

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROSELI A. SILVÉRIO

**ESTADO DA ARTE DA ENTOMOTOXICOLOGIA FORENSE
COM ÊNFASE EM DIPTERA (INSECTA)**

E

**ESTUDO PRELIMINAR DA AÇÃO DA CAFEÍNA NO CICLO DE VIDA DE
Sarconesia chlorogaster (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)
SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

CURITIBA

2008

ROSELI A. SILVÉRIO

**ESTADO DA ARTE DA ENTOMOTOXICOLOGIA FORENSE
COM ÊNFASE EM DIPTERA (INSECTA)
E
ESTUDO PRELIMINAR DA AÇÃO DA CAFEÍNA NO CICLO DE VIDA
DE *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1831) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)
SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Zoologia como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas na modalidade de Bacharelado, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Luciane Marinoni

Co-orientador: Sionei Ricardo Bonatto

CURITIBA

2008

Dedico este trabalho à Rosa, minha mãe. Dentre todos, o ser humano mais extraordinário que já conheci.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que em todos os momentos da minha vida me deu apoio e condições – muitas vezes à custa de seu auto-sacrifício – para que eu chegasse até aqui.

Ao Jean, pelo amor, dedicação e apoio.

À Professora Luciane Marinoni, não apenas por me acolher em seu laboratório e por contribuir na elaboração deste trabalho, mas, por me instigar a novas perspectivas.

Aos meus orientadores, Luciane Marinoni e Sionei Bonatto, que me forneceram as estruturas necessárias (“materiais e imateriais”) para a elaboração deste trabalho.

Às Professoras Cibele S. Ribeiro Costa e Lúcia Massutti de Almeida, por cederem espaço na casa de criação.

Ao Professor Luis Amilton Foerster, por permitir que eu utilizasse seu laboratório para o preparo da dieta e pela doação da caseína utilizada no experimento.

À Flavia, Cesar, Carla e Marcelo, pelas dicas durante a preparação da dieta e por ceder seu tempo e espaço de trabalho.

À Professora Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin, pela doação do ágar utilizado no experimento.

Ao Professor Juarez Gabardo, pela ajuda com os testes estatísticos.

A todos os Professores que contribuíram para a minha formação acadêmica e que, de certa forma, moldaram o indivíduo que eu sou hoje.

Ao meu irmão, Eraldo, que me ajudou na elaboração da gaiola para acondicionamento dos adultos, na confecção das armadilhas e outros itens essenciais para a realização da parte experimental deste trabalho.

À Li, minha irmã de sangue, e às minhas irmãs de coração, Jaque e Pati, por suas performances como psicólogas durante as minhas crises existenciais.

Às amigas Giovana e Vanessa, por agüentarem meus ataques histéricos e mau humor.

A todos os meus colegas de laboratório pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Eros, por abrandar os momentos difíceis.

Aos espécimes de *Sarconesia chlorogaster* utilizados neste trabalho, sem os quais, uma parte dele não teria sido possível.

*Aerials, in the sky,
When you lose small mind, you free your life
Aerials, so up high,
When you free your eyes, eternal prize*

System of a Down

CAPÍTULO I - O ESTADO DA ARTE DA ENTOMOTOXICOLOGIA FORENSE COM ÊNFASE EM DIPTERA (INSECTA)

RESUMO

A Entomotoxicologia é uma área relativamente nova da Entomologia Forense, que abrange a análise e identificação de xenobióticos em artrópodes, especialmente em larvas necrófagas de dípteros, e sua importância para a avaliação toxicológica das causas e circunstâncias da morte. Esta também avalia a ação de substâncias químicas no desenvolvimento de espécies necrófagas de interesse forense e sua relevância na estimativa de IPM. Neste trabalho é feita uma revisão de publicações referentes à Entomotoxicologia Forense, direcionada especialmente, a atuação de drogas no ciclo de vida de dípteros.

Palavras-chave: Análise toxicológica, Drogas, Desenvolvimento, Larvas.

CAPÍTULO II - ESTUDO PRELIMINAR DA AÇÃO DA CAFEÍNA NO CICLO DE VIDA DE *SARCONESIA CHLOROGASTER* (WIEDEMANN, 1831) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

RESUMO

Este estudo preliminar diz respeito aos efeitos da cafeína no desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster* usando dieta artificial como fonte de alimento. Esta é uma espécie de mosca de interesse forense que coloniza carcaças em estágio fresco, sendo encontrada em maior abundância, principalmente, nos meses mais frios associada a ambientes urbanos no Sul do Brasil. Duzentas larvas recém eclodidas foram criadas em substrato com concentrações de 15 e 150 µg/g de cafeína (cem larvas para cada concentração) e cem utilizadas como controle. O estudo avaliou a duração do período larval até o período pré-pupa até a emergência do adulto. Os dados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey. Aparentemente a cafeína atua prolongando o intervalo entre a fase de pré-pupa e a emergência do adulto das larvas tratadas.

