou acaba por morrer [30]. Para *Calliphora vicina*, esta temperatura mínima é ainda discutível visto que vários valores foram admitidos como sendo a temperatura mínima de desenvolvimento, que vão de 1°C [67, 72] até 6°C [71, 73]. Também os valores máximos de temperatura em que ocorre desenvolvimento variam de 29°C [27] até 35°C [21] (larvas morrem antes da formação da pupa) [67].

Obtendo-se os GHA é possível calcular o número de horas que um inseto demorou a desenvolver-se a uma temperatura específica [30]. Por exemplo, se um inseto acumula 3000 graus-horas durante o seu desenvolvimento e se queremos saber quanto tempo demora a desenvolver-se a uma temperatura média de 21°C, iremos obter, aproximadamente, 143 horas de tempo de desenvolvimento ( $\text{duração} = GHA/\text{temperatura}$ ). Cada estágio de desenvolvimento requer uma quantidade específica de calor para se desenvolver tal como cada espécie requer GHA diferentes para se desenvolver a uma temperatura específica [30].

Existem duas formas de calcular o IPM mínimo. Durante o período *postmortem* inicial a estimativa é realizada calculando a idade dos insetos mais velhos colhidos do cadáver. No período *postmortem* tardio, a estimativa baseia-se na comunidade de artrópodes que colonizaram o cadáver relacionando-se com os padrões esperados de sucessão [6, 30]. Apesar da contribuição mais relevante ser na determinação do IPM mínimo [23, 29, 30, 66-68], a entomologia forense também pode fornecer mais informações, entre elas, a possibilidade do cadáver ter sido movido após a morte [7, 9].

Devido ao facto das espécies possuírem uma distribuição geográfica diferente, que varia com o clima, a vegetação, a altitude, a época do ano e com o facto de se tratar de uma área rural ou citadina, é possível saber se a morte ocorreu num local e depois o corpo foi

transportado para outro local, tendo em conta o tipo de artrópodes que se encontra no cadáver [7, 74].

Outra aplicação da entomologia forense é a investigação de casos de negligência infantil. De acordo com a idade e a espécie dos insetos presentes na criança, é possível estimar a data de início de negligência. Tal é possível porque, se a criança foi negligenciada, poderão existir fezes e urina na região ano-genital, o que irá atrair espécies de moscas específicas. Caso se verifique a morte da criança, outras espécies de moscas serão atraídas ao cadáver. Se forem encontradas larvas de insetos atraídos para fezes e urina com uma idade superior à idade das moscas que são primeiro atraídas a odores de cadáver, suspeitar-se-á de negligência [75]. Um princípio semelhante pode ser aplicado na negligência a idosos [76].

Quando existem dúvidas relativamente à espécie que se está a identificar, pode-se recorrer à análise de ADN [77-81]. Também se pode proceder à identificação genética do conteúdo gástrico de insetos. Assumindo-se que os insetos presentes no local de crime se alimentaram do cadáver, será de esperar a existência de ADN humano nos seus estômagos [78, 79, 81-85].

A deteção de ferimentos *antemortem* supracitada e a pesquisa de químicos ou toxinas num cadáver (enquadrada na entomotoxicologia forense, adiante descrita) também são contribuições da entomologia forense para a resolução de crimes.

Apesar da importância da entomologia forense na resolução de crimes, existem poucos entomologistas forenses em Portugal e não há registos da aplicação de dados entomológicos no auxílio da determinação do IPM mínimo. Sendo a entomologia forense uma ferramenta útil no auxílio da determinação do IPM mínimo, com as vantagens já referidas, o seu estudo e aplicação em Portugal constituem uma mais-valia para os peritos forenses.

## **1.2 Entomotoxicologia forense**

Para além da contribuição para a resolução de crimes acima descritas, os insetos também podem servir como importantes amostras alternativas para análises toxicológicas quando não é possível ou quando não estão disponíveis amostras humanas [32, 33, 37, 86]. É o caso de restos esqueletizados onde já não existem tecidos nem fluidos aos quais se

possam realizar exames toxicológicos [29, 32, 33], sendo esta uma das mais importantes aplicações da entomotoxicologia forense [33].

A entomotoxicologia forense é uma componente recente da entomologia forense que aplica métodos analíticos da toxicologia a insetos de interesse forense, com o propósito de identificar compostos químicos presentes em tecidos. É utilizada também para investigar os efeitos causados por esses compostos no desenvolvimento desses insetos, aumentando assim a precisão na estimativa do IPM mínimo com base no desenvolvimento das formas imaturas de insetos necrófagos [6, 32, 33]. A entomotoxicologia forense pode contribuir, também, para a determinação da causa e forma de morte [29, 32, 33].

Os compostos químicos ingeridos por um indivíduo antes da sua morte, podem afetar a taxa de desenvolvimento e o metabolismo de insetos de interesse forense, que colonizam o cadáver [29, 32, 33]. Apesar de se observar estas alterações na taxa de desenvolvimento não se conhece as vias de metabolização, bioacumulação e excreção dos insetos [32, 33]. Inclusivamente, intoxicações provocadas por alguns compostos poderão induzir diferenças nos tempos de colonização, pois o composto poderá exercer alterações no cadáver que o tornem menos atrativo para as espécies colonizadoras [32, 61]. Estes efeitos criam dificuldades na estimativa do IPM mínimo.

Como tal, o conhecimento dos efeitos de compostos químicos no desenvolvimento das formas imaturas das espécies de interesse forense pode contribuir para melhorar a compreensão dos fatores que podem interferir e/ou gerar erros relativamente à estimativa do IPM [33].

Mesmo que se determine a quantidade do composto nas formas imaturas não se deve correlacionar com os valores que se poderiam encontrar no cadáver do qual as larvas se alimentaram, pois não se sabe as alterações que o composto sofreu nas larvas nem se o tecido do qual a larva se alimentou era um órgão alvo do composto [87]. Existem alguns estudos realizados sobre o efeito de diversas substâncias na espécie *Calliphora vicina*, nomeadamente com morfina [37, 42], cocaína e bezoilecgonina [88], amitriptilina, temazepam, trazadona e trimipramina [39], barbitúricos e analgésicos [89], benzodiazepinas [90], nordiazepam e oxazepam [91], paracetamol [92] e metilfenidato [93], quer para estudo do desenvolvimento da larva sob ação do composto [91, 92], quer para quantificação do composto [37, 39, 42, 88-91, 93]. O trabalho de Bushby [93] menciona que as larvas foram obtidas duma população selvagem em Dunedin, Nova Zelândia, enquanto os restantes trabalhos não mencionam o local de captura das moscas utilizadas.

Na pesquisa bibliográfica efetuada não foi possível encontrar qualquer estudo sobre o efeito da fluoxetina no desenvolvimento de *Calliphora vicina* na Europa, tornando este trabalho pioneiro nesta área.

### **1.3 Calliphora vicina**

A espécie estudada neste trabalho foi a mosca *Calliphora vicina*, pertencente ao filo Arthropoda, que se caracteriza por ter animais com patas articuladas, corpo segmentado e um exosqueleto quitinoso [94-96], do qual se conhecem 1 242 040 espécies (aproximadamente 80% das espécies animais) sendo 27 745 fósseis [97]. Entre os artrópodes, esta espécie insere-se na classe Insecta, que se caracteriza por ter animais com três pares de patas, dois pares de asas e o corpo dividido em três regiões distintas (cabeça, tórax e abdómen) [31, 94, 96, 98] e da qual se conhecem 1 020 007 espécies (aproximadamente 82% dos artrópodes) das quais 6 182 são fósseis [97]. Os insetos são encontrados em quase todos os habitats [29].

*Calliphora vicina* pertence à ordem Diptera por ter um único par de asas funcional (o anterior), sendo o outro par modificado para formar balanceiros ou halteres que auxiliam o processo de voo [9, 94, 96, 98], possuindo peças bucais adaptadas para sugar [9, 94, 98]. À ordem Diptera pertencem 157 424 espécies conhecidas (das quais 3 817 fósseis) [97]. As suas larvas são vermiformes, não possuindo patas verdadeiras [53, 94, 99].

*Calliphora vicina* pertence à família Calliphoridae, sendo esta uma família de elevada importância para os estudos de entomologia forense nomeadamente na estimativa do IPM [9, 30, 99]. Esta família contém 97 géneros, nos quais se distribuem 1 525 espécies descritas [97] e está amplamente distribuída geograficamente [9, 99]. A maioria desenvolve-se em matéria orgânica em decomposição, enquanto outras espécies são parasitas de vertebrados (miíase) [9, 65, 99] e várias desenvolvem-se noutros artrópodes [9].

Várias espécies de Calliphoridae são atraídas por cadáveres [11], sendo, normalmente, as primeiras moscas a chegar aos mesmos [30, 65, 100], atraídas pelo odor produzido durante a decomposição [100], podendo chegar meros minutos após o início da decomposição [9, 20, 50, 100]. Por essa razão são das espécies que melhor indicam o IPM mínimo [6, 7, 9, 56, 65, 68].

### **1.3.1 Ciclo de vida da *Calliphora vicina***

*Calliphora vicina* possui um tipo de desenvolvimento que consiste numa metamorfose completa, isto é, possui fases de larva e pupa que diferem em aparência e hábitos do adulto [94, 96, 98, 101]. Este tipo de desenvolvimento inclui ovo, larva, pupa e adulto [96, 98].

As fêmeas de Calliphoridae têm um olfato excelente e são persistentes e hábeis na procura do local ideal para a oviposição [9]. Quando uma mosca fêmea é fecundada, esta procura uma fonte de proteínas para iniciar a postura ou oviposição [23]. As moscas fêmeas não realizam a postura em tecidos desidratados ou mumificados, pois os ovos e as larvas necessitam de humidade para o seu desenvolvimento [29, 102]. Desde que exista acesso a um cadáver, os adultos alimentam-se de qualquer secreção, incluindo sangue, e as fêmeas fecundadas realizam a oviposição rapidamente no cadáver [23, 67]. Daí resultam até centenas de ovos [9, 103], brancos, alongados e com 1,7 mm de comprimento, aproximadamente [9]. Em caso de temperaturas acima de 15°C os ovos eclodem em 24 horas [23, 67]. Assim que nascem, as larvas tentam penetrar nos tecidos por orifícios naturais ou não naturais (feridas) [9], começando a alimentarem-se logo que eclodem [23]. Essas larvas são vorazes e crescem rapidamente [53, 104] passando por duas mudas [65, 105, 106], que consistem na libertação da exúvia (exosqueleto do estágio anterior) [96] e das peças bucais. O processo é chamado de *ecdysis* [65]. Desta forma, passarão por três estádios larvares ou *instars*, o primeiro quando nascem, o segundo depois da primeira muda e o terceiro depois da segunda muda [96, 103, 107]. Os sucessivos estádios larvares são caracterizados, respetivamente, pela presença de uma, duas e três fendas respiratórias nos espiráculos posteriores [9, 107] e por diferenças na morfologia das peças bucais [30].

Devido ao facto do exosqueleto das larvas apenas ser flexível de forma moderada, para aumentarem de tamanho enquanto se estão a desenvolver, necessitam de realizar as mudas [53, 65].

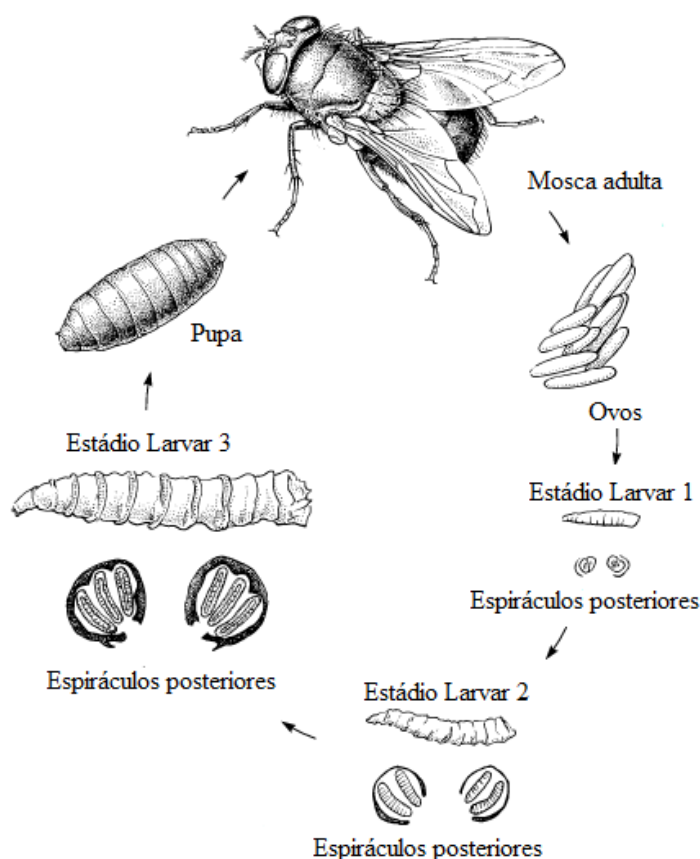
Quando as larvas estão no estágio 3 pode ocorrer a formação de massas larvares que podem aumentar em até 20°C [56] ou 22°C [7] a temperatura do cadáver/substrato de alimentação das mesmas, devido à sua atividade metabólica enquanto se alimentam [56].

Atingindo o crescimento máximo chegam a um estágio de desenvolvimento denominado de *postfeeding*, no qual deixam de se alimentar e começam a migrar para longe da fonte de alimento [9, 65, 67, 103, 107], procurando um local adequado para

pupar, normalmente a 5–8 cm de profundidade e a até seis metros de distância da fonte de alimento [9, 107]. Usualmente tentam ficar enterradas e aí iniciam a fase de pupa. A formação da pupa consiste no encurtamento, enrijecimento e escurecimento da coloração do exosqueleto. Na fase de pupa produzem-se alterações internas para formação duma mosca adulta (metamorfose) [9, 53, 103]. Durante a fase de pupa pode ocorrer o fenómeno denominado de diapausa, em que, caso ocorra diminuição de temperatura, humidade, luminosidade ou teor de oxigénio, a pupa suspende o seu desenvolvimento mantendo-se num estado de animação suspensa [9]. Quando chega ao final do desenvolvimento, de dentro da pupa emerge um jovem adulto, de tonalidade clara. A mosca adulta pode ser também denominada de imago [103]. A emergência do adulto depende da dilatação com líquido do *ptilinum*, localizado na cabeça, que rompe o pupário e através de expansões e contrações do *ptilinum* as moscas deslocam-se até à superfície. Demora cerca de meia hora até a extensão das asas estar completa e uma hora e meia até adquirir a coloração normal [9, 107]. As moscas *Calliphora* adultas começam a oviposição 4-5 dias após a saída da pupário, à temperatura de 24°C [9].

Na figura 1 pode observar-se o ciclo de vida duma mosca da família Calliphoridae, exemplificativa do ciclo de *Calliphora vicina*.





**Figura 1:** Ciclo de vida duma mosca da família Calliphoridae (*Chrysomya megacephala*) (adaptado de [7]).

Foram realizados vários ensaios por parte de diversos investigadores de forma a obterem a taxa de desenvolvimento de *Calliphora vicina*, sintetizados na tabela 1.