Palavras-chave: Desenvolvimento, Dieta artificial, Entomotoxicologia, Larvas, Overdose.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - O ESTADO DA ARTE DA ENTOMOTOXICOLOGIA FORENSE COM ÊNFASE EM DIPTERA (INSECTA)	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.1.1 Objetivos	3
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	3
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	3
1.3.1 A Entomotoxicologia e a Detecção de Xenobióticos.....	4
1.3.2 O Efeito das Drogas no Desenvolvimento de Dípteros.....	8
1.4 CONCLUSÃO	14
1.5 REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO II - ESTUDO PRELIMINAR DA AÇÃO DA CAFEÍNA NO CICLO DE VIDA DE <i>SARCONESIA CHLOROGASTER</i> (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	18
2.1 INTRODUÇÃO	18
2.1.1 Objetivos.....	20
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1 Coleta de adultos.....	21
2.2.2 Acondicionamento da geração parental	21
2.2.3 Manipulação e acondicionamento das larvas	22
2.2.4 Composição e preparo da dieta artificial.....	24
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
2.5 REFERÊNCIAS	29

CAPÍTULO I - O ESTADO DA ARTE DA ENTOMOTOXICOLOGIA FORENSE COM ÊNFASE EM DIPTERA (INSECTA)

1.1 INTRODUÇÃO

A entomotoxicologia estuda a aplicação dos insetos necrófagos na análise toxicológica a fim de identificar xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico) presentes em um tecido. Também investiga o efeito causado por estas substâncias no desenvolvimento dos insetos para aumentar a precisão na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) (INTRONA *et al.*, 2001).

O número de mortes relacionadas ao consumo acidental ou suicida de drogas e toxinas tem crescido em vários países (INTRONA *et al.*, 2001), e em muitos casos, tais mortes demoram a ser descobertas ou relatadas às autoridades competentes e o corpo pode permanecer oculto por vários dias (GOFF & LORD, 1994) dificultando, devido à sua decomposição, as análises toxicológicas. Os insetos necrófagos permanecem no cadáver mesmo após as amostras de tecido, sangue e urina tornarem-se inviáveis para análises, de tal forma que, dados toxicológicos obtidos a partir da análise destes insetos, coletados durante a autopsia ou provenientes da cena do crime, podem fornecer informações que contribuam para a determinação da causa da morte (GOFF & LORD, 2001).

Segundo KINTZ (1990) e POUNDER (1991) a utilização de insetos se mostra eficiente para análises toxicológicas quando: 1) devido à demora para a disponibilização das amostras, o material sofreu autólise e se decompôs; 2) as amostras não estão mais disponíveis devido à avançada decomposição e esqueletização do corpo; 3) houve alteração do material biológico em consequência do modo de morte; e 4) em casos nos quais a família não permite a retirada de amostras do corpo por princípios religiosos. Outra vantagem ao se utilizar insetos em análises é que, ao contrário dos tecidos do cadáver, as larvas apresentam menos contaminantes do que estes, pois, não são afetados pelos efeitos da decomposição (KINTZ *et al.*, 1990).

Na década de 70 pesquisadores relataram o acúmulo de substâncias químicas por larvas e adultos de dípteros, posteriormente outros estudos identificaram a presença de mercúrio, pesticidas, barbitúricos, antidepressivos e opiáceos. Os procedimentos para averiguar a presença de xenobióticos em larvas são semelhantes àqueles realizados para a análise toxicológica de tecidos humanos.

Além da possibilidade alternativa da utilização de insetos em análises toxicológicas, o outro ramo de pesquisa da entomotoxicologia é a possível ação que os xenobióticos presentes nos tecidos do cadáver podem exercer no ciclo de vida dos insetos necrófagos.

Os insetos são ferramentas importantes para a elaboração da estimativa de IPM. Esta estimativa pode ser determinada através da idade da prole proveniente da oviposição de dípteros no cadáver, poucas horas após a morte; e através da seqüência previsível de sucessão dos insetos. Assim, o limite mínimo de tempo é estabelecido através da idade dos imaturos coletados no cadáver, sendo que, o mais velho corresponde ao menor intervalo entre a colonização e a descoberta do corpo, e o limite máximo de tempo é estimado com base no padrão de sucessão.

Já na década de 50 foi observado que os dípteros eram atraídos de diferentes maneiras por carcaças de ratos, conforme o veneno que causou a morte do animal (UTSUMI, 1958), posteriormente foi verificado que, dependendo da substância, a sucessão entomológica poderia ser alterada (GUNATILAKE & GOFF, 1989). Além disso, pesquisas realizadas com larvas de dípteros comprovaram que substâncias como, por exemplo, cocaína (GOFF *et al.*, 1989) e heroína (GOFF *et al.*, 1991) podem acelerar o desenvolvimento larval, enquanto que a morfina (BOUREL *et al.*, 1999) retarda o mesmo. A elaboração de uma estimativa de IPM desconsiderando a presença de tais drogas levaria a uma estimativa incorreta.

Para a elaboração da estimativa de IPM por dados entomológicos, é necessário o conhecimento da biologia e hábito das espécies necrófagas. A relativa constância de desenvolvimento e sucessão dos insetos é o parâmetro utilizado para a elaboração da estimativa de IPM por métodos entomológicos, de forma que qualquer substância que altere, desde a colonização habitual até o desenvolvimento dos insetos envolvidos deve ser considerada para evitar possíveis erros.

1.1.1 Objetivos

1.1.1.1 Geral: Compilar informações científicas sobre Entomotoxicologia Forense.

1.1.1.2 Específicos:

- Realizar revisão de literatura sobre entomotoxicologia, com ênfase na atuação de drogas e toxinas no ciclo biológico das espécies de Diptera de interesse forense.
- Organizar a literatura compilada em banco de dados elaborado a partir do MS ACCESS, otimizando a consulta.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados sobre a influência das drogas e/ou toxinas no desenvolvimento de dípteros foram obtidos a partir da literatura disponível em periódicos. Esta revisão de literatura seguiu a divisão por áreas de interesse da entomotoxicologia, isto é: a análise (qualitativa e quantitativa) e identificação de substâncias químicas; e a atuação de xenobióticos no desenvolvimento de Diptera, temas da primeira e segunda seção, respectivamente. Entretanto, nos trabalhos apresentados na segunda seção também há relato de análises.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O histórico da entomotoxicologia forense é relativamente curto. O primeiro trabalho científico foi elaborado na década de 70, onde foi verificado o acúmulo de metais em adultos de mosca doméstica. Anteriormente, havia sido realizada somente a observação de que existia diferença na colonização das carcaças devido a presença de diferentes tipos de venenos. Nas décadas posteriores foi verificada a possibilidade de detecção de grande variedade de substâncias químicas: desde pesticidas a drogas de abuso.

As linhas de pesquisa em entomotoxicologia forense visam a detecção e quantificação de xenobióticos em artrópodes necrófagos, especialmente em larvas de dípteros, e também as possíveis alterações promovidas por estas substâncias nestes organismos.

Normalmente as drogas utilizadas nos experimentos são drogas de abuso (especialmente aquelas envolvidas em overdoses) e as concentrações utilizadas variam entre a metade da concentração letal ao o dobro desta. Ao longo das análises realizadas, os pesquisadores verificaram a possibilidade de se utilizar as larvas de dípteros como uma alternativa aos tecidos decompostos do cadáver na realização de análises toxicológicas, porém, se depararam com a dificuldade de se estabelecer uma correlação entre as concentrações presentes nos tecidos e aquelas encontradas em larvas.

Alguns autores questionam a utilização de larvas para tais análises por dois motivos: as larvas podem apenas prover resultados qualitativos, apesar de que, a ausência de drogas nas larvas não indica necessariamente ausência de drogas no cadáver; e devido ao avanço das técnicas de análise, estas estão cada vez mais sensíveis e específicas de maneira que mesmo os tecidos em putrefação podem ser analisados, o que antigamente era um impedimento (TRACQUI *et al.*, 2004).

1.3.1 A Entomotoxicologia e a Detecção de Xenobióticos

No final da década de 50, UTSUMI (1958) observou que carcaças atraíam espécies de dípteros de maneira distinta, devido ao veneno causador da morte. Somente 20 anos depois foi verificado que metais como cobre, ferro e cálcio poderiam ser acumulados nos tecidos de *Musca domestica* (SOHAL & LAMB, 1977).

NUORTEVA & NUORTEVA (1977), conseguiram verificar a origem geográfica de um cadáver, devido à concentração de mercúrio presente nos adultos de califorídeos, que se desenvolveram a partir de larvas coletadas de um corpo já em estado de putrefação. Como a concentração era relativamente baixa, supôs-se que a vítima vinha de uma região relativamente livre da poluição por este metal. Em 1982, estes mesmos pesquisadores detectaram o acúmulo de mercúrio em larvas de

califorídeos criadas em tecidos de peixe contaminado por esta substância, o que também foi verificado nas pupas e posteriormente nos adultos emergidos. Contudo, nos adultos o mercúrio foi rapidamente eliminado. Após dois dias, estes possuíam cerca de 50% da concentração de mercúrio encontrada nas larvas. Também foi verificada uma bioacumulação secundária de mercúrio em besouros que se alimentaram das larvas contaminadas por mercúrio.

Assim como drogas presentes numa carcaça podem atrair insetos de maneira peculiar, estas podem também comprometer o padrão de sucessão dos insetos. GUNATILAKE & GOFF (1989) verificaram esse fenômeno em Honolulu, Havaí. A presença de malato foi responsável por inibir a oviposição em um cadáver por vários dias. Esta afirmação se baseou pela presença de apenas duas espécies de moscas num cadáver com um IPM estimado de cinco a oito dias, intervalo no qual seria esperado um número variado de espécies.