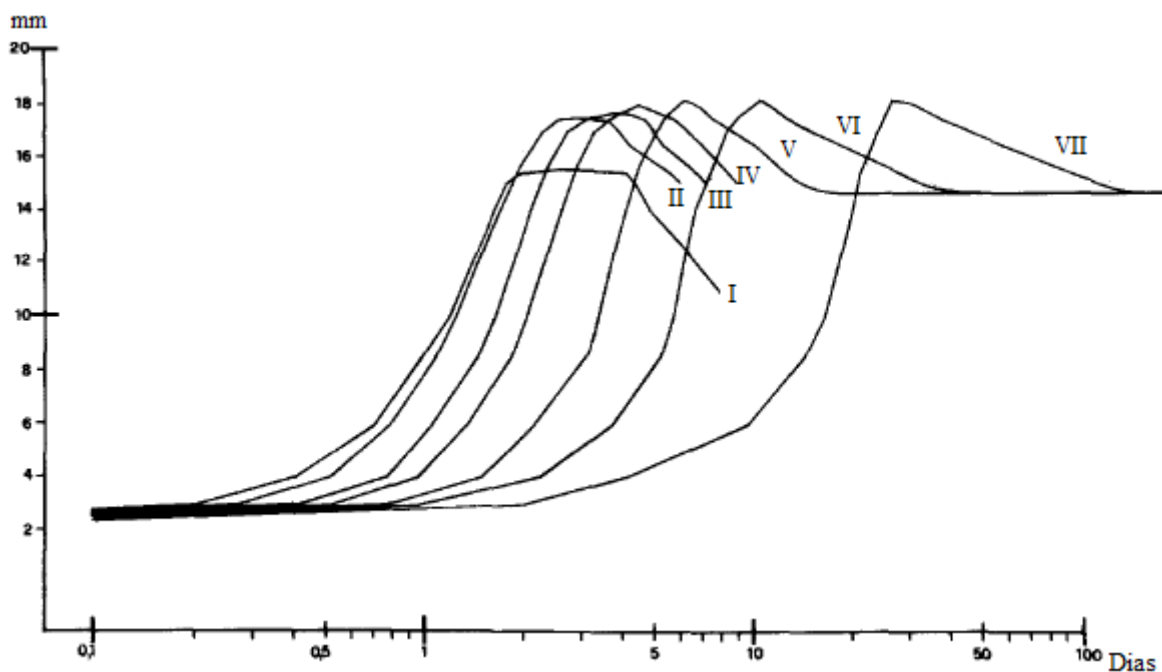
**Tabela 1:** Duração de desenvolvimento de *Calliphora vicina* a diversas temperaturas. EL - Estádio Larvar; Ref. - Referência.

Temperatura	Ovo	EL 1	EL 2	EL 3	Pré-Pupa	Pupa	Total	Ref.
19°C	19,0 h	22,0 h	23,0 h	65,0 h	118,0 h	336,0 h		[23]
20°C	24,7 h	17,9 h	44,1 h	123,4 h		328,0 h		[72]
20,6°C		22,5–36,0 h	(57,0–57,0 h)	(84,0–93,5 h)	(155,5–165,5 h)	(213,0–233,0 h)		[108]
23,3°C		(21,0–29,5 h)	(45,0–52,0 h)	(77,0–85,0 h)	(146,0–173,0 h)	(202,0–279,0 h)		[108]
25°C	14,4 h	9,6 h	24,0 h	158,4 h				[11]
25°C	14,0 h	18,0 h	19,0 h	26,0 h	122,0 h	261,0 h		[23]
26,7°C	24,0 h (20,0–28,0 h)	24,0 h (18,0–34,0 h)	20,0 h (16,0–28,0 h)	48,0 h (30,0–68,0 h)	128,0 h (72,0–290,0 h)	11,0 dias (9,0–15,0 dias)	18,0 dias (14,0–25,0 dias)	[105]

Um estudo do ciclo de vida de *Calliphora vicina* realizado por Reiter [21] em condições que imitavam as observadas na natureza demonstrou que:

- ❖ A duração entre a postura e a eclosão aumenta com a diminuição da temperatura;
- ❖ O crescimento larvar é lento a temperaturas baixas;
- ❖ O crescimento larvar máximo é atingido mais cedo a temperaturas mais altas;
- ❖ Todas as larvas sob qualquer temperatura sofrem uma diminuição de tamanho após atingirem o tamanho máximo, sendo esta diminuição mais rápida a temperaturas mais altas;
- ❖ Temperaturas constantes acima de 30°C levam à formação de larvas atrofiadas que não pupam e acabam por morrer;
- ❖ Temperaturas constantes abaixo de 16°C, depois de ser atingido o pico de crescimento, levam à suspensão da formação da pupa, causando um estado de descanso que é interrompido somente quando a temperatura é aumentada além do valor referido.

Com base nos gráficos obtidos por Reiter [21] pode-se saber o tempo que as larvas demoram a desenvolverem-se desde a postura até à formação de pupa em diferentes temperaturas (figura 2).



**Figura 2:** Desenvolvimento de larvas de *C. vicina* a temperaturas constantes. I = 35°C, II = 30°C, III= 22–23°C, IV= 18–19°C, V= 14–16°C, VI = 10–12°C, VII = 6,5°C (adaptado de [21]).

Outras características reportadas em vários trabalhos incluem:

- ❖ Diferenças geográficas nos limites de tolerância térmica de *Calliphora vicina* [7, 67].
- ❖ Alterações na duração de desenvolvimento do díptero dependentes da temperatura [67, 109]. Temperaturas flutuantes induzem um desenvolvimento de *Calliphora vicina* mais longo do que em larvas sujeitas a temperaturas constantes [109].
- ❖ Inibição da atividade de *Calliphora vicina* pela escuridão, chuva e por temperaturas muito baixas (abaixo de 10-12°C [16, 56, 110, 111]) ou muito altas (acima de 30°C [16, 56]), embora alguns estudos tenham reportado que pode estar ativa durante a noite [112, 113] e até realizar a oviposição a temperaturas inferiores a 10–12°C, mas não em escuridão total [113].
- ❖ Variações no crescimento larvar dependentes do substrato utilizado para a criação das mesmas. O mesmo acontece em condições naturais. O desenvolvimento das larvas vai apresentar variações dependendo do órgão do cadáver do qual se alimentam, podendo existir diferenças de até dois dias [114].

### **1.3.2 Características físicas das larvas e dos adultos de *Calliphora vicina* e distinção de outras espécies**

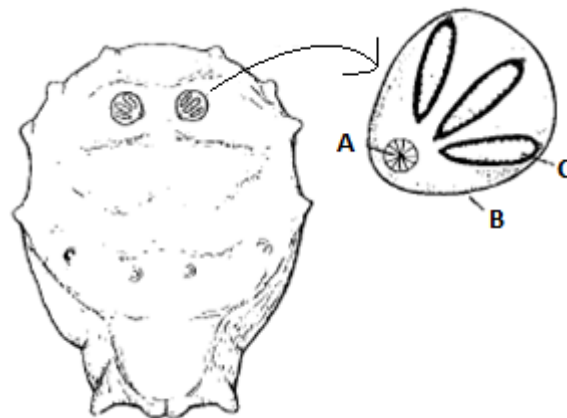
As larvas da família Calliphoridae caracterizam-se por não possuírem cabeça diferenciada, não possuírem patas e apresentarem as peças bucais visíveis, sendo estas em forma de gancho [9, 115]. O seu corpo é cilíndrico, com a porção anterior a estreitar gradualmente até acabar nas peças bucais, e a porção posterior terminando abruptamente em forma truncada ou arredondada [116]. O corpo é constituído por 12 segmentos [107, 116]. Os espiráculos posteriores encontram-se no último segmento e cada espiráculo possui um número de fendas de acordo com o estágio de desenvolvimento em que a larva se encontra [9, 106, 116]. Estes encontram-se rodeados por lobos anais que formam pequenas protuberâncias [9]. As fendas respiratórias são longas e posicionadas em ângulos agudos, sendo as fendas direitas [9].

A respiração das larvas processa-se através dos espiráculos posteriores e, depois da primeira muda, aparecem dois espiráculos anteriores [53, 116].

Uma forma de distinção das larvas de *Calliphora vicina* de larvas de *Musca domestica* (família Muscidae) é a presença de fendas respiratórias sinuosas nos espiráculos posteriores das larvas da *Musca domestica* [9, 116].

Para se diferenciar de outras espécies, incluindo *Sarcophaga spp.* pode também observar-se o peritreme [9, 116] (anel esclerótico que rodeia os espiráculos [101]). Em *Calliphora vicina* este é fechado e o botão é bem visível no terceiro estágio larvar (figura 3) [9, 116]. Também se pode observar a posição dos espiráculos posteriores, que em *Calliphora vicina* estão à superfície do corpo e nas moscas da família Sarcophagidae estão afundados [116].

Como forma de distinção de *Calliphora vomitoria* observa-se a distância entre os espiráculos posteriores e o tamanho dos mesmos. Em *Calliphora vicina* os espiráculos são menores (0,23–0,28 mm) e encontram-se a uma distância igual ou superior à largura de um espiráculo e em *C. vomitoria* são maiores (0,33–0,38 mm) e encontram-se a uma distância menor que a largura de um espiráculo [9]. Outra forma de distinção entre estas duas espécies pode ser realizada através da observação das espículas dos segmentos torácicos. Na *C. vicina* as espículas são pequenas e encontram-se dispostas em pequenas filas, na *C. vomitoria* são maiores e encontram-se dispostas separadamente [117].

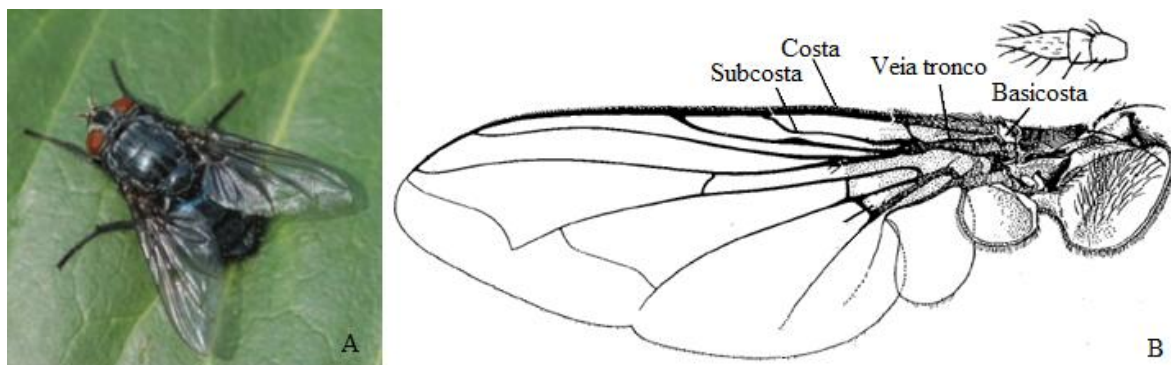


**Figura 3:** Vista posterior de larva de *Calliphora* com os espiráculos posteriores visíveis. **A** - botão; **B** - peritreme; **C** - fenda respiratória. (adaptado de [9]).

No estado adulto, as *Calliphora vicina* são moscas grandes, com 10–14 mm de comprimento [99]. O espiráculo torácico anterior é cor de laranja, a cabeça é negra com a porção frontal da gena (porção da cabeça situada entre o olho e as peças bucais) de tonalidade laranja ou amarela avermelhada [99, 118], possuindo pelos negros nas genas [118].

A epicutícula do tórax é negra a azul esverdeado escuro (figura 4A). Está recoberta por pelos finos e um pó acinzentado, conferindo-lhe uma aparência azul acinzentada ou

prateada esverdeada [99]. O tórax possui riscas longitudinais levemente mais escuras, entre as bases das asas. O abdómen é azul metálico, normalmente com coloração azul escura a negra nas margens posteriores dos tergitos abdominais, ou com um padrão prateado [99] que produz um efeito axadrezado [118]. As patas são negras e o corpo é peludo [99]. A nervura basicosta é de tonalidade amarela a acastanhada [118] (ver figura 4B para localização de basicosta).



**Figura 4:** A - Exemplo adulto de *Calliphora vicina* (adaptado de [31]); B - Asa de *Calliphora vicina* (adaptado de [9]).

*Calliphora vicina* é uma espécie distribuída pela região holártica, que seguiu o Homem para a América do Sul e a Região Afrotropical, a parte norte da Índia, a Austrália e a Nova Zelândia [9], sendo moscas comumente encontradas em zonas urbanas [9, 99] e que apresentam preferência por zonas sombrias [9, 56, 99].

Os adultos são atraídos por fezes, carne e fruta podre [9, 99] e as larvas desenvolvem-se em carne podre, sendo portanto necrófagas [9].

No inverno são observadas apenas em dias de sol, pois não voam a temperaturas abaixo de 12°C [19, 56], o que dificulta, se não impossibilita, a copulação e oviposição. São capazes de passar longos períodos numa forma de hibernação e emergirem da pupa assim que as temperaturas se tornem mais propícias (acima de 5°C) [119].

As *C. vicina* estão inativas durante a noite [19, 111], mas, nalguns estudos realizados, ocorreu a postura de ovos por parte de moscas durante a noite, quer por existência de luminosidade artificial ou pela temperatura não ser muito baixa [57], visto que as moscas a baixas temperaturas não realizam a postura [111, 120, 121].

*Calliphora vomitoria* é uma mosca muito semelhante a *C. vicina*, distinguindo-se pela tonalidade negra das genas [31] e da nervura basicosta [106], a predominância em zonas rurais [9] e o ciclo de vida mais longo [9, 105].

#### **1.4 Fluoxetina**

No final da década de 1960, testes clínicos reportaram baixas concentrações de serotonina (5-hidroxitriptamina, ou 5-HT) e do seu metabolito ácido 5-hidroxiindoloacético (5-HIAA) no rombencéfalo de indivíduos com depressão que praticaram suicídio, comparativamente com mortes por outras etiologias [122-129]. Com esses estudos clínicos evidenciou-se o papel da 5-HT na depressão [126, 130] e a hipótese de que o aumento da neurotransmissão da 5-HT, pela inibição da sua recaptção, seria um mecanismo viável para mediar a resposta antidepressiva [130-132]. Baseados nesta hipótese, os investigadores Bryan Molloy e Robert Rathburn iniciaram estudos para sintetizar agentes que inibissem a recaptção da 5-HT da junção sináptica [133]. Contudo, não descobriram um composto que inibisse seletivamente a 5-HT [133].

Em 1972 o grupo de Jong-Sin Horng reportou que o oxalato de fluoxetina seria um inibidor potente e seletivo da recaptção de 5-HT [131, 134, 135].

O inibidor seletivo de recaptção de serotonina, fluoxetina, foi descrito pela primeira vez na literatura científica como Lilly 110140 (na forma de cloridrato de fluoxetina), no número de 15 de agosto de 1974 da revista *Life Sciences* [131]. Teve a sua ação antidepressiva comprovada pela primeira vez no ano de 1979 [130]. Este fármaco foi aprovado para o tratamento da depressão na Bélgica no ano de 1986 [130] e pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos em 1987 [130, 132]. Após investigação clínica, a fluoxetina foi também indicada em 1994 para o tratamento de comportamento obsessivo-compulsivo e bulimia [132].

A fluoxetina é um dos antidepressivos mais prescritos no mundo [136, 137] e inclusivamente em Portugal [138]. É comercializado na forma de cloridrato de fluoxetina, e comercialmente conhecido como Prozac® [139-141].

Após o início da distribuição da fluoxetina pelos laboratórios Eli Lilly, sob a denominação Prozac®, esta também começou a ser comercializada por outros laboratórios, sob outras denominações, entre elas Digassim® e Selectus® (também comercializados em Portugal), e também sob a forma de genéricos [141]. A autorização de comercialização de Prozac® em Portugal foi concedida a 9 de agosto de 1989 [141].

Em Portugal, durante o ano de 2011, foram vendidas 777 425 embalagens de medicamentos com a substância ativa fluoxetina, ocupando esta substância o 39 ° lugar na

tabela dos 100 medicamentos mais prescritos em Portugal, elaborada anualmente pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. [138].