O uso de larvas de moscas como uma alternativa para análise toxicológica foi relatado pela primeira vez por BEYER (1980) e, posteriormente, tornou-se uma abordagem viável quando as amostras convencionais não estão disponíveis ou hábeis para a análise (POUNDER, 1991; GOFF & LORD, 1994). Os insetos são, geralmente, homogeneizados e então preparados para análises de maneira similar aos tecidos e fluidos de interesse toxicológico. As análises podem ser realizadas por meio de procedimentos toxicológicos como radioimunoensaio, cromatografia gasosa, cromatografia líquida, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia em camada delgada ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (INTRONA *et al.*, 2001).

Dentre os métodos modernos de análise, a cromatografia se destaca devido à sua precisão em efetuar a separação, identificação e quantificação das substâncias químicas, juntamente com o auxílio da espectrometria de massa. Dentre as técnicas de cromatografia, a gasosa apresenta um poder de resolução e sensibilidade bastante elevado, o que torna possível a análise de várias substâncias de uma mesma amostra. Isso faz com que haja a necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra, fato que, muitas vezes, limita a utilização de outras técnicas (COLLINS *et al.*, 1997).

Através da técnica de cromatografia gasosa BEYER *et al.* (1980) detectaram fenobarbital em larvas de *Cochliomyia macelaria* (Fabricius). As larvas foram uma alternativa para a análise toxicológica devido ao fato de não haverem tecidos hábeis para tal propósito, pois, o corpo já se encontrava em estado de esqueletização. Por este mesmo procedimento foi verificada a presença de malato em larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (GUNATILAKE & GOFF, 1989), cocaína e benzoileconina em larvas de *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) que estavam presentes em restos esqueletizados, e neste último caso, amostras de músculo esquelético também foram analisadas pela mesma técnica, entretanto devido à avançada decomposição do material, a identificação da substância não foi possível (NOLTE *et al.*, 1992).

KINTZ *et al.* (1990) realizaram a análise de vários órgãos humanos (coração, fígado, baço e rim), bile e larvas de califorídeos através da técnica de cromatografia líquida e identificaram oxazepam, fenobarbital, alimemazina, clomipramina e triazolam. Esta última não foi detectada no baço ou no rim, contudo, todas as outras substâncias estavam presentes tanto nas larvas quanto nos órgãos, apesar de não haver uma correlação estabelecida entre as concentrações encontradas nas larvas e nos tecidos. KINTZ *et al.* (1990) detectaram bromazepam e levomepromazina em larvas provenientes de tecidos humanos.

A técnica de cromatografia gasosa aliada a espectrometria de massa foi eficiente em detectar cocaína em larvas de califorídeos e em fezes de besouros (MANHOFF *et al.*, 1991) e em verificar a presença de nortriptilina em larvas presentes em restos esqueletizados (WOHLENBERG *et al.* 1992). Experimentos realizados por GOFF *et al.* (1993) com larvas de *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius) criadas em tecidos de coelhos que receberam concentrações conhecidas de amitriptilina, obtiveram resultados positivos para a presença desta e nortriptilina nas larvas e nos pupários.

Apesar da análise qualitativa de larvas de dípteros mostrar-se uma ferramenta viável, apenas os resultados positivos podem ser considerados, isto porque, a ausência de drogas nas larvas não indica necessariamente a ausência de drogas no cadáver, como verificado por SADLER *et al.* (1997). Estes pesquisadores criaram larvas de *C. vicina* em substrato contendo aspirina, paracetamol, salicilato

de sódio, aminohipurato de sódio, sulfato de anfetamina, tiopentano, fenobarbitona, amilobarbitona, barbitona e *brallobarbitone* em concentrações equivalentes aquelas encontradas no músculo esquelético humano em casos de overdose. As análises realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência das larvas criadas no substrato contendo drogas apresentaram resultados negativos para paracetamol, aspirina, amilobarbitona e tiopentano, devido, provavelmente, a uma eliminação eficiente pelas larvas. Para as outras drogas, as concentrações encontradas foram significativamente menores do que aquelas presentes na fonte de alimento.

Através de várias publicações se evidencia que as larvas de dípteros são úteis na detecção de substâncias químicas presentes em cadáveres. Os xenobióticos podem ser detectados quando a taxa de absorção excede a de excreção, entretanto, não se compreende ainda como ocorre a acumulação ou a eliminação destas substâncias e como elas afetam o desenvolvimento larval (INTRONA *et al*, 2001), conhecimento necessário para se encontrar uma correlação entre a concentração de xenobióticos presentes no tecido e aquela encontrada na larva e como estas substâncias são capazes de alterar o desenvolvimento normal da larva.