É normalmente administrada oralmente por cápsulas (20 mg/cápsula) ou solução oral (4mg/ml) [141].

A dose recomendada varia consoante o tipo de patologia a tratar [142]:

- ❖ Depressão: 20 mg por dia;
- ❖ Bulimia nervosa: 60 mg por dia;
- ❖ Perturbação obsessivo-compulsiva: 20 mg por dia.

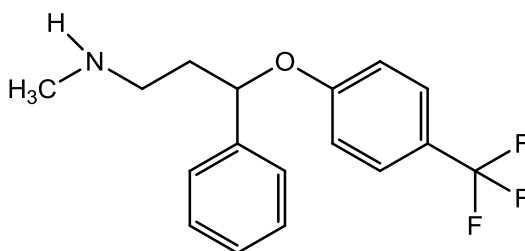
A dosagem pode ser ajustada consoante a necessidade do paciente de forma a assegurar que este toma a dose eficaz mais baixa, sendo a dose máxima recomendada de 60 mg por dia [142].

A fluoxetina para além de ser indicada nas patologias supracitadas, também o é no tratamento de anorexia, obesidade, síndromas pré-menstruais, ataques de pânico, narcolepsia, cleptomania e neuropatia diabética [139].

Trata-se de um fármaco de uso hospitalar e de uso ambulatorio, sendo necessária a apresentação dum prescrição médica válida para que possa ser adquirido, pois segundo o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto, é uma medicação que se enquadra nos medicamentos sujeitos a receita médica [141, 143].

#### **1.4.1 Estrutura e propriedades físico-químicas**

A fluoxetina, cuja denominação química é (±)-*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propano-1-amina [144], possui a fórmula química  $C_{17}H_{18}F_3NO$  (figura 5) [139, 140]. O seu peso molecular é 309,3 g/mol [144] e na forma de cloridrato de fluoxetina o seu peso molecular é de 345,8 g/mol [140].



**Figura 5:** Estrutura química de fluoxetina.

Trata-se dum composto em pó cristalino branco ou quase branco, com moderada solubilidade em água e diclorometano, e muito solúvel em metanol [140].

É utilizada comercialmente sob a forma dum mistura racémica, possuindo na sua constituição os enantiómeros R- e S- em quantidades iguais [136, 140].

## **1.4.2 Propriedades farmacodinâmicas**

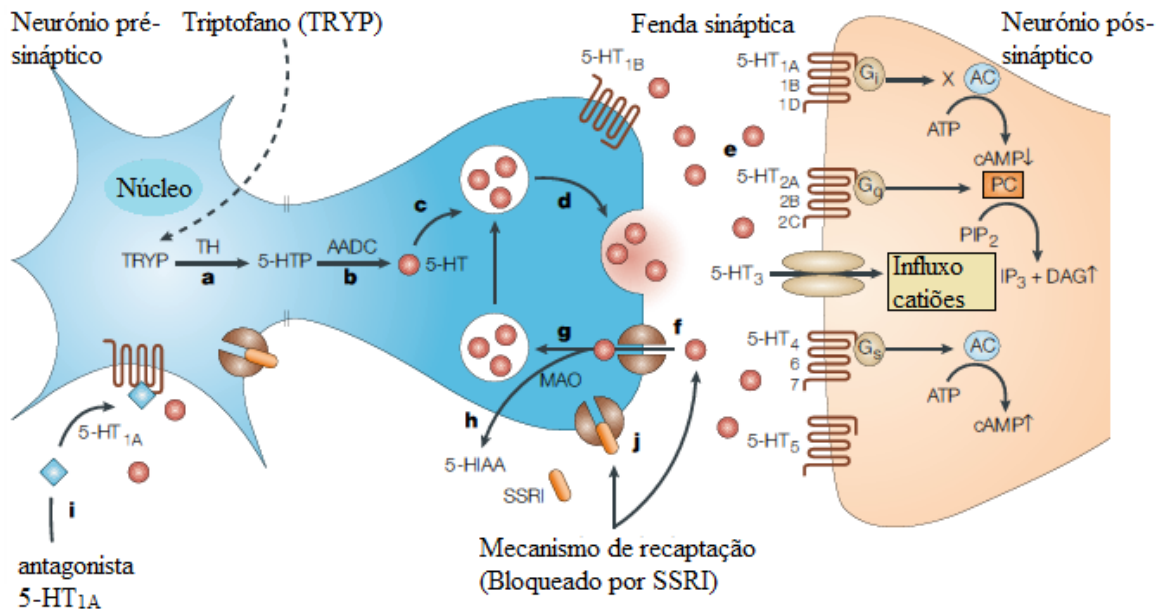
### **1.4.2.1 Mecanismo de ação**

A fluoxetina tem a capacidade de inibir seletivamente a proteína responsável pela recaptação de serotonina pelo neurónio pré-sináptico, o que aumenta a quantidade de serotonina disponível na sinapse levando a um aumento global da neurotransmissão serotoninérgica no sistema nervoso central [130, 132]. Esta molécula apresenta baixa afinidade de ligação aos recetores 5-HT<sub>2A</sub> de serotonina, aos recetores de acetilcolina muscarínicos, recetores de dopamina D<sub>2</sub>,  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenorreceptores [145, 146].

Existem sete classes de recetores de serotonina, que compreendem subrecetores [147-149]. Estes recetores mediam várias funções não relacionadas com o humor, entre elas, o sono, o apetite, a função sexual, e sintomas como a dor, náuseas, depressão e ansiedade [147, 148].

Os processos associados com a neurotransmissão da serotonina estão representados na figura 6.





**Figura 6:** Esquema dos processos associados com a neurotransmissão serotoninérgica. **a** - a triptofano hidroxilase (TH) catalisa a conversão de triptofano (TRYP) em 5-hidroxitriptofano (5-HTP); **b** - a descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC) catalisa a conversão de 5-HTP a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina); **c** - 5-HT é acumulada em vesículas de armazenamento; **d** - a 5-HT é libertada a partir das vesículas de armazenamento para o espaço sináptico; **e** - a 5-HT pode ativar subtipos de famílias de recetores de 5-HT (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), que ligam com o respetivo sistema de transdução de sinais no interior do neurónio pós-sináptico; **f** - 5-HT é recolhida nos terminais pré-sinápticos de 5-HT pelo transportador de 5-HT; **g-h** - dentro dos terminais pré-sinápticos a 5-HT ou seria absorvida pelas vesículas de armazenamento ou degradada pela monoamina oxidase (MAO); **i** - 5-HT ativa o autorreceptor pré-sináptico somatodendríático 5-HT<sub>1A</sub>, que pode ser bloqueado por antagonistas seletivos de 5-HT<sub>1A</sub>; **j** - inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRI), incluindo a fluoxetina inibem o transportador de 5-HT. 5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético; AC - adenilato ciclase; DAG - diacilglicerol, IP<sub>3</sub> - inositol 1,4,5-trifosfato; PIP<sub>2</sub> - fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (adaptado de [130]).

#### 1.4.2.2 Efeitos farmacodinâmicos

A interação entre os inibidores de captação e os recetores de neurotransmissores pode produzir efeitos adversos indesejáveis que complicam a terapia antidepressiva [150]. Com o aumento da inibição da recaptação da 5-HT, maior concentração deste neurotransmissor está disponível para interagir com qualquer um dos recetores e

subreceptores da 5-HT. Como tal, a maioria dos efeitos adversos estão relacionados com a dose administrada e podem ser atribuídos a efeitos serotoninérgicos pelo aumento de serotonina [148].

A utilização prolongada da fluoxetina induz efeitos adversos em vários sistemas do organismo, dos quais se destacam os seguintes [140, 148, 151]:

- ❖ Sistema gastrointestinal: boca seca, náuseas, vômitos, dispepsia, obstipação, diarreia, perda de peso e anorexia;
- ❖ Sistema neurológico: ansiedade, inquietação, nervosismo, insónia, tonturas, cansaço, dores de cabeça, tremores, convulsões, alucinações, confusão, agitação, despersonalização, mania e ataques de pânico;
- ❖ Sistema reprodutor: disfunção sexual;
- ❖ Sistema cutâneo: suor excessivo, prurido, erupções cutâneas, alopecia, fotossensibilidade, urticária e angioedema.

Para além dos efeitos nos sistemas acima referidos estão descritos também hiponatremia [140, 148, 152, 153], hiperprolactinémia, galactorreia, alterações nos níveis de glicose sanguínea, artralgia, hipotensão ortostática, bocejos, retenção urinária, visão anormal (visão turva, midríase), função hepática anormal, distúrbios hemorrágicos (equimoses, púrpura, e outros efeitos no sangue), efeitos extrapiramidais, reações anafiláticas [140] e mialgia [140, 148]. À administração de fluoxetina está também associada a ideação de suicídio [140]. Tal como outros antidepressivos, a utilização da fluoxetina merece a vigilância cuidada dos pacientes, pois são pessoas que se encontram em estado psicológico frágil e como tal são suscetíveis de ideação e tentativa de suicídio [154]. Este efeito pode ocorrer em crianças e adultos e no tratamento de outras doenças para além da depressão [140, 155].

A síndrome serotoninérgica pode ocorrer em casos de dosagem terapêutica [139], intoxicação por fluoxetina [140], pela associação de duas ou mais substâncias serotoninérgicas [156, 157] ou pela troca de medicação sem respeitar o período de interrupção [140]. Esta síndrome caracteriza-se pelo excesso de atividade serotoninérgica nos receptores [140, 158], resultando nas seguintes alterações clínicas [149, 156-158]:

- ❖ Sistema cognitivo: hipomania, alucinações, delírios, agitação, confusão, coma, ansiedade e inquietação;
- ❖ Sistema nervoso autónomo: calafrios, midríase, diaforese, sudorese, febre, hipertensão, taquicardia, náuseas e diarreia;
- ❖ Sistema somático: mioclonia, hiperreflexia, tremores e descoordenação.

Alguns efeitos adicionais da síndrome serotoninérgica são insónias, prurido, acatisia e urticária [149, 157, 158]. Podem surgir complicações agudas, entre elas, rabdomiólise, acidose metabólica, mioglobínúria, falência respiratória, falência renal, falência hepática, convulsões e coagulação vascular disseminada [140, 149, 158]. Nestes casos a medicação que provoca a síndrome é retirada e pode ser administrada, por exemplo, ciproheptadina [140, 149, 158, 159] ou metisergida [140, 158] para atenuar os sintomas.

Em caso de sobredosagem por fluoxetina está descrita a ocorrência de náuseas, vômitos, disfunção cardiovascular, convulsões, diminuição de consciência, taquicardia, sonolência, tremores, náuseas, vômitos e inclusivamente morte [140]. Não existindo antídoto específico para a intoxicação por fluoxetina [139], a monitorização da sobredosagem envolve terapia sintomática e suporte apropriado até ao desaparecimento dos sintomas. Se a dose ingerida exceder os 500 mg em adultos, 5 mg/Kg em crianças e no intervalo de uma hora, pode ser considerada a administração de carvão ativado [139, 140], apesar dos benefícios serem incertos [140]. Está descrito que a diálise, hemoperfusão, transfusão e diurese forçada não produzem efeitos eficazes [139, 140].

A toxicidade aumenta bastante quando os SSRI são tomados conjuntamente com álcool ou outros fármacos [140].

Recentemente a fluoxetina também tem sido associada a síndrome de descontinuação [139, 140], caracterizado por perturbações neurológicas e gástricas, tais como tonturas, náuseas, letargia e dores de cabeça, dormência, formigueiro, distúrbios gastrointestinais (vômitos), suores excessivos, ansiedade e distúrbios do sono. Assim sendo, é recomendada a diminuição da dosagem até ao término de tratamento para evitar estes efeitos [139].

### **1.4.3 Toxicocinética**

#### **1.4.3.1 Absorção**

Após a administração oral, a fluoxetina é rapidamente e quase completamente absorvida gastrointestinalmente [139, 140, 145, 160], atingindo o pico de absorção em 6 a 8 h, que não é alterado pela alimentação [139, 140].

Devido à metabolização hepática de primeira passagem, a biodisponibilidade oral é abaixo de 90% [145, 160].

### **1.4.3.2 Distribuição**

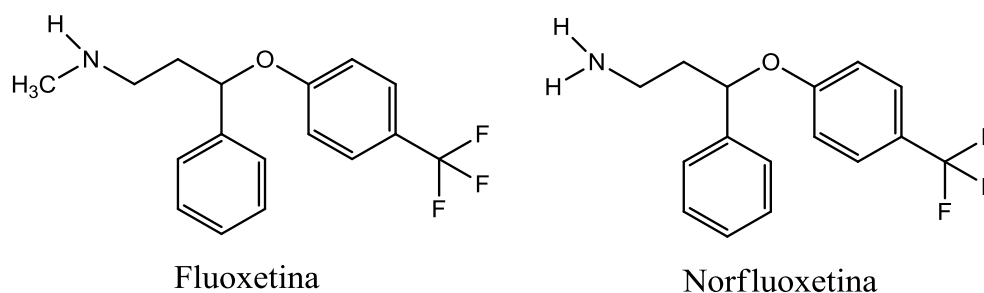
Tal como outros compostos lipofílicos, a fluoxetina tem um volume de distribuição ( $V_d$ ) elevado, entre 14 e 100 L/Kg, o que indica uma acumulação rápida e extensiva nos tecidos. O  $V_d$  da fluoxetina é o mais elevado de entre os SSRI [160]. Isto sugere uma distribuição substancial por todos os tecidos e fluidos [161], com cerca de 95% de fluoxetina ligada a proteínas plasmáticas [140, 162]. A acumulação é elevada no pulmão, que é um órgão rico em lisossomas. O *trapping* lisossomal é considerado importante para valores elevados de  $V_d$  [163, 164]. Apesar do elevado  $V_d$ , a acumulação no cérebro é menor do que a verificada para outros SSRI, sendo este facto demonstrado em estudos *in vitro* [164] e *in vivo* [165]. O *ratio* cérebro : sangue de fluoxetina em pacientes é de 2,6 : 1 [162, 165, 166].

A fluoxetina exhibe cinética não linear, indicada por um aumento desproporcional na concentração sanguínea após aumento de dosagem [167]. Em ensaios com ratos, a biodisponibilidade aumenta com a dose, apontando para um metabolismo de primeira passagem saturável [168]. Após a administração de doses diárias, as concentrações plasmáticas alcançam valores estáveis em quatro semanas [162].

Tanto a fluoxetina como o seu metabolito ativo, a norfluoxetina, são distribuídas no leite materno e são detetadas em bebés nascidos de mães que se encontravam medicadas com o antidepressivo [140, 169, 170].

### **1.4.3.3 Metabolismo**

A fluoxetina é essencialmente metabolizada no fígado [139, 171] levando à formação do seu metabolito primário ativo, a norfluoxetina (figura 7), entre outros [167].

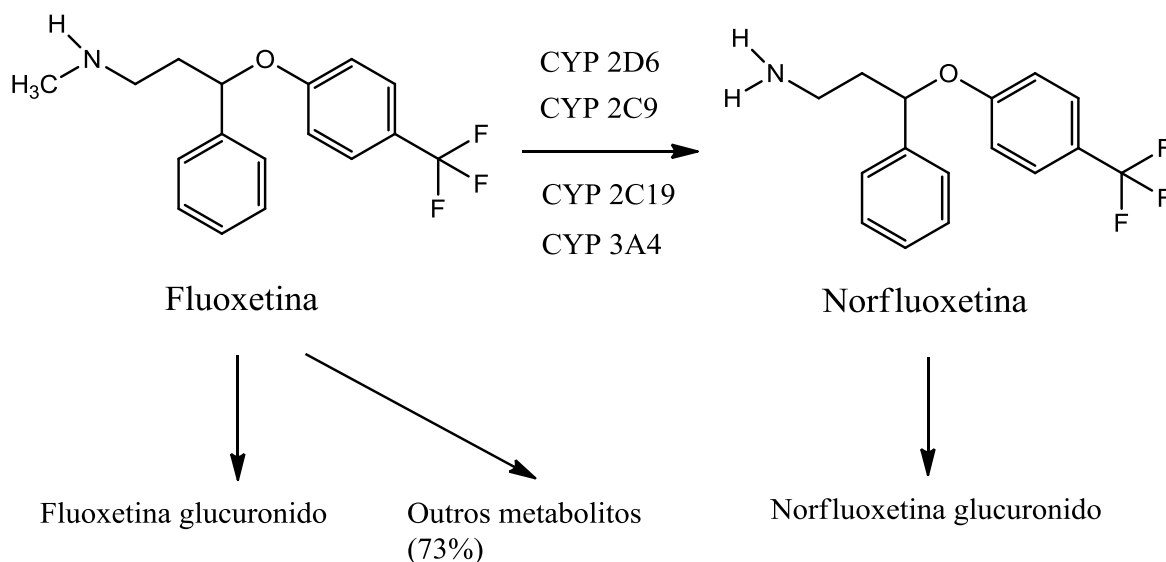


**Figura 7:** Estrutura química de fluoxetina e metabolito ativo norfluoxetina.

A fluoxetina tem um tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) de 1 a 4 dias [136, 139, 167, 172]. No caso do seu metabolito, a norfluoxetina, o  $t_{1/2}$  corresponde a 7 a 15 dias [136, 139, 167, 172]. O pico de concentração de fluoxetina no plasma ocorre 4 a 8 horas [173] ou 6 a 8 horas após a administração [140]. A inibição da captação de 5-HT pela fluoxetina em animais ocorre em poucos minutos após a administração [131, 134, 174]. Em humanos a inibição da captação pode acontecer desde minutos a horas após a administração, todavia a sua ação antidepressiva inicia-se apenas após algumas semanas [175].

A fluoxetina é utilizada sob a forma duma mistura racémica de R- e S-enantiómeros em quantidades iguais [136, 140]. O S-enantiómero da fluoxetina é aproximadamente 1,5 vezes mais potente na inibição da captação de 5-HT do que o R-enantiómero [136]. A diferença farmacológica entre enantiómeros é mais pronunciada no metabolito ativo norfluoxetina, sendo o S-enantiómero aproximadamente 20 vezes mais potente na inibição do que o R-enantiómero [140, 176, 177]. A S-norfluoxetina é tão ativa quanto o composto que lhe deu origem e a R-norfluoxetina menos ativa [140]. Em termos de concentrações, a norfluoxetina encontra-se presente na circulação em doses mais elevadas do que o composto que lhe deu origem [176-178], sendo a concentração de S-norfluoxetina maior do que a de R-norfluoxetina [178].

Estudos *in vitro* [179-183] e *in vivo* [184-190] demonstraram que o metabolismo da fluoxetina e norfluoxetina é catabolizado, pelo menos em parte, pelas isoenzimas citocromo (CYP) P450, principalmente pelas CYP2D6 e CYP2C9, moderadamente pela CYP2C19 e pouco pela CYP3A4 (figura 8) [167, 191-193].



**Figura 8:** Metabolismo da fluoxetina e isoenzimas CYP.

A atividade da CYP2D6 vai desde a completa deficiência em pobres metabolizadores até metabolismo ultra rápido, devido à ocorrência dum grande número de variantes alélicas do gene CYP2D6. Estas variantes alélicas podem induzir uma atividade enzimática diminuída, aumentada ou até mesmo ausente [194, 195].

#### **1.4.3.3.1 Interação com outros compostos**

A fluoxetina, tal como acontece com outros fármacos, sofre interações, por uma variedade de mecanismos, com outros compostos [140, 196].

Estão descritas várias interações farmacológicas, nomeadamente com:

- ❖ Antidepressivos (antidepressivos tricíclicos, SSRI, inibidor da recaptção de noradrenalina e serotonina) [167, 193];
- ❖ Antipsicóticos ou neurolépticos (risperidona, perfenazina, haloperidol, tioridazina, flufenazina) [140, 167, 193];
- ❖ Antiarrítmicos (quinidina) [140, 193];
- ❖ Anti-inflamatórios não esteróides [140];
- ❖ Anti-hipertensores (metoprolol) [140, 193];
- ❖ Anticonvulsionantes e antiepiléticos (carbamazepina, fenitoína, valproato) [140, 167, 197];
- ❖ Anticoagulantes (varfarina) [140, 197];

- ❖ Anti-histamínicos (cisapride, terfenadina, astemizol) [140, 197];
- ❖ Antibacterianos (claritromicina, linezolida) [140, 197];
- ❖ Antivirais (ritonavir, efavirenz) [140, 197];
- ❖ Antitumorais (tamoxifen) [140, 193];
- ❖ Analgésicos opióides (tramadol, oxicodona, petidina, codeína) [140];
- ❖ Ansiolíticos (trazadona, buspirona, benzodiazepinas) [167, 193];
- ❖ Antiparkinsonianos (benzatropina) [193].

De forma a prevenir a existência de interações após o término da medicação com a fluoxetina, o intervalo para a mudança de terapia deve ser de pelo menos cinco semanas, devido ao longo  $t_{1/2}$  da fluoxetina [140].

#### **1.4.3.4 Eliminação**

Aproximadamente 65% do composto é excretado na urina e 15% nas fezes [139]. Cerca de 10% do composto é excretado inalterado ou como fluoxetina N-glucuronido [198] e 10 % como norfluoxetina [139]. Tanto a fluoxetina como a norfluoxetina sofrem a conjugação antes da excreção [139], sendo a S-fluoxetina eliminada mais lentamente que a R-fluoxetina [140].

#### **1.5 Definição e justificação dos objetivos**

Os principais objetivos deste estudo foram:

- ❖ Caracterizar a duração das diferentes fases do ciclo de vida da mosca *Calliphora vicina*;
- ❖ Observar a influência da fluoxetina no crescimento de larvas da espécie *Calliphora vicina*, nomeadamente no seu tamanho, peso e GHA.

A determinação do IPM é essencial para a resolução de crimes. Para o efeito pode-se recorrer à entomologia forense. A espécie *Calliphora vicina* é uma das primeiras a chegar ao cadáver, sendo atraída pelos odores libertados durante a decomposição e colonizando-o rapidamente. Por esta razão esta foi a espécie alvo deste estudo.

Neste trabalho utilizou-se o fármaco fluoxetina que possui propriedades antidepressivas e é um dos medicamentos desta classe mais utilizado em Portugal. Os

pacientes deprimidos que tomam fluoxetina, devido à sua fragilidade psicológica, são suscetíveis de ideação e tentativa de suicídio. Como tal, para a estimativa mais precisa do IPM mínimo em casos de intoxicação com fluoxetina, é de extrema importância perceber as alterações que ocorrem no crescimento da *Calliphora vicina* sob a influência deste fármaco.

## **1.6 Estrutura da tese**

Esta dissertação divide-se em oito capítulos. O primeiro, designado **Introdução**, consiste num enquadramento teórico em que se faz uma abordagem à entomologia forense e entomotoxicologia forense. Também neste capítulo se caracteriza a espécie *Calliphora vicina*, e o fármaco fluoxetina, utilizados neste trabalho. No segundo capítulo são descritos os **Materiais e Métodos** utilizados na fase experimental deste trabalho. Este capítulo inclui o fundamento teórico das técnicas utilizadas e a descrição dos procedimentos experimentais efetuados. Os **Resultados** são apresentados num terceiro capítulo, onde os dados obtidos são apresentados. A **Discussão de Resultados** é apresentada no quarto capítulo onde se analisam e discutem os dados obtidos. O quinto capítulo consiste nas **Conclusões**, onde se expõem as conclusões do trabalho. O sexto capítulo consiste em **Perspetivas Futuras**, onde se expõem novas investigações que possam ser realizadas, tendo por base este estudo. Por último são apresentadas as **Referências Bibliográficas** que sustentaram o desenvolvimento do presente trabalho.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nas instalações do Instituto Superior de Ciências da Saúde, CESPU, que se encontra localizado em Gandra, no concelho de Paredes (figura 9), com as coordenadas geográficas de 41° 10' 52,16" N, 8° 26' 44,19" W, e com uma elevação aproximada de 145 metros acima do nível do mar (dados obtidos do Google Earth®).



**Figura 9:** Localização do local de captura de moscas (adaptado de Google Earth®).

A espécie selecionada para a análise da influência do fármaco fluoxetina no desenvolvimento larvar foi a mosca *Calliphora vicina* por ser uma das espécies que primeiro colonizam os cadáveres, tratando-se por isso de uma mosca de referência para o cálculo de IPM mínimo. As moscas foram colhidas nas proximidades das instalações recorrendo-se a armadilhas.

O animal utilizado para alimentar as larvas foi o porco, devido às suas semelhanças com o corpo humano [6, 31, 51, 53, 199]. O tecido corporal selecionado foi o músculo pelo seu fácil acesso e manipulação, tendo sido adquirido no hipermercado Continente de Valongo. O músculo de porco utilizado foi triturado, de forma a facilitar a distribuição homogénea do fármaco.

A fluoxetina foi adquirida à Sigma®, na forma de cloridrato de fluoxetina, semelhante à formulação comercializada para consumo terapêutico humano. A fluoxetina foi dissolvida em cloreto de sódio (NaCl) 0,9%.

## **2.1 Armadilhas de recolha**

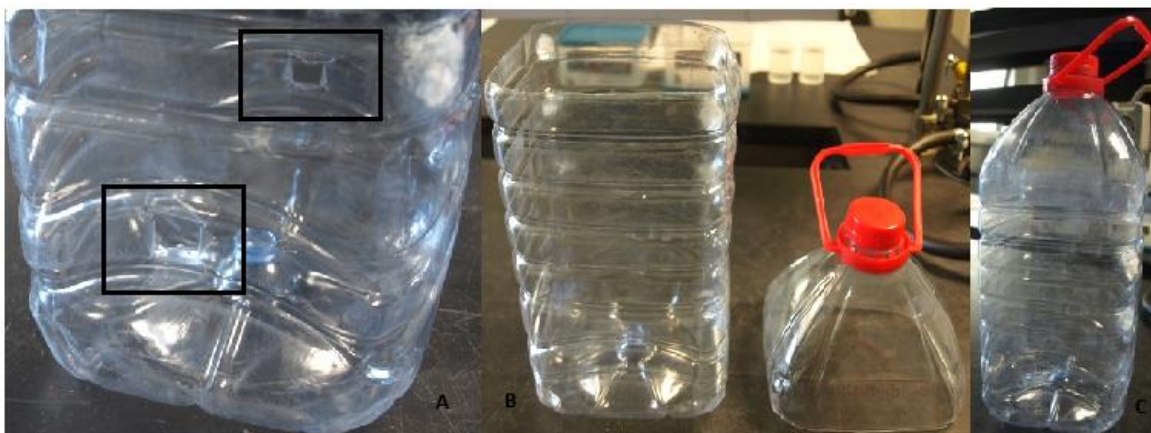
As armadilhas foram construídas a partir de garrações de plástico (figura 10) conforme se descreve de seguida:

1. Fizeram-se orifícios em cruz em três lados do garrafão, empurrando-se as arestas para dentro (figura 11A);
2. Cortou-se e separou-se a porção superior do garrafão (figura 11B);
3. Colocou-se o isco (carne de porco, salmão, sardinha, carapau, peixe-espada, tripas de choco e de peixe) no garrafão;
4. Recolocou-se a porção superior no garrafão com recurso a fita-cola (figura 11C);

As armadilhas foram colocadas ao ar livre penduradas num local alto, de forma a não serem perturbadas por vertebrados, e protegidas da chuva e sol direto, visto as moscas *Calliphora vicina* preferirem locais com sombra [9, 31, 56].



**Figura 10:** Material utilizado para a elaboração de armadilhas exteriores.



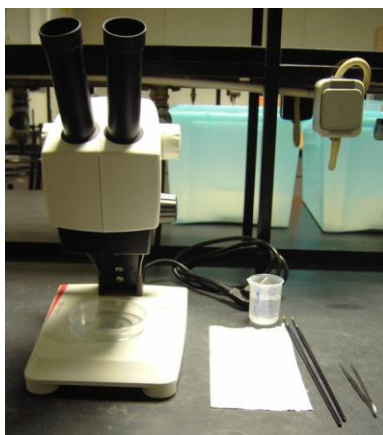
**Figura 11:** Armadilha exterior. **A** - orifícios em cruz com as arestas voltadas para dentro; **B** - garrafão com porção superior removida; **C** - armadilha exterior montada.

## 2.2 Descrição dos locais de trabalho

Cada local de trabalho continha o seu material específico evitando-se assim trocas de material e possíveis contaminações.

O local de observação à lupa (figura 12) continha:

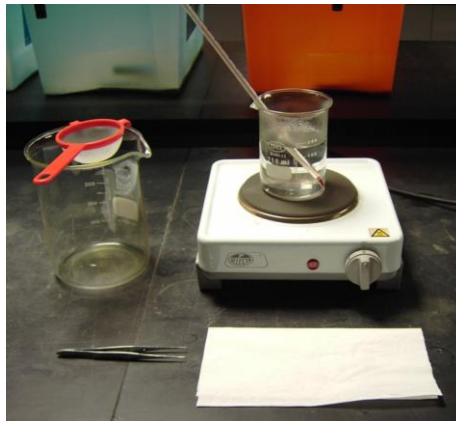
- ❖ Lupa binocular Leica®;
- ❖ Pincéis;
- ❖ Gobelés com água limpa;
- ❖ Placas de Petri (para visualização das larvas).



**Figura 12:** Local de observação à lupa.

O local de morte das larvas por água quente (figura 13) continha:

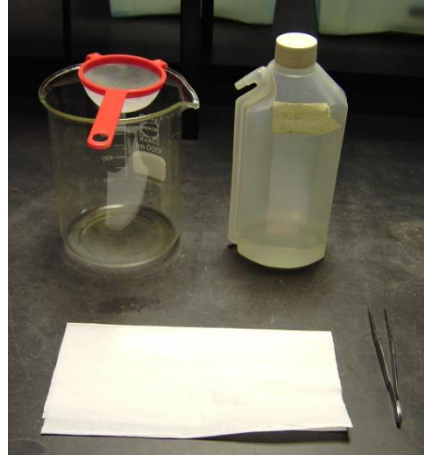
- ❖ Placa quente;
- ❖ Pincéis;
- ❖ Gobelés de vidro;
- ❖ Termómetro;
- ❖ Coador;
- ❖ Pinças.



**Figura 13:** Local de morte das larvas por água quente.

O local de morte das larvas por congelação (figura 14) continha:

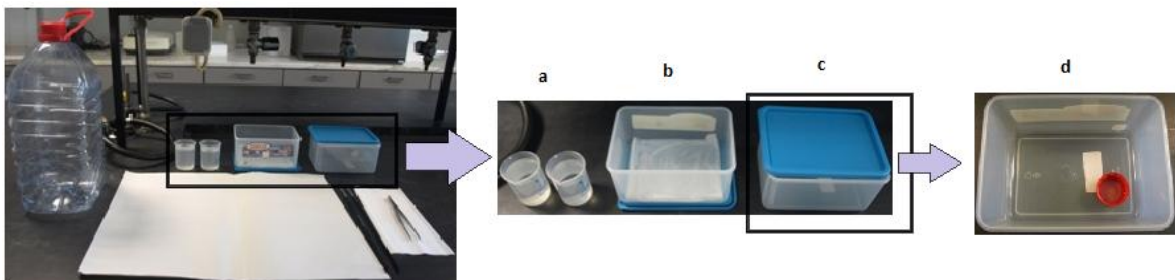
- ❖ Pincéis;
- ❖ Folhas de papel absorvente;
- ❖ Coador;
- ❖ Recipiente com água destilada;
- ❖ Gobelés de vidro;
- ❖ Pinças.