Como verificado, quando se trata de quantificações, a análise de larvas ainda requer mais pesquisas para que haja contribuições efetivas para a ciência forense. Embora vários estudos relatem uma correlação entre as concentrações de drogas encontradas nas larvas (GOFF *et al.*, 1997), outros não observam tal correlação, muitas vezes a concentração encontrada nestas é muito menor do que aquela encontrada nos tecidos, como verificado, por exemplo, por GOFF *et al.*, 1989; KINTZ *et al.*, 1990; NOLTE *et al.*, 1992; e SADLER *et al.*, 1997; ou, em alguns casos, mais alta (NUORTEVA & NUORTEVA, 1982).

Sobre as análises qualitativas e quantitativas TRACQUI *et al.* (2004) realizaram estudos com larvas de califorídeos coletadas em cadáveres humanos em vários estágios de putrefação, durante algumas necropsias realizadas no Instituto Médico Legal de Estrasburgo, França, entre 1988 a 2002. Estas larvas foram coletadas de diversas partes dos cadáveres e então, submetidas a análises toxicológicas pelas técnicas de cromatografia gasosa ou cromatografia líquida, aliadas à espectrometria de massa. As análises reafirmaram a possibilidade de se

utilizar as larvas necrófagas para a detecção de uma série de compostos, especialmente psicotrópicos ou drogas de abuso.

Entretanto, não foi observada uma correlação entre as concentrações encontradas nas larvas e aquelas presentes nos tecidos. Na verdade as concentrações encontradas nas larvas foram geralmente mais baixas do que aquelas obtidas a partir das amostras dos cadáveres. Aliás, as análises apontaram que há variações expressivas na concentração de drogas entre as partes anatômicas do cadáver, e estas variações não foram reproduzíveis entre as necropsias. Quanto testadas as variações intra-larvais, estas também se mostraram discrepantes.

Estes autores relatam que dificilmente esperam encontrar uma relação quantitativa entre as concentrações de drogas nos tecidos e fluidos do cadáver na hora da morte e aquelas encontradas nas larvas, semanas ou meses após dela. Isto se deve a uma extensa rede de fatores, muitas vezes imprevisíveis ou inexplorados como a redistribuição pós-morte das drogas no corpo humano; a instabilidade destas no cadáver, especialmente na superfície do corpo onde as larvas são geralmente coletadas; e à farmacocinética dos diferentes tipos de drogas nas larvas.

1.3.2 O Efeito das Drogas no Desenvolvimento de Dípteros

Estudos demonstram o potencial uso de larvas como alternativas para análises toxicológicas, contudo, poucos se dirigem diretamente ao efeito que os xenobióticos presentes nos tecidos podem desencadear no desenvolvimento dos insetos. Na elaboração da estimativa de IPM, especialmente entre duas e quatro primeiras semanas de decomposição, presumi-se que os insetos, particularmente as larvas de dípteros, se desenvolverão em velocidades previsíveis de acordo com as condições climáticas (GOFF *et al.*, 1994). Entretanto, esta regularidade do desenvolvimento pode ser prejudicada quando estes insetos acabam ingerindo substâncias químicas presentes nos tecidos contaminados.

O primeiro a demonstrar que o padrão de desenvolvimento de dípteros poderia ser alterado na presença de drogas foi GOFF *et al.* (1989). A presença de

cocaína foi relevante no desenvolvimento larval de *Boettcherisca peregrina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Sarcophagidae). A velocidade de desenvolvimento das larvas baseou-se no comprimento larval e na verificação dos instares. Durante o 1º instar as colônias apresentaram um desenvolvimento semelhante. A partir do 2º instar, aproximadamente após 30 h, o desenvolvimento larval foi mais rápido nas colônias 69 e 137 mg, contudo semelhante entre elas. A velocidade de desenvolvimento esteve relacionada à concentração de droga presente. A presença de cocaína, benzoilecgonina, ou ambos, acelerou o desenvolvimento de 12-18 h entre 30 e 78 h de desenvolvimento e de 12-18 h o período pré-pupa correspondente. A pupariação ocorreu 24 h antes nas larvas que se alimentaram dos fígados onde a cocaína e/ou seus metabólitos estavam presentes. As análises qualitativas das larvas foram positivas para cocaína, benzoilecgonina ou para ambas, exceto para as larvas controle onde o resultado foi negativo.

Estudando os efeitos da heroína no desenvolvimento de *B. peregrina* criadas em fígados de coelhos, que receberam as seguintes doses da droga: 0; 12; 18 e 24 mg, em câmara de criação à 23°C, GOFF *et al.* (1991) observaram que as larvas cresceram rapidamente entre o intervalo de 18-96 h. As larvas criadas em tecidos contendo a droga apresentaram um tamanho significativamente maior do que as larvas da colônia controle. O período pré-pupa ocorreu em 96 h na colônia 18 mg e em 138 h na colônia controle e o estágio de pupa foi significativamente maior para as colônias tratadas. Uma estimativa de IPM, baseada no padrão de desenvolvimento de *B. peregrina*, ignorando a ação da heroína, pode ser significativamente diferente. Se esta fosse baseada no desenvolvimento larval, poderia ser maior do que 29 h, devido ao acelerado desenvolvimento; se esta fosse baseada na duração do período de pupa, a estimativa ficaria entre 18-38 h, um período menor do que o observado, devido ao retardo desta fase. As amostras, tanto de tecidos quanto de larvas, foram analisadas através de radioimunoensaio, esta técnica identificou a presença de morfina e codeína.