**Figura 14:** Local de morte das larvas por congelação.

O local de recolha de moscas das armadilhas e ovos dos recipientes (figura 15) continha:

- ❖ Pincéis;
- ❖ Gobelés de plástico (com água limpa para limpar as moscas e molhar os pincéis para colheita de ovos);
- ❖ Recipientes para colocar moscas. No interior destes foi colocado um pedaço de carne ou um recipiente com água açucarada;
- ❖ Recipiente com um pedaço de papel húmido no fundo para colocar ovos;
- ❖ Recipientes com álcool a 70% (para recolha de moscas *Calliphora vicina*).



**Figura 15:** Local de recolha de moscas das armadilhas e de ovos dos recipientes. **a** - gobelés com água limpa; **b** - recipiente com papel húmido no fundo para colocar ovos; **c** - recipiente para colocar moscas; **d** - recipiente para colocar moscas com recipiente com água açucarada.

Neste local também se procedeu à colocação dos ovos nos recipientes para a realização dos ensaios.

## **2.3 Métodos**

### **2.3.1 Criação de larvas de *Calliphora vicina***

Foram penduradas armadilhas exteriores, como as descritas na secção 2.1, contendo pedaços de peixe e carne, num local alto, de forma a evitar o acesso por parte de outros animais.

### **2.3.2 Avaliação do efeito da fluoxetina no desenvolvimento de larvas de *Calliphora vicina***

Neste estudo começou por se utilizar fígado como alimento para as larvas, pois este órgão é o principal local de metabolização de fluoxetina. Contudo, este provou ser um meio de alimentação de difícil manipulação e incorporação do composto.

Para ultrapassar esta dificuldade, utilizou-se músculo de porco como meio de alimentação das larvas.

A criação larvar foi exposta a seis concentrações diferentes de fluoxetina. Como em ensaios preliminares apenas se obtiveram resultados de relevância estatística no estágio *postfeeding*, optou-se por realizar a amostragem somente nesse estágio de desenvolvimento. O protocolo foi realizado consoante se descreve em seguida:

1. Prepararam-se as soluções de fluoxetina nas concentrações de 7,5, 15,0, 22,5, 30,0, 45,0 e 90,0 µg/g (num total de aproximadamente 5 g de carne) em 2 ml de NaCl a 0,9 %;
2. Homogeneizou-se a carne com a solução de fluoxetina. No controlo homogeneizou-se a carne com 2 ml de NaCl a 0,9 %. Colocou-se a carne nas respetivas placas de Petri devidamente identificadas (as larvas tiveram sempre alimento ao seu dispor a fim de evitar a sua migração antes do tempo, para procurar comida [31]);
3. Colocou-se a placa de Petri num recipiente com 1,5 cm de areia no fundo (para facilitar a migração e formação de pupas [31, 67]) e um recipiente com algodão humedecido (para evitar a desidratação da carne e das larvas [31]);
4. Colocaram-se aproximadamente 50 ovos de *Calliphora vicina* nas placas de Petri e cobriu-se o recipiente com um plástico transparente (não foi colocada tampa nos

recipientes de criação de larvas, mas sim uma película plástica para promover a troca de ar com o exterior e manter a humidade [31]);

5. Colocou-se o recipiente numa caixa com areia (para facilitar a migração e formação de pupas no fundo [31, 67]) e um termómetro na caixa;
6. Observou-se o desenvolvimento das larvas nos seguintes estádios: até à primeira muda; até à segunda muda e até ao início da migração. Colheram-se 20 larvas (10 para matar por congelação [86, 200], utilizadas para pesagem, e 10 para matar por água quente [31, 69], utilizadas para medição);
7. Observaram-se as larvas até final de migração.

Nos pontos seis e sete anotou-se as horas de cada estádio de desenvolvimento das larvas. Foi respeitado, dentro dos possíveis, o período de dia e noite, para não afetar o crescimento das larvas de forma artificial, sendo mantidas num regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão [31].

Os recipientes foram dispostos nas caixas como o observado na figura 16.



**Figura 16:** Disposição do interior das caixas com cobertura plástica.

### **2.3.3 Morte das larvas**

❖ Por água quente:

1. Colocou-se um gobelé de vidro com água na placa quente até atingir a temperatura de ebulição (100°C);
2. Removeu-se o gobelé da placa quente, deixando-se arrefecer até 96°C, o que foi verificado com recurso a um termómetro [9];

3. Colocaram-se 10 larvas no gobelé durante 30 segundos [30, 31, 69];
4. Crivaram-se as larvas e colocaram-se num recipiente com álcool a 96%, devidamente etiquetado [30];
5. Mediram-se as larvas com o auxílio de um paquímetro (figura 17).

❖ Por congelação:

1. Colocaram-se 10 larvas num recipiente e lavaram-se as mesmas com água destilada;
2. Crivaram-se e secaram-se cuidadosamente as larvas com papel absorvente;
3. Armazenaram-se as larvas num recipiente etiquetado e colocaram-se no congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
4. Pesaram-se as larvas numa balança analítica (figura 17).



**Figura 17:** Balança e paquímetro.

## 2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o *software* GraphPad Prism 6®, com recurso ao método não paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* Bonferroni. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

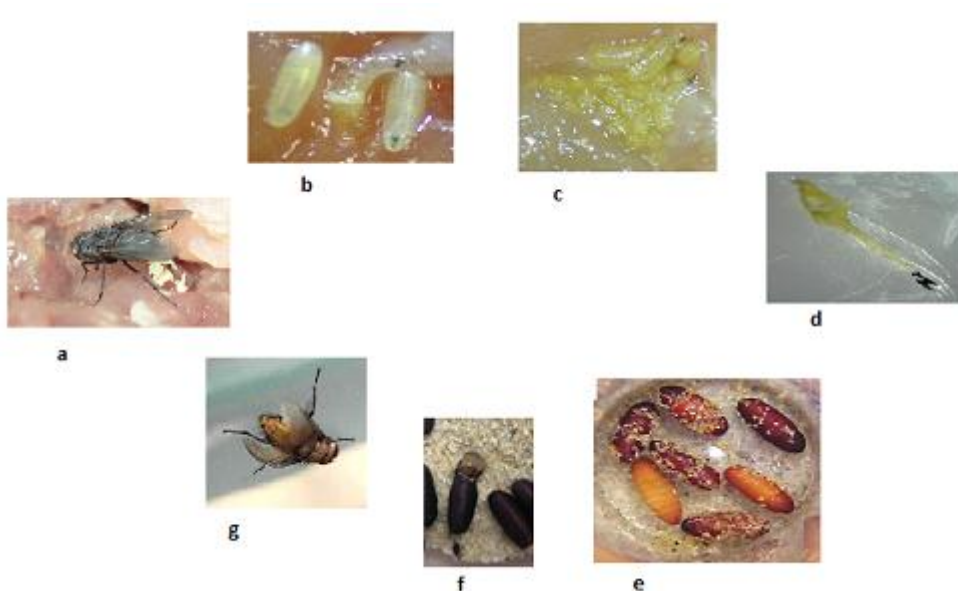


### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação do efeito da fluoxetina no desenvolvimento de larvas de *Calliphora vicina*

Com as experiências realizadas numa fase preliminar observou-se que as alterações de crescimento ocorreram no início do estágio *postfeeding*. Como tal a amostragem foi realizada nesse estágio de desenvolvimento.

Com esses estudos preliminares foi possível compreender melhor o ciclo de vida da mosca *Calliphora vicina*, como se pode observar na figura 18.



**Figura 18:** Ciclo de vida de *Calliphora vicina*. **a** - Fêmea adulta coloca ovos; **b** - ovos a eclodir; **c** - larvas em desenvolvimento e a alimentar-se; **d** - exúvia; **e** - larvas a pupar; **f** - moscas a emergir da pupa; **g** - mosca juvenil.

Devido a uma colonização acidental nos ensaios preliminares, por parte de moscas exteriores, pôde observar-se diferenças entre as larvas do nosso estudo, *Calliphora vicina*, e uma espécie diferente (figura 19).



**Figura 19:** Larvas (A - *Calliphora vicina*; B - espécie estranha ao ensaio) e pupas (C - *Calliphora vicina*; D - espécie estranha ao ensaio) observadas em ensaios preliminares.

Com os estudos preliminares observou-se que a mortalidade das larvas não foi afetada pela presença de diferentes concentrações de fluoxetina.

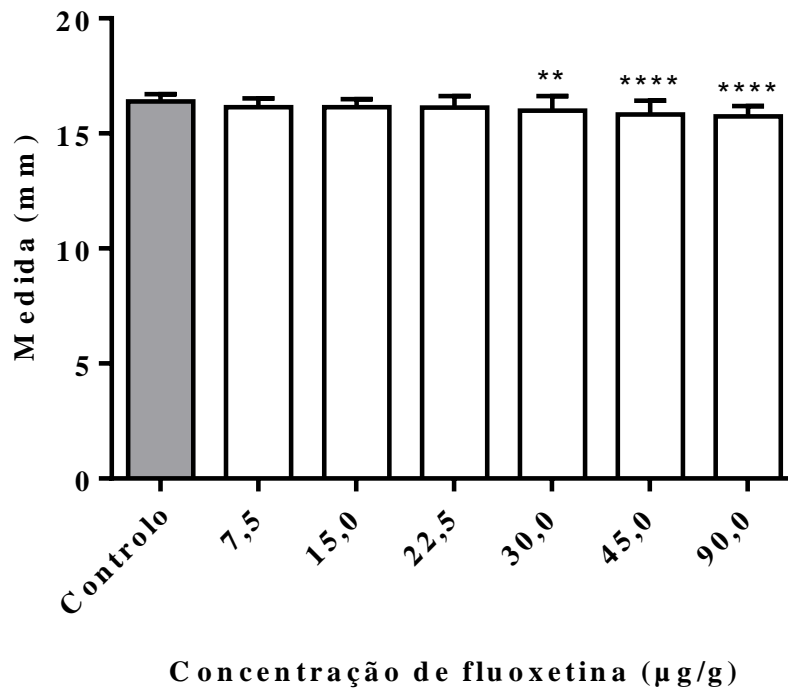
As temperaturas mínimas e máximas durante os ensaios em triplicado, em cada caixa, estão esquematizadas na tabela 2. A caixa 1 correspondeu ao controlo do ensaio e as caixas 2 a 7 corresponderam às dosagens de 7,5, 15,0, 22,5, 30,0, 45,0 e 90,0 µg/g, respetivamente.

**Tabela 2:** Temperaturas observadas nos ensaios.

	Controlo	7,5 µg/g	15,0 µg/g	22,5 µg/g	30,0 µg/g	45,0 µg/g	90,0 µg/g
<b>Ensaio 1</b>	24,0–27,0°C	24,0–27,0°C	24,5–27,0°C	25,0–27,0°C	25,0–27,0°C	25,0–27,0°C	25,0–27,0°C
<b>Ensaio 2</b>	24,0–27,0°C	24,0–26,5°C	24,5–27,0°C	25,0–27,0°C	25,0–27,0°C	25,5–27,0°C	25,5–27,0°C
<b>Ensaio 3</b>	24,0–27,0°C	24,0–26,5°C	24,5–27,0°C	25,0–27,0°C	25,0–27,0°C	25,5–27,0°C	25,5–27,0°C

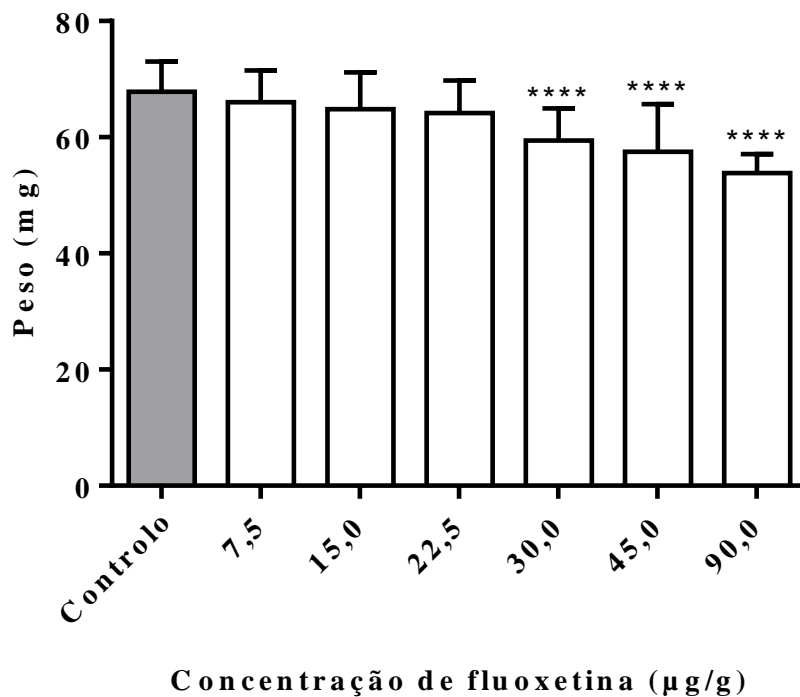
Os resultados de medições, pesagens e GHA das larvas no estágio de *postfeeding* (média dos três ensaios) encontram-se nas figuras 20 a 22.

De acordo com a figura 20, o tamanho das larvas variou de uma forma dependente da concentração de fluoxetina. A concentração mais alta de fluoxetina utilizada (90,0 µg/g) foi a que teve maior efeito, sendo a concentração que levou à maior diminuição de tamanho das larvas, apresentando estas um comprimento de  $15,7 \pm 0,5$  mm relativamente às larvas do controlo, que apresentaram um comprimento de  $16,4 \pm 0,3$  mm. A partir da concentração de fluoxetina 30,0 µg/g começaram a verificar-se alterações estatisticamente significativas no crescimento, nomeadamente no comprimento das larvas.



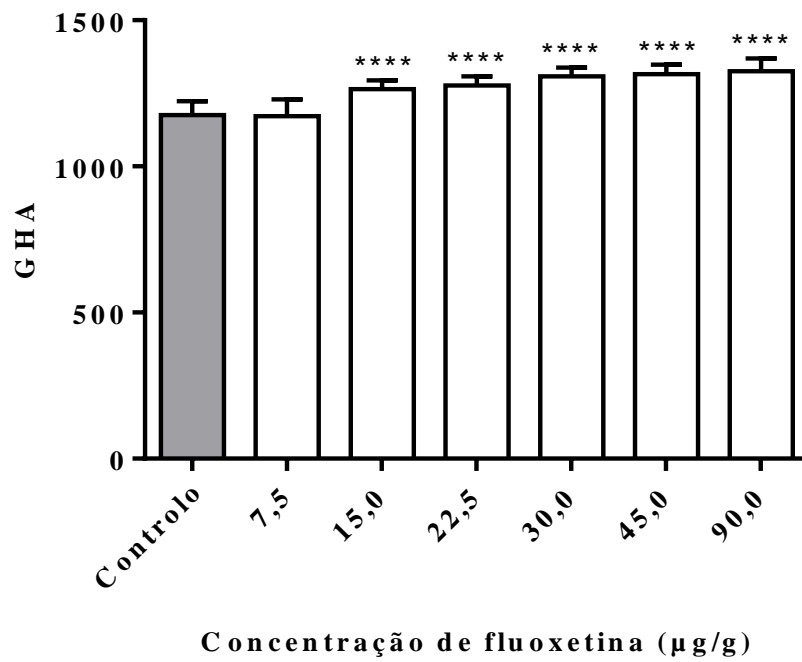
**Figura 20:** Comprimento das larvas no início do estágio *postfeeding* na presença e ausência (controlo) de fluoxetina (7,5–90,0 µg/g). Os resultados estão apresentados com a média  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , comparativamente ao controlo.