Quanto aos efeitos da metanfetamina no padrão de desenvolvimento de *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius) (Diptera: Sarcophagidae) GOFF *et al.* (1992) verificaram que as larvas criadas em fígados de coelhos - que receberam as seguintes doses da droga: 0; 37,5; 71,4 e 142,9 mg, em câmara de criação à 26°C,

apresentaram a partir de 30 h diferenças significativas na velocidade de desenvolvimento. Em 78 h as colônias 71,4 mg e 142,9 mg atingiram o comprimento máximo e em 84 h entraram no período pós-alimentar, a colônia controle atingiu esta fase com 96 h. O estágio de pupa foi observado 114 h na colônia 71,4 mg e apenas em 138 h no controle. A colônia controle apresentou pupas mais pesadas e um intervalo larva-adulto maior do que as colônias tratadas. Após 60 h, a velocidade de desenvolvimento para a colônia contendo a metade da dose letal diminuiu. Todas as larvas criadas em tecidos que receberam metanfetamina apresentaram um comprimento máximo inferior aquele verificado para as larvas controle. Os adultos provenientes da colônia 71,4 mg produziram apenas larvas mortas ou, em alguns casos, ovos que não eclodiram. Foi verificada uma correlação entre a concentração de metanfetamina presente nos tecidos e o tempo de duração do estágio de pupa. Uma estimativa de IPM baseada no desenvolvimento padrão de *P. ruficornis* a 26°C seria maior que 18 h, se baseada no desenvolvimento larval e maior que 48 h no desenvolvimento da pupa, dependendo da concentração de metanfetamina, ambos os valores errados. Neste experimento a presença de metanfetamina e/ou anfetamina não foi identificada através da técnica de radioimunoensaio.

Analisando os efeitos da amitriptilina em *P. ruficornis*, GOFF *et al.* (1993) verificaram que colônias de larvas, mantidas em câmara de criação a 26°C, criadas em fígados de coelhos contendo diferentes concentrações da droga (0, 300, 600 e 1000 mg) apresentaram diferenças significativas, quanto à duração do estágio larval, o qual durou cerca de 159,9 h na colônia controle e 190,1 h na colônia 600 mg. Nas colônias criadas em tecidos contendo aproximadamente a metade e o dobro da dose letal, as pupas foram significativamente maiores. Este estudo indicou que uma estimativa de IPM baseada no desenvolvimento padrão de *P. ruficornis* a 26°C, e ignorando-se a presença de amitriptilina, levaria a um estágio larval maior do que 30 h e a um estágio de pupa maior do que 47 h, os quais combinados levariam a uma estimativa de IPM maior que 77 h, errada. A análise toxicológica foi realizada através de cromatografia líquida de alto desempenho e mostrou resultados positivos para as amostras de tecidos e para as larvas, entretanto, como verificadas para cocaína, heroína e metanfetamina a concentração encontrada nos tecidos não foi proporcional a administrada. Quanto às larvas, foi verificado que estas podem servir como um método qualitativo alternativo para análises, na ausência de tecidos. Outro

fator observado foi a viabilidade das larvas produzidas pelos adultos que emergiram das colônias tratadas. Foi verificado que os adultos da colônia 1000 mg produziram apenas 50% de larvas viáveis, enquanto que os adultos da colônia 600 mg não produziram nenhuma larva viável.

GOFF *et al.* (1994) não observaram diferenças significativas no crescimento larval entre as colônias de *P. ruficornis* com diferentes concentrações de fenciclidina (0; 3,66; 7,31 e 14,62 mg). A média na duração do estágio larval foi significativamente diferente em colônias tratadas com fenciclidina e a colônia controle, sendo, respectivamente, 153,5 h (observado na colônia 3,66 mg) e 170,6 h. Além disso, o estágio de pupa foi mais longo para as larvas criadas em tecidos contendo a droga. O desenvolvimento total levou 506,9 h na colônia 7,31 mg e 475,6 h na colônia controle. As análises através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa foram positivas apenas para as amostras dos coelhos que receberam 3,66 e 7,31 mg. Assim como verificado para cocaína, heroína e amitriptilina (mas não para metanfetamina) a análise de larvas se mostrou eficiente para a detecção da droga.

GOFF *et al.* (1997) verificaram que a concentração de 67 mg de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), droga popularmente conhecida como ecstase, acelerou o desenvolvimento larval de *P. ruficornis*. As larvas foram criadas fígados de coelhos que receberam concentrações conhecidas de MDMA (0; 11; 22,5 e 67 mg) e mantidas em estufa a 26°C com foto-período de 12 horas. O intervalo larva-adulto foi significativamente menor na colônia 67 mg assim como o intervalo para a maturação dos adultos. Tanto as amostras de sangue dos animais que receberam a droga quanto às larvas e pupários das colônias que se desenvolveram no fígado destes animais foram positivas para MDMA e a quantidade encontrada teve relação com a dose administrada.

BOUREL *et al.* (1999), relatou a influência da morfina no desenvolvimento larval de *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae), a qual atuou retardando o mesmo. 4 coelhos (4,32-4,55kg) receberam durante três horas, através de perfusão arterial, doses de 0; 12,5; 25 e 50mg de morfina diluídas em 150 ml de salina. Foram depositados, aproximadamente, 400 ovos de *L. sericata* (todos com a mesma idade), nos olhos, narinas e boca de cada coelho. Os animais foram colocados em

caixas de plástico com rede de arame as quais foram mantidas em local fechado com temperatura ambiente variando 20-22°C e iluminação correspondendo à luz do dia. A presença de morfina nos tecidos retardou o desenvolvimento larval de *L. sericata*. Isto pode estar relacionado à concentração de morfina, quanto maior a quantidade, mais lento é o desenvolvimento.

MUSVASVA *et al.* (2001) verificaram que a hidrocortisona e o sódio metohexital não alteram o tempo total de desenvolvimento de *Sarcophaga (Curranea) tibialis* (Macquart) (Diptera: Sarcophagidae), apesar de promoverem alterações nos estágios de larva e pupa. Apesar da alta mortalidade observada especialmente no sódio metohexital, não houve diferenças estatísticas significativas entre nenhum dos tratamentos. A presença do sódio metohexital e/ou seus metabólitos retardou significativamente o desenvolvimento larval, especialmente em baixas doses, entretanto, como o intervalo de pupa se mostrou inversamente alterado. O mesmo foi verificado para hidrocortisona e/ou seus metabólitos.

A influência do Diazepam no desenvolvimento de Diptera foi avaliada por pesquisadores brasileiros. CARVALHO *et al.* (2001) verificaram a ação desta droga no desenvolvimento de larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). A presença do diazepam nos tecidos onde as larvas se desenvolveram teve um impacto significativo no crescimento larval, pupariação, emergência dos adultos e mortalidade. Além disso, a droga pode ser identificada, através de cromatografia gasosa aliada a espectrometria de massa, tanto nas amostras de larvas como nos pupários e adultos, que se desenvolveram nos fígados de coelhos que receberam a droga. Entretanto, como verificado em outros trabalhos, não houve uma correlação nas concentrações encontradas nos tecidos e nas larvas.

PIEN *et al.* (2004) verificaram que doses terapêuticas de nordiazepam, e seu metabólito oxazepam, podem ser identificadas através da cromatografia líquida aliada a espectrometria de massa nas larvas e pupários vazios de *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). Entretanto, não foi verificada nenhuma diferença significativa no desenvolvimento desta espécie de Diptera.

O'BRIEN & TURNER (2004) verificaram uma leve influência do paracetamol no desenvolvimento de *C. vicina*. O paracetamol afetou ligeiramente o desenvolvimento larval, particularmente 2-4 dias de desenvolvimento, onde este foi mais acelerado em comparação ao controle. O resultado global não indicou uma diferença significativa no crescimento entre as diferentes concentrações ingeridas pelas larvas.

TABOR *et al.* (2005) verificaram que o padrão de sucessão dos artrópodes não é afetado pela presença de etanol em carcaças de porcos. Entretanto observaram que o padrão de desenvolvimento larval de *Phormia regina* (Meigen), (Diptera: Calliphoridae) é alterado devido a presença desta substância nos tecidos. O período larval para as larvas criadas em tecidos contendo etanol foi $145,5 \pm 14,8$ h e a duração do estágio de pupa foi $147,3 \pm 11,4$ h. Enquanto que para as larvas controle, tais fases apresentaram, respectivamente, $133,6 \pm 11,6$ e $143,9 \pm 8,3$ h. Evidenciando que a presença de etanol nos tecidos pode influenciar no desenvolvimento larval e levar a elaboração de uma estimativa de IPM incorreta.

KHARBOUCHE *et al.* (2008) verificaram a influência de diversas concentrações de codeína (0; 0,05; 0,25; 2 e 30 mg/kg de fígado) no desenvolvimento de *L. sericata*. As larvas criadas em tecido tratado, desenvolveram-se mais rapidamente do que as do controle, podendo alterar a estimativa de IPM, baseada no desenvolvimento padrão da espécie. Além disso, foi verificado que a codeína pode ser detectada, através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, em amostras de larvas, contudo os valores encontrados não apresentaram correlação com as concentrações encontradas nos tecidos tratados.