De acordo com a figura 21, o peso das larvas variou de uma forma dependente da concentração de fluoxetina. A concentração mais alta de fluoxetina utilizada (90,0 µg/g) foi a que teve maior efeito, sendo a concentração que levou à maior diminuição de peso das larvas, apresentando estas um peso de  $53,8 \pm 3,3$  mg relativamente às larvas do controlo, que apresentaram um peso de  $67,9 \pm 5,2$  mg. A partir da concentração de fluoxetina 30,0 µg/g verificaram-se alterações estatisticamente significativas no peso das larvas.



**Figura 21:** Peso das larvas no início do estágio *postfeeding* na presença e ausência (controlo) de fluoxetina (7,5–90,0 µg/g). Os resultados estão apresentados com a média  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , comparativamente ao controlo.

Tal como se verificou com o comprimento e o peso das larvas, também os GHA necessários ao desenvolvimento larvar sofreram alterações, como se pode observar pela figura 22, sendo essa uma variação dependente da concentração de fluoxetina. Tal como para os dois parâmetros anteriores, a concentração de fluoxetina na qual se observou maior efeito foi a mais alta utilizada (90,0 µg/g), sendo esta a que levou ao maior aumento da necessidade de GHA para o desenvolvimento das larvas. Estas apresentaram uma maior necessidade de GHA para desenvolvimento ( $1326 \pm 43$ ) relativamente às larvas do controlo (GHA de  $1175 \pm 49$ ). As alterações estatisticamente significativas no crescimento, nomeadamente na necessidade de GHA para desenvolvimento das larvas, começaram a verificar-se a partir da concentração de fluoxetina de 15,0 µg/g.



**Figura 22:** Graus-horas acumulados (GHA) necessários ao desenvolvimento das larvas no início do estágio *postfeeding* na presença e ausência (controlo) de fluoxetina (7,5–90,0 µg/g). Os resultados estão apresentados com a média ± SD (n ≥ 3). \*\*\*\* p < 0,0001, comparativamente ao controlo.

#### 4. DISCUSSÃO

A estimativa do IPM (intervalo de tempo desde a morte até à recuperação do cadáver [30, 68]) é uma das principais incumbências dos especialistas forenses convocados para a cena de crime. Apesar de existirem variados estudos nesta área, esta determinação ainda é complicada e deve ser observada com prudência [64]. Existem vários métodos para a obtenção do IPM, mas a maioria deles está dependente de diversos fatores que provocam alterações na taxa de decomposição de cadáveres [64]. Apesar de tudo, o IPM é fundamental para a resolução de crimes. Para o efeito, pode-se recorrer à entomologia forense. Como a colonização do cadáver ocorre pouco depois da morte, o cálculo do IPM recorrendo à entomologia pode ser uma aproximação muito precisa à data de morte [64].

Devido ao facto dos fármacos poderem afetar a taxa de crescimento e o metabolismo de insetos, a estimativa do IPM pode ser dificultada. Os resultados toxicológicos combinados com os dados entomológicos do local de crime e da autópsia, são essenciais para determinar a causa de morte e auxiliar na estimativa do IPM [29, 32, 33]. Desta forma, sugere-se a realização da análise toxicológica tanto no cadáver como nas amostras de larvas e pupários de insetos colhidos do e no cadáver, de várias localizações, de forma a diminuir erros na estimativa do IPM mínimo.

No caso do cadáver já se encontrar em estado avançado de decomposição, mumificação ou esqueletização, impossibilitando as análises toxicológicas diretas, as larvas provaram, em vários estudos, serem uma matriz excelente para a deteção de compostos [37, 88, 201]. A fluoxetina foi o fármaco selecionado para o trabalho devido ao facto de ser um dos antidepressivos mais utilizados no mundo [136, 137] e em Portugal [138] e pelo facto de poder causar ideação e tentativa de suicídio em pacientes em tratamento [140, 154]. Estes estados psicológicos podem também ocorrer em crianças e adultos durante o tratamento de outras doenças, para além da depressão [140, 155].

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que ocorrem alterações no desenvolvimento larvar de *Calliphora vicina* na presença de fluoxetina, concretamente no estágio de desenvolvimento larvar *postfeeding*, sendo as alterações dependentes da concentração deste fármaco. De referir que a fluoxetina não revelou, nas concentrações testadas, ser letal para as larvas. Em estudos preliminares verificaram-se alterações, não significativas, na primeira e segunda muda, quando o meio de alimentação das larvas continha fluoxetina nas concentrações de 7,5, 15,0 e 30,0 µg/g.

As alterações mais relevantes ocorreram no início do estágio *postfeeding*, isto é, nas larvas amostradas no início da migração. Neste estágio, o comprimento, o peso e os GHA necessários para o desenvolvimento das larvas de *Calliphora vicina* revelaram alterações significativas dependentes da concentração de fluoxetina. Assim, registou-se uma diminuição gradual de comprimento e peso e um aumento gradual nos GHA necessários ao desenvolvimento larvar com o aumento da concentração da fluoxetina. Estes dados sugerem que a adição de fluoxetina provoca um padrão de desenvolvimento mais lento do que o controlo resultando em larvas menores e com menos peso. O facto das maiores alterações se verificarem no início do estágio de desenvolvimento *postfeeding* poderá indicar bioacumulação de fluoxetina, como presumido em estudos anteriores [201]. Campobasso *et al.* [201] observaram que as larvas em alimentação ativa que tinham o meio de alimentação com antidepressivos apresentavam grandes concentrações desses compostos nos seus tecidos, atribuindo esses valores a bioacumulação.

Este facto pode indicar que a taxa de absorção de fluoxetina por parte das larvas excede a taxa de excreção da mesma, resultando no efeito de bioacumulação, não se sabendo, no entanto, exatamente como é processada a bioacumulação e a eliminação dos compostos químicos por parte das larvas ou como os compostos afetam o seu desenvolvimento [32, 39].

Os resultados obtidos neste trabalho indicam também que a presença de um composto exógeno como o analisado faz com que ocorram alterações importantes no padrão de desenvolvimento dos insetos que possam vir a ser utilizados em investigações forenses para calcular o IPM mínimo. Assim sendo, estes dados têm uma importante implicação na estimativa do IPM feita através de dados entomológicos nos casos forenses envolvendo fluoxetina. Isto porque, se um indivíduo ingeriu o fármaco antes da sua morte (acidental ou intencional), e tendo em conta o longo  $t_{1/2}$  da fluoxetina, esse composto ou os seus metabolitos estarão presentes no seu organismo e a probabilidade das larvas o ingerirem é elevada. Na estimativa do IPM em casos criminais até os minutos são importantes e neste estudo verificou-se uma diferença de várias horas entre o início do estágio larvar *postfeeding* do controlo relativamente à concentração mais alta de fluoxetina estudada.

Estão descritos na literatura trabalhos sobre o efeito de alguns compostos no desenvolvimento da mosca *Calliphora vicina*. Pien *et al* [91] estudaram o efeito de diferentes concentrações de nordiazepam e oxazepam no desenvolvimento de uma larva e pupário de *C. vicina*. Com o estudo pretenderam determinar a dinâmica da acumulação de

nordiazepam e do metabolito oxazepam numa larva e pupário, os efeitos desses compostos no crescimento da larva, nomeadamente no comprimento e peso e a sua influência nos padrões de desenvolvimento da larva. Estes investigadores observaram alterações no desenvolvimento larvar, nomeadamente no peso, com uma concentração de 1 µg/g de nordiazepam comparativamente com outras concentrações do estudo. Não observaram alterações no comprimento larvar em qualquer das concentrações testadas. Através das observações diárias, concluíram que ocorreu metabolização de nordiazepam e acumulação de nordiazepam e oxazepam nas larvas e que existiram alterações significativas no peso das mesmas. O'Brien e Turner [92] estudaram o efeito do paracetamol no desenvolvimento larvar da mosca *C. vicina* e concluíram que o composto influencia o desenvolvimento das larvas, existindo um desenvolvimento mais rápido nos dias 2-4 comparativamente ao grupo controlo. No estudo realizado por Sadler *et al.* [89] foi realizada a análise toxicológica a larvas cuja alimentação continha vários tipos de barbitúricos e analgésicos. Os autores concluíram que pode existir bioacumulação de alguns compostos, podendo esta ser dependente da dose utilizada, outros compostos podem ser ativamente excretados e, concluíram também, que os compostos detetados nas larvas apresentam menores concentrações do que nos meios de alimentação. Os autores afirmam que a ausência de deteção dum composto nas larvas não significa que o composto não esteja presente no meio de alimentação e que a extrapolação da concentração do composto no meio de alimentação para a concentração encontrada nas larvas pode ser difícil, se não impossível, sem existirem mais estudos. Isto indica que, apesar das larvas proporcionarem uma alternativa para análises toxicológicas, não possibilitam a extrapolação da quantificação do composto no cadáver através delas [32, 201].

Na literatura pesquisada não se encontraram registos de estudos de entomotoxicologia forense com a espécie *Calliphora vicina* realizados em Portugal. O único estudo encontrado na bibliografia com deteção de fluoxetina pertence a Traqui *et al.*, que realizou análises toxicológicas a larvas de varejeiras colhidas dum cadáver e detetou a presença de fluoxetina [202].

Um problema observado na utilização de taxas de desenvolvimento para a estimativa da idade da larva é que existem diferenças de desenvolvimento dentro da população e entre populações de diferentes localizações [3], existindo fortes evidências de que essas variações sejam genéticas [203, 204]. Daí que seja necessária a realização de estudos relativos ao desenvolvimento das várias espécies de artrópodes atraídas a cadáveres em cada país ou região de forma a se estimar com mais precisão o IPM mínimo,



tendo em consideração as diferenças que poderão existir nos GHA necessários para o desenvolvimento entre populações geograficamente diferentes duma mesma espécie [71].

Segundo estudos realizados, dependendo do tecido utilizado para alimentação das larvas, o desenvolvimento das mesmas também vai sofrer alterações [114]. Assim sendo, para determinação do IPM, o tecido a utilizar para criação em laboratório deverá ser o mesmo onde as larvas se estavam a alimentar no cadáver. Como tal, para além das alterações provocadas por fármacos, também se deve ter em conta as alterações de crescimento dependentes do tecido utilizado para crescimento das larvas.

O presente trabalho é pioneiro na área de entomotoxicologia forense e foi realizado na região de Gandra, no concelho de Paredes, com a utilização de *Calliphora vicina* e de fluoxetina.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho constituem um contributo importante para o conhecimento do grau de interferência da fluoxetina no desenvolvimento de formas imaturas de *Calliphora vicina*. Desta forma, podem-se minimizar os erros na estimativa do IPM, quando baseado no padrão de desenvolvimento desta mosca.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi descrito pela primeira vez, que diferentes concentrações de fluoxetina interferem no crescimento das larvas de *Calliphora vicina*. Apesar de não se conhecer o metabolismo da fluoxetina nas larvas, é possível concluir que o seu crescimento é alterado, nomeadamente no comprimento, peso e GHA necessários para as larvas atingirem o estágio *postfeeding* e iniciarem a migração. O comprimento e o peso das larvas diminuem com o aumento da concentração de fluoxetina. No que diz respeito aos GHA necessários ao desenvolvimento até ao estágio *postfeeding*, verificou-se que as larvas necessitam de mais GHA para iniciarem a migração quando são submetidas a concentrações maiores de fluoxetina.

Os resultados deste estudo são relevantes para a entomologia forense, visto que a alteração dos padrões normais de desenvolvimento dos insetos, devido à adição de fármacos na sua alimentação, pode induzir erros na estimativa do IPM mínimo.

## **6. PERSPETIVAS FUTURAS**

Este trabalho é pioneiro na área da entomotoxicologia forense pelo facto de se centrar numa substância cujos efeitos sobre o desenvolvimento larvar não haviam sido estudados, podendo ser complementado com a realização de métodos analíticos específicos e apropriados para a deteção de fluoxetina e dos seus metabolitos nas formas imaturas de *Calliphora vicina*. Seria interessante a realização dum estudo recorrendo-se a vários tecidos para o crescimento das larvas, de forma a perceber se as alterações provocadas pela fluoxetina são dependentes do tecido que alimentou as larvas.

De uma forma geral, é imperativo aumentar o conhecimento no âmbito da entomologia forense em Portugal, dado a escassez de informação nesta área, podendo a vertente entomotoxicológica do estudo do efeito de substâncias ser muito importante no contexto da entomologia forense no sul da Europa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hall RD, Huntington TE. Introduction: Perceptions and Status of Forensic Entomology. In: Byrd J, Castner J, editors. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2010.
2. Lord WD, Stevenson JR. Directory of Forensic Entomologists. 2 nd ed. Washington, D. C.: Defense Pest Management Information Analysis Center, Walter Reed Army Medical Center; 1986.
3. Hall RD. Medicocriminal entomology. In: Catts EP, Haskell NH, editors. Entomology and death: A procedural guide. Clemson, SC: Joyce`s Print Shop; 1990. p. 1-8.
4. Dix J, Graham M. Time of Death (Postmortem Interval) and Decomposition. In: Dix J, Graham M, editors. Time of death, decomposition and identification - an atlas. Boca Raton: CRC Press LLC; 1999.
5. Dix J. Time of death and decomposition. In: Dix J, editor. Color atlas of forensic pathology. Boca Raton, FL: CRC Press LLC; 2000.
6. Catts EP, Goff ML. Forensic Entomology in Criminal Investigations. Annual Review of Entomology. 1992;37(1):253-272.
7. Goff ML. A fly for the prosecution: how insect evidence helps solve crimes. Cambridge, Mass.: Harvard University Press; 2000.
8. Tz'u S. Hsi Yuan Chi Lu. Ann Arbor: Center for Chinese Studies, University of Michigan; 1981.
9. Smith KGV. A manual of forensic entomology. London: Trustees of the British Museum (Natural History); 1986.
10. Benecke M. A brief history of forensic entomology. Forensic Sci Int. 2001 Aug 15;120(1-2):2-14.
11. Greenberg B, Kunich JC. Entomology and the law - flies as forensic indicators. Cambridge, England: Cambridge University Press; 2002.
12. Bergeret M. Infanticide. Momification naturelle du cadavre. Découverte du cadavre d'un enfant nouveau-né dans une cheminée où il s'était momifié. Détermination de l'époque de la naissance par la présence de nymphes et de larves d'insectes dans le cadavre, et par l'étude de leurs métamorphoses. Ann Hyg Méd Lég. 1855;4:442-452.
13. Mégnin P. La Faune des Cadavres. Encyclopédie Scientifique des Aides-Memoires. Paris: Masson et Gauthier-Villars; 1894.

14. Leclerq J, Leclerq M. Données bionomiques pour *Calliphora erythrocephala* Meigen et cas d'application à de la médecine légale. Bulletin de la Société Entomologique de France. 1948;53:101-103.
15. Leclerq M. Entomologie et médecine légale; datation de la mort, observation inédite. Revue Medicale de Liege. 1983;38(19):735-738.
16. Nuorteva P. Studies on the significance of flies in the transmission of poliomyelitis. III. The composition of the blowfly fauna and the activity of the flies during epidemic season of poliomyelitis in South Finland. Ann Entomol Fenn. 1959;25:121-125.
17. Nuorteva P. The flying activity of blowflies (Diptera, Calliphoridae) in subarctic conditions. Ann Entomol Fenn. 1965;31:242-245.
18. Payne JA. A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus Scrofa* Linnaeus. Ecology. 1965 1965/09/01;46(5):592-602.
19. Nuorteva P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicator. In: Tedeschi CG, Eckert WG, Tedeschi LG, editors. Forensic Medicine, a study in trauma and environmental hazards. Philadelphia: Saunders; 1977. p. 1072-1095.
20. Erzinclioglu YZ. The application of entomology to forensic medicine. Med Sci Law. 1983 Jan;23(1):57-63.
21. Reiter RA. Zum Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeissefliege *Calliphora vicina*. Zeitschrift für Rechtsmedizin. 1984;91:295-308.
22. Catts EP, Haskell NH. Entomology and Death: A Procedural Guide. Clemson, South Carolina, USA: Joyce`s Print Shop Inc.; 1990.
23. Greenberg B. Flies as forensic indicators. Journal of Medical Entomology. 1991;28(5):565-577.
24. Haskell NH. Procedures in the entomology laboratory. In: Haskell NH, Catts EP, editors. Entomology and Death: A Procedural Guide. 2nd ed. Clemson, SC, USA: Joyce`s Print Shop Inc.; 1997. p. 1-183.
25. Benecke M. Six forensic entomology cases: description and commentary. J Forensic Sci. 1998 Jul;43(4):797-805.
26. Introna F, Jr., Campobasso CP, Di Fazio A. Three case studies in forensic entomology from southern Italy. J Forensic Sci. 1998 Jan;43(1):210-214.
27. Marchenko MI. Medicolegal relevance of Cadaver Entomofauna for the determination of the time of death. Forensic Sci Int. 2001;120:89-109.
28. Campobasso CP, Introna F. The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. Forensic Sci Int. 2001 Aug 15;120(1-2):132-139.

29. Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology. Naturwissenschaften. [Review article]. 2004 Feb;91(2):51-65.
30. Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall MJ. Best practice in forensic entomology--standards and guidelines. Int J Legal Med. 2007 Mar;121(2):90-104.
31. Byrd J, Castner J, editors. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2010.
32. Introna F, Campobasso CP, Goff ML. Entomotoxicology. Forensic Sci Int. 2001 Aug 15;120(1-2):42-47.
33. Goff ML, Lord WD. Entomotoxicology - Insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development. In: Byrd J, Castner J, editors. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC; 2010.
34. Beyer JC, Enos WF, Stajic M. Drug identification through analysis of maggots. J Forensic Sci. 1980;25(2):411-412.
35. Nuorteva P, Nuorteva SL. The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. Ambio. 1982;11(1):34-37.
36. Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. J Forensic Sci Soc. 1990;30:243-246.
37. Introna F, Lo Dico C, Caplan YH, Smialek JE. Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. J Forensic Sci. 1990;35:118-122.
38. Miller ML, Lord WD, Goff ML, Donnelly D, McDonough ET, Alexis JC. Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly pupariae (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. J Forensic Sci. 1994;39:1305-1313.
39. Sadler DW, Fuke C, Court F, Pounder DJ. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. Forensic Sci Int. 1995;71(3):191-197.
40. Goff ML, Miller ML, Paulson JD, Lord WD, Richards E, Omori AI. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. J Forensic Sci. 1997;42:276-280.
41. Sadler DW, Chuter G, Seneveratne C, Pounder DJ. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. J Forensic Sci. 1997;42(6):1214-1215.

42. Hedouin V, Bourel B, Becart A, Tournel G, Deveaux M, Goff ML, et al. Determination of drug levels in larvae of *Protophormia terraenovae* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. *J Forensic Sci.* 2001 Jan;46(1):12-14.
43. Pien K, Marichal M, Grootaert P, De Boeck G, Samyn N, Boonen T, et al. The detection of nordiazepam and its metabolite oxazepam in one single postfeeding larva and puparium of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) using the LC/MS-MS. *Int J Legal Med.* 2004:118.
44. Prado e Castro CB. Studies on sarcosaprophagous Diptera (Insecta) in Central Portugal: Application to Forensic Entomology. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; 2005.
45. Prado e Castro CB, García MD. First record of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) from Portugal. *Graellsia.* 2009;65(1):75-77.
46. Prado e Castro C, Arnaldos MI, García MD. Additions to the Calliphoridae (Diptera) fauna from Portugal, with description of new records. *Boletín Asociación española de Entomología* 2010;33(3-4):425-437.
47. Prado e Castro C, García MD. Additions to the Piophilidae (Diptera) fauna from Portugal, with new records. *Graellsia.* 2010;66(1):101-105.
48. Prado e Castro C, Cunha E, Serrano A, García MD. *Piophila megastigmata* (Diptera: Piophilidae): First records on human corpses. *Forensic Sci Int.* 2012 Jan 10;214(1-3):23-26.
49. Prado e Castro C, García MD, Arnaldos MI, González-Mora D. Sarcophagidae (Diptera) attracted to piglet carcasses including new records for Portuguese fauna. *Graellsia.* 2010;66(1):285-294.
50. Anderson GS, Vanlaerhoven SL. Initial studies on insect succession on carrion in southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Sciences.* 1996;41:617-625.
51. Garcia-Rojo AM. Estudio de la sucesión de insectos en cadáveres en Alcalá de Henares (Comunidad Autónoma de Madrid) utilizando cerdos domésticos como modelos animales. *Boln S E A.* 2004;34:263-269.
52. Voss SC, Forbes S, Dadour IR. Decomposition and insect succession on cadavers inside a vehicle environment. *Forensic Science Medicine and Pathology.* 2008;4:22-32.
53. Centeno N, Maldonado M, Oliva A. Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). *Forensic Sci Int.* 2002;126:63-70.

54. Dix J, Graham M. Time of death, decomposition and identification - an atlas. Dix J, editor. Boca Raton: CRC Press LLC; 1999.
55. Dix J. Color atlas of forensic pathology. Boca Raton, FL: CRC Press LLC; 2000.
56. Campobasso CP, Di Vella G, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci Int.* 2001 Aug 15;120(1-2):18-27.
57. Amendt J, Zehner R, Reckel F. The nocturnal oviposition behaviour of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Central Europe and its forensic implications. *Forensic Sci Int.* 2008 Feb 25;175(1):61-64.
58. Voss SC, Cook DF, Dadour IR. Decomposition and insect succession of clothed and unclothed carcasses in Western Australia. *Forensic Sci Int.* 2011;211(1-3):67-75.
59. Keh B. Scope and Applications of Forensic Entomology. *Annual Review of Entomology.* 1985;30(1):137-154.
60. Fuller ME. The insect inhabitants of carrion: a study in animal ecology. Melbourne: H.J. Green, government printer; 1934.
61. Utsumi K. Studies on arthropodes congregating in animal carcasses, with regard to the postmortem interval *Ochanomizu Medical Annual.* 1958;7:202-223.
62. Bornemissza GF. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal of Zoology.* 1957;5:1-12.
63. Ricklefs R. *Invitación a la Ecología. La economía de la naturaleza.* . Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1996.
64. Siegel JA, Saukko PJ, Knupfer GC. *Encyclopedia of forensic sciences.* Encyclopedia of forensic sciences. San Diego ; London: Academic Press; 2000.
65. Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJ. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol.* 2011 Dec;7(4):379-392.
66. De Jong GD, Hoback WW. Effect of investigator disturbance in experimental forensic entomology: succession and community composition. *Medical and Veterinary Entomology.* 2006;20:248-258.
67. Donovan SE, Hall MJR, Turner BD, Moncrieff CB. Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology.* 2006;20:106-114.
68. Catts EP. Problems in estimating the PMI in death investigations. *J Agric Entomol.* 1992;9:245-255.
69. Adams ZJO, Hall MJR. Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on post-mortem larval length. *Forensic Sci Int.* 2003;138:50-61.



70. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int.* 2001 Aug 15;120(1-2):32-36.
71. Higley LG, Haskell NH. Insect development and forensic entomology. In: Byrd JH, Castner JL, editors. *Forensic Entomology The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 287-302.
72. Ames C, Turner BD. Low temperature episodes in the development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Medical and Veterinary Entomology.* 2003;17:178-186.
73. Haskell NH, Lord WD, Byrd JH. Collection of entomological evidence during death investigations. In: Byrd JH, Castner JL, editors. *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Florida: CRC Press; 2001. p. 81-120.
74. Benecke M. *Forensic Entomology: Arthropods and corpses*. In: Tsokos M, editor. *Forensic Pathology Reviews*. Totowa (NJ, USA): Humana Press Inc.; 2004. p. 207-240.
75. Benecke M, Lessig R. Child neglect and forensic entomology. *Forensic Sci Int.* 2001 Aug 15;120(1-2):155-159.
76. Benecke M, Josephi E, Zweihoff R. Neglect of the elderly: forensic entomology cases and considerations. *Forensic Sci Int.* 2004 Dec 2;146 Suppl:S195-199.
77. Malgorn Y, Coquoz R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: An interest in forensic entomology. *Forensic Sci Int.* 1999;102(2-3):111-119.
78. Wells JD, Introna F, Di Vella G, Campobasso CP, Hayes J, Sperling FAH. Human and Insect Mitochondrial DNA Analysis from Maggots. *Journal of Forensic Sciences.* 2001;46(3):685-687.
79. Cainé LSRM. *Entomologia Forense: Identificação Genética de Espécies em Portugal*. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2010.
80. Mazzanti M, Alessandrini F, Tagliabracchi A, Wells JD, Campobasso CP. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: genetic identification limits in forensic entomology. *Forensic Sci Int.* 2010 Feb 25;195(1-3):99-102.
81. Meiklejohn KA, Wallman JF, Dowton M. DNA barcoding identifies all immature life stages of a forensically important flesh fly (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences.* 2013;58(1):184-187.
82. Lord W, DiZinno J, Wilson M, Budowle B, Taplin D, al. e. Isolation, Amplification, and Sequencing of Human Mitochondrial DNA Obtained from Human Crab Louse, *Pthirus pubis* (L.), Blood Meals. *Journal of Forensic Science.* 1998;43(5):1097-1100.

83. Linville J, Hayes J, Wells J. Mitochondrial DNA and STR Analyses of Maggot Crop Contents: Effect of Specimen Preservation Technique. *Journal of Forensic Science*. 2004;49(2):341-344.
84. Zehner R, Amendt J, Krettek R. STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *J Forensic Sci*. 2004 Mar;49(2):337-340.
85. Campobasso CP, Linville JG, Wells JD, Introna F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *Am J Forensic Med Pathol*. 2005 Jun;26(2):161-165.
86. Gosselin M, Wille SMR, Fernandez MdMR, Di Fazio V, Samyn N, De Boeck G, et al. Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Sci Int* [serial on the Internet]. 2011; 208(1-3): Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21237593](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21237593).
87. Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M. *Current Concepts in Forensic Entomology*: Springer; 2010.
88. Nolte KB, Pinder RD, Lord W. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. *J Forensic Sci*. 1992;37(4):1179-1185.
89. Sadler DW, Robertson L, Brown G, Fuke C, Pounder DJ. Barbiturates and Analgesics in *Calliphora vicina* Larvae. *Journal of Forensic Science*. 1997;42(3):481-485.
90. Wood M, Laloup M, Pien K, Samyn N, Morris M, Maes RA, et al. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of benzodiazepines in *Calliphora vicina* larvae and puparia by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol*. 2003 Oct;27(7):505-512.
91. Pien K, Laloup M, Pipeleers-Marichal M, Grootaert P, Boeck G, Samyn N, et al. Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. *International Journal of Legal Medicine*. 2004 2004/08/01;118(4):190-193.
92. O'Brien C, Turner B. Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. *Int J Legal Med*. 2004 Aug;118(4):188-189.
93. Bushby SK, Thomas N, Priemel PA, Coulter CV, Rades T, Kieser JA. Determination of methylphenidate in Calliphorid larvae by liquid-liquid extraction and liquid chromatography mass spectrometry--forensic entomotoxicology using an in vivo rat brain model. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Nov;70:456-461.
94. Millar IM, Uys VM, Urban RP. The higher classification of insects and arachnids. In: Millar IM, Uys VM, Urban RP, editors. *Collecting and preserving insects and arachnids*2000.

95. Gillott C. Entomology. 3rd edition ed. Netherland: Springer; 2005.
96. Castner JL. General entomology and insect biology. In: Byrd J, Castner J, editors. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC; 2010.
97. Zhang Z-Q. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. Zootaxa [serial on the Internet]. 2011; 3148.
98. Castner JL. General entomology and arthropod biology. In: Byrd J, Castner J, editors. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC; 2001.
99. Byrd JH, Castner JL. Insects of forensic importance. In: Byrd J, Castner J, editors. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC; 2010.
100. Anderson GS. Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death. In: Byrd JH, Castner JL, editors. Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. Boca Raton: CRC Press LLC; 2001. p. 143-175.
101. Capinera JL. Encyclopedia of Entomology. 2nd edition ed. Capinera JL, editor. Netherland: Springer; 2008.
102. Introna F, Campobasso CP. Forensic dipterology. In: Papp L, Darvas B, editors. Contributions to a manual of palaeartic diptera 1 General and applied dipterology. Budapest: Science Herald; 2000. p. 793-846.
103. Gaensslen RE. Blood, bugs, and plants. Bell S, editor. New York: Facts On File; 2009.
104. Gaensslen RE. Bugs and plants. In: Gaensslen RE, editor. Blood, bugs, and plants. New York: Facts On File; 2009.
105. Kamal AS. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) I. Bionomics. Annals of the Entomological Society of America. 1958;51:261-271.
106. Gennard DE. Forensic Entomology - an introduction. England: Wiley; 2007.
107. Gennard DE. The life cycles of flies and beetles In: Gennard DE, editor. Forensic Entomology - an introduction. England: Wiley; 2007.
108. Anderson GS. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). J Forensic Sci. 2000;45:824-832.

109. Niederegger S, Pastuschek J, Mall G. Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Sci Int.* 2010;199:72-78.
110. Williams H. A model for the aging of fly larvae in forensic entomology. *Forensic Sci Int.* 1984;25(3):191-199.
111. Erzinclioglu YZ. Blowflies, *Naturalists' Handbooks* 23. Slough: The Richmond Publishing Co. Ltd; 1996.
112. Greenberg B. Nocturnal oviposition behavior of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 1990;27:807-810.
113. Faucherre J, Cherix D, Wyss C. Behavior of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) under extreme conditions. *Journal of Insect Behavior.* 1999;12(5):687-690.
114. Kaneshraja G, Turner B. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *International Journal of Legal Medicine* [serial on the Internet]. 2004; 118.
115. Szpila K. Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance In: Amendt J, Campobasso CP, Goff ML, Grassberger M, editors. *Current Concepts in Forensic Entomology*: Springer; 2010.
116. Thyssen PJ. Keys for Identification of Immature Insects. In: Amendt J, Campobasso CP, Goff ML, Grassberger M, editors. *Current Concepts in Forensic Entomology*: Springer; 2010.
117. Szpila K. Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. *Current concepts in forensic entomology*: Springer; 2010. p. 43-56.
118. Gennard DE. Identifying flies that are important in forensic entomology In: Gennard DE, editor. *Forensic Entomology - an introduction*. England: Wiley; 2007.
119. Wardle RA. The seasonal frequency of calliphorine blowflies in Great Britain. *Journal of Hygiene.* 1927;26:441-468.
120. Saunders DS. Maternal influence on the incidence and duration of larval diapause in *Calliphora vicina*. *Physiological Entomology.* 1987;12(3):331-338.
121. Pitts KM, Wall R. Adult mortality and oviposition rates in field and captive populations of the blowfly *Lucilia sericata*. *Ecological Entomology.* 2004;29(6):727-734.
122. Ashcroft GW, Crawford TB, Eccleston D, Sharman DF, MacDougall EJ, Stanton JB, et al. 5-hydroxyindole compounds in the cerebrospinal fluid of patients with psychiatric or neurological diseases. *Lancet.* 1966 Nov 12;2(7472):1049-1052.

123. Dencker SJ, Malm U, Roos BE, Werdinius B. Acid monoamine metabolites of cerebrospinal fluid in mental depression and mania. *J Neurochem.* 1966 Dec;13(12):1545-1548.
124. Shaw DM, Camps FE, Eccleston EG. 5-Hydroxytryptamine in the hind-brain of depressive suicides. *Br J Psychiatry.* 1967 Dec;113(505):1407-1411.
125. Bourne HR, Bunney WE, Jr., Colburn RW, Davis JM, Davis JN, Shaw DM, et al. Noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, and 5-hydroxyindoleacetic acid in hindbrains of suicidal patients. *Lancet.* 1968 Oct 12;2(7572):805-808.
126. Coppen A, Prange AJ, Jr Hill C, Whybrow PC, Noguera RR. Abnormalities of indoleamines in affective disorders. *Archives of General Psychiatry.* 1972;26(5):474-478.
127. Lloyd KG, Farley IJ, Deck JH, Hornykiewicz O. Serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete areas of the brainstem of suicide victims and control patients. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1974;11(0):387-397.
128. Korpi ER, Kleinman JE, Goodman SI, Phillips I, DeLisi LE, Linnoila M, et al. Serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in brains of suicide victims. Comparison in chronic schizophrenic patients with suicide as cause of death. *Arch Gen Psychiatry.* 1986 Jun;43(6):594-600.
129. Asberg M, Eriksson B, Martensson B, Traskman-Bendz L, Wagner A. Therapeutic effects of serotonin uptake inhibitors in depression. *J Clin Psychiatry.* 1986 Apr;47 Suppl:23-35.
130. Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov.* [10.1038/nrd1821]. 2005;4(9):764-774.
131. Wong DT, Horng JS, Bymaster FP, Hauser KL, Molloy BB. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(*p*-trifluoromethylphenoxy)-*N*-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci.* 1974 Aug 1;15(3):471-479.
132. Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci.* 1995;57(5):411-441.
133. Molloy BB, Wong DT, Fuller RW. The discovery of fluoxetine. *Pharmaceutical News.* 1994;1:6-10.
134. Wong DT, Bymaster FP, Horng JS, Molloy BB. A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synaptosomes of rat brain: 3-(*p*-trifluoromethylphenoxy)-*N*-methyl-3-phenylpropylamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975 Jun;193(3):804-811.

135. Wong DT, Threlkeld PG, Robertson DW. Affinities of fluoxetine, its enantiomers, and other inhibitors of serotonin uptake for subtypes of serotonin receptors. *Neuropsychopharmacology*. 1991 Aug;5(1):43-47.
136. Gram LF. Fluoxetine. *N Engl J Med*. 1994;331:1354-1361.
137. Stokes P, Holtz A. Fluoxetine tenth anniversary update: The progress continues. *Clin Ther*. 1997;19:1-86.
138. INFARMED. Estatística do Medicamento 2011: INFARMED; 2011 [Available from: [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/ESTATISTICA\\_MEDICAMENTO/EstMed-2011.pdf](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/ESTATISTICA_MEDICAMENTO/EstMed-2011.pdf)].
139. Wexler P, Anderson BD, Peyster Ad, Gad SC, Hakkinen PJ, Kamrin MA, et al., editors. *Encyclopedia of Toxicology*. 2nd ed: Academic Press; 2005.
140. Sweetman SC, editor. *Martindale: The complete Drug Reference*. 36th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.
141. Infomed - Base de dados de medicamentos [database on the Internet]. INFARMED; [cited 29/04/2013]. Available from: <http://www.infarmed.pt/infomed/lista.php>.
142. INFARMED. Folheto Informativo: Informação para o Utilizador: INFARMED; 2013 [updated 01/03/2013]. Available from: [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=7224&tipo\\_doc=fi](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=7224&tipo_doc=fi).
143. INFARMED. Medicamentos Uso humano: Prescrição, Dispensa e Utilização: Classificação Quanto à Dispensa. [Internet]: INFARMED; [cited 29/04/2013]; Available from: [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS\\_USO\\_HUMANO/PRESCRICAO\\_DISPENSA\\_E\\_UTILIZACAO/CLASSIFICACAO\\_QUANTO\\_A\\_DISPENSA](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/PRESCRICAO_DISPENSA_E_UTILIZACAO/CLASSIFICACAO_QUANTO_A_DISPENSA).
144. PubChem Compound. Fluoxetine. National Center for Biotechnology Information; [cited 09/08/2013]; Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3386#x27>.
145. van Harten J. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet*. 1993;24:203-220.
146. Stanford SC. Prozac: panacea or puzzle? *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17:150-154.
147. Nelson JC. Safety and tolerability of the new antidepressants. *J Clin Psychiatry*. 1997;58(suppl 6):26-31.
148. Ferguson JM. SSRI antidepressant medications: adverse effects and tolerability. *J Clin Psychiatry*. 2001;3:22-27.

149. Boyer EW, Shannon M. The serotonin syndrome. *N Engl J Med*. 2005;352:1112-1120.
150. Snyder SH, Yamamura HI. Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor. *Archives of General Psychiatry*. 1977;34(2):236-239.
151. Rosen RC, Lane RG, Menza M. Effects of SSRIs on sexual function: a critical review. *J Clin Psychopharmacol*. 1999;19:67-85.
152. Wilkinson TJ, Begg EJ, Winter AC, Sainsbury R. Incidence and risk factors for hyponatraemia following treatment with fluoxetine or paroxetine in elderly people. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47:211-217.
153. Movig KLL, Leufkens HGM, Lenderink AW, Akker VGAvd, Hodiament PPG, Goldschmidt HMJ, et al. Association between antidepressant drug use and hyponatraemia: a case-control study. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;53:363-369.
154. Hirschfeld RMA, Klerman GL, Clayton PJ, Keller MB, McDonald-Scott P, Larkin BH. Assessing Personality: Effects of the Depressive State on Trait Measurement. *Am J Psychiatry*. 1983;140:695-699.
155. King RA, Riddle MA, Chappell PB, Hardin MT, Anderson GM, Lombroso P, et al. Emergence of self-destructive phenomena in children and adolescents during fluoxetine treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1991;30:179-186.
156. Sternbach H. The serotonin syndrome. *Am J Psychiatry*. 1991;148:705-713.
157. Fernandez A, Bang SE, Srivathsan K, Vieweg WVR. Cardiovascular side effects of newer antidepressants. *Anadolu Kardiyol Derg*. [Review]. 2007;7:305-309.
158. Martin TG. Serotonin syndrome. *Ann Emerg Med* November. 1996;28:520-526.
159. Graudins A, Stearman A, Chan B. Treatment of the serotonin syndrome with cyproheptadine. *J Emerg Med*. 1998;16:615-619.
160. Catterson ML, Preskorn SH. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: clinical relevance. *Pharmacol Toxicol*. 1996;78:203-208.
161. Johnson RD, Lewis RJ, Angier MK. The Distribution of Fluoxetine in Human Fluids and Tissues. *J Anal Toxicol*. 2007 September 1, 2007;31(7):409-414.
162. Altamura AC, Moro AR, Percudani M. Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine. *Clin Pharmacokinet*. 1994;26(3):201-214.
163. Daniel WA, Wójcikowski J. Contribution of lysosomal trapping to the total tissue uptake of psychotropic drugs. *Pharmacol Toxicol*. 1997;80:62-68.

164. Daniel WA, Wójcikowski J. Interactions between promazine and antidepressants at the level of cellular distribution. *Pharmacol Toxicol.* 1997;81:259-264.
165. Renshaw PF, Guimaraes AR, Fava M, Rosenbaum JF, Pearlman JD, Flood JG, et al. Accumulation of fluoxetine and norfluoxetine in human brain during therapeutic administration. *Am J Psychiatry.* 1992;149:1592-1594.
166. Strauss WL, Layton ME, Hayes CE, Dager SR. <sup>19</sup>F magnetic resonance spectroscopy investigation in vivo of acute and steady-state brain fluvoxamine levels in obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry.* 1997;154(5):516-522.
167. Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics.* 2000;85:11-28.
168. Caccia S, Cappi M, Fracasso C, Garattini S. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology.* 1990;100:509-514.
169. Lattimore KA, Donn SM, Kaciroti N, Kemper AR, Neal CRJ, Vazquez DM. Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) use during pregnancy and effects on the fetus and newborn: a meta-analysis. *J Perinatol.* 2005;25:595-604.
170. Austin MP. To treat or not to treat: maternal depression, SSRI use in pregnancy and adverse neonatal effects. *Psychol Med.* 2006;36:1663-1670.
171. Bourdeaux R, Desor D, Lehr RR, Younos C, Capolaghi B. Effects of fluoxetine and norfluoxetine on 5-hydroxytryptamine metabolism in blood platelets and brain after administration to rats. *J Pharm Pharmacol.* 1998;50:1387-1392.
172. Benfield P, Heel RC, Lewis SP. Fluoxetine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness. *Drugs.* 1986;32:481-508.
173. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Postmortem Materials. 3rd ed. ed. London, U.K.: Pharmaceutical Press; 2004.
174. Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, Fuller RW, Perry KW. Inhibition of serotonin uptake by optical isomers of fluoxetine. *Drug Development Research.* 1985;6(4):397-403.
175. Wernicke JF, Dunlop SR, Dornseif BE, Zerbe RL. Fixed-dose fluoxetine therapy for depression. *Psychopharmacol Bull.* 1987;23:164-168.
176. Fuller RW, Snoddy HD, Krushinski JH, Robertson DW. Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neuropharmacology.* 1992;31:997-1000.



177. Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, Mayle DA, Krushinski JH, Robertson DW. Norfluoxetine Enantiomers as Inhibitors of Serotonin Uptake in Rat Brain. *Neuropsychopharmacology*. [Original Article]. 1993 Jun;8(4):337-344.
178. Baumann P, Rochat B. Comparative pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: a look behind the mirror. *Int Clin Psychopharmacol*. 1995;10(suppl. 1):15-21.
179. Stevens JC, Wrighton SA. Interaction of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine with human liver cytochromes P450. *J Pharmacol Exp Therap*. 1993;266:964-971.
180. Margolis JM, O'Donnell JP, Mankowski DC, Ekins S, Obach RS. (R)-, (S)-, and racemic fluoxetine N-demethylation by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*. 2000;28:1187-1191.
181. Ring BJ, Eckstein JA, Gillespie JS, Binkley SN, Vandenbranden M, Wrighton SA. Identification of the human cytochromes p450 responsible for in vitro formation of R- and S-norfluoxetine. *J Pharmacol Exp Therap*. 2001;297:1044-1050.
182. Liu ZQ, Shu Y, Huang SL, Wang LS, He N, Zhou HH. Effects of CYP2C19 genotype and CYP2C9 on fluoxetine N-demethylation in human liver microsomes. *Acta Pharmacol Sin*. 2001 Jan;22(1):85-90.
183. Liu ZQ, Zhu B, Tan YF, Tan ZR, Wang LS, Huang SL, et al. O-Dealkylation of fluoxetine in relation to CYP2C19 gene dose and involvement of CYP3A4 in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Therap*. 2002;300:105-111.
184. Hamelin BA, Turgeon J, Vallée F, Bélanger PM, Paquet F, LeBel M. The disposition of fluoxetine but not sertraline is altered in poor metabolizers of debrisoquin. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60:512-521.
185. Fjordside L, Jeppesen U, Eap CB, Powell K, Baumann P, Brøsen K. The stereoselective metabolism of fluoxetine in poor and extensive metabolizers of sparteine. *Pharmacogenetics*. 1999;9:55-60.
186. Eap CB, Bondolfi G, Zullino D, Savary-Cosendai L, Powell-Golay K, Kosel M, et al. Concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine after multiple doses of fluoxetine in cytochrome P4502D6 poor and extensive metabolizers. *J Clin Psychopharmacol*. 2001;21:330-334.
187. Liu ZQ, Cheng ZN, Huang SL, Chen XP, Ou-Yang DS, Jiang CH, et al. Effect of the CYP2C19 oxidation polymorphism on fluoxetine metabolism in Chinese healthy subjects. *Brit J Clin Pharmacol*. 2001;52:96-99.

188. Charlier C, Broly F, Lhermitte M, Pinto E, Anseau M, Plomteux G. Polymorphisms in the CYP 2D6 gene: association with plasma concentrations of fluoxetine and paroxetine. *Ther Drug Monit.* 2003;25:738-742.
189. Dominguez RA, Kumar AM, Cua W. Lack of change in fluoxetine and norfluoxetine kinetics when switching from fluoxetine to paroxetine. *J Clin Psychopharmacol.* 1996;16:320-323.
190. Llerena A, Dorado P, Berecz R, González AP, Peñas-Lledó EM. Effect of CYP2D6 and CYP2C9 genotypes on fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during steady-state conditions. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004;59:869-873.
191. Scordo MG, Spina E, Dahl M-L, Gatti G, Perucca E. Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 Genetic Polymorphisms on the Steady-State Plasma Concentrations of the Enantiomers of Fluoxetine and Norfluoxetine. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2005;97(5):296-301.
192. Klassen CD. *Cassarret and Doull's Toxicology - The basic science of poisons.* 7th ed. Klassen CD, editor: McGraw-Hill; 2007.
193. Preskorn SH, Shah R, Neff M, Golbeck AL, Choi J. The Potential for Clinically Significant Drug-Drug Interactions Involving the CYP 2D6 System: Effects with Fluoxetine and Paroxetine versus Sertraline. *Journal of Psychiatric Practice* 2007;13(1):5-12.
194. Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Amer J Hum Genet.* 1997;60:284-295.
195. Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Brit J Clin Pharmacol.* 2002;53:111-122.
196. Bergstrom RF, Peyton AL, Lemberger L. Quantification and mechanism of the fluoxetine and tricyclic antidepressant interaction. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;51:239-248.
197. Michalets EL. Update: Clinically Significant Cytochrome P-450 Drug Interactions. *Pharmacotherapy.* 1998;18(1):84-112.
198. Benfield P, Heel R, Lewis S. Fluoxetine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness. *Drugs.* 1986 1986/12/01;32(6):481-508.
199. Schoenly KG, Haskell NH, Hall RD, Gbur JR. Comparative Performance and Complementarity of Four Sampling Methods and Arthropod Preference Tests from Human

and Porcine Remains at the Forensic Anthropology Center in Knoxville, Tennessee. *Journal of Medical Entomology*. 2007;44(5):881-894.

200. Kharbouche H, Augsburger M, Cherix D, Sporkert F, Giroud C, Wyss C, et al. Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development. *Int J Legal Med*. 2008 May;122(3):205-211.

201. Campobasso CP, Gherardi M, Caligara M, Sironi L, Introna F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. *Int J Legal Med* 2004;118:210-214.

202. Traqui A, Keyser-Traqui C, Kintz P, Ludes B. Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? 118. 2004(194-196).

203. McWatters HG, Saunders DS. The influence of each parent and geographic origin on larval diapause in the blow fly, *Calliphora vicina*. *Journal of Insect Physiology*. 1996;42:721-726.

204. McWatters HG, Saunders DS. Maternal temperature has different effects on the photoperiodic response and the duration of larval diapause in blow fly (*Calliphora vicina*) strains collected at two latitudes. *Physiological Entomology*. 1998;23:369-375.