Dentre os estudos não foram evidenciados efeitos nocivos nas larvas, devido à exposição aos tecidos contaminados com metais, como cobre, ferro, mercúrio e por drogas, entretanto, em alguns casos, a droga afetou a fertilidade dos adultos, como verificado, por exemplo, nos experimentos com metanfetamina e amitriptilina. Também foi relatada ocorrência de irregularidades no controle motor, coordenação muscular (NUORTEVA & NUORTEVA, 1982) e também diminuição da atividade (SCHOTT & NUORTEVA, 1983) em adultos de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebridae) que se alimentaram de larvas contaminadas por mercúrio, o que, entretanto não influenciou na longevidade destes animais.

1.4 CONCLUSÃO

A análise toxicológica de dípteros é uma ferramenta útil para a ciência forense, as larvas de dípteros são amostras confiáveis para análises na ausência de tecidos ou fluidos normalmente utilizados para este fim. Nos casos em que a decomposição esteja avançada, a análise qualitativa das larvas pode ter um resultado mais confiável do que os tecidos já decompostos.

Contudo, nota-se a necessidade de mais estudos direcionados a verificar como ocorre a acumulação e a excreção de xenobióticos pelas larvas, este conhecimento, provavelmente permitirá estabelecer uma correlação entre a concentração de drogas ou toxinas presentes no cadáver e àquela encontrada nas larvas.

Embora estudos dirigindo-se aos efeitos causados por xenobióticos no desenvolvimento larval de dípteros ainda estejam limitados, aqueles realizados mostram que a presença de drogas nos tecidos do cadáver pode ter uma ação diferenciada no ciclo de vida das larvas necrófagas. O que reforça a necessidade de mais pesquisas abordando outras drogas, em concentrações que não se restrinjam a doses subletais ou letais. Talvez, sejam válidas pesquisas que verifiquem se mesmo as concentrações terapêuticas de medicamentos de uso freqüente não sejam capazes de alterar os padrões de desenvolvimento. Além disso, é necessário repetir os estudos realizados com outras espécies para se verificar se a alteração é padrão entre as elas.

É essencial que o entomologista esteja ciente de qualquer dado indicando a presença de xenobióticos no cadáver, pois, isto permitirá a realização de correções nos dados referentes ao ciclo de vida, baseando-se na substância envolvida, e resultando numa interpretação mais acurada do IPM.

1.5 REFERÊNCIAS

- BEYER, J. C.; ENOS, W.F & SATJIC, M. **Drug identification through analysis of maggots.** J. Forensic Sci. 25: 411-412,1980.
- BOUREL, B.; HEDOUIN, V.; MARTIN-BOUYER, L.; BECART, A.; TOURNEL, G.; DEVEAUX, M. & GOSSET, D. **Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae).** J. Forensic Sci. 44: 354-358, 1999.
- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X. & Trigo, J. R. **Determination of drug levels and effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil.** Forensic Sci. Int., 120: 140-144, 2001.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos,** Editora da UNICAMP, 7ª ed., 1997.
- GOFF, M. L. **Gamasid mites as potencial incators of postmortem interval.** In: Channabasavanna, G. P. & Viraktamath, C. A. Progress in acarology. New Delhi: Oxford & IBH. p. 443-450, 1989.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; HEWDIKARAM, K. A. & OMORI, A. I. **Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications to the estimation of postmortem intervals using arthropod developmental patterns.** J. Forensic Sci., 36(2): 537-542, 1991.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I. & LA POINTE, D. A. **Preliminary observations of the effect of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications to this effect to estimation of postmortem interval.** J. Forensic Sci., 38: 316-322, 1993.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I. & LA POINTE, D. A. **Preliminary observations of the effects of phencyclidine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae).** J. Forensic Sci., 39 (1): 123-128, 1994.
- GOFF, M. L.; ODOM, C. B. & EARLY M. **Estimation of postmortem interval by entomological techniques: a case study from Oahu, Hawaii.** Bulletin of the Society Vector Ecology, 11(2): 242-246, 1986.

- GOFF, M. L.; OMORI, A. I. & GOODBROD, J. R. **Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae).** J. Med. Entomol., 26 (2): 91-93, 1989.
- GUNATILAKE, K. & GOFF, M.L. **Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae.** J. Forensic Sci., 34: 714-716, 1989.
- INTRONA, F. JR.; CAMPOBASSO, C. P. & GOFF, M. L. **Entomotoxicology.** Forensic Sci. Int., 120: 42-47, 2001.
- KHARBOUCHE, H.; AUGSBURGER, M.; CHERIX D., SPORKERT, F.; GIROUD C.; WYSS, C.; CHAMPOD, C. & MANGIN, P. **Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development.** Int. J. Legal Med. 122: 205-211, 2008.
- KINTZ, P.; GODELAR, A.; TRACQUI, A.; MANGIN, P.; LUGNIER, A. A. & CHAUMONT, A. J. **Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine.** J. Forensic Sci., 35: 204-207, 1990.
- KINTZ, P.; TRACQUI, A.; LUDÉS, B.; WALLER, J.; BOUKHABZA, A.; MANGIN, P.; LUGNIER, A. A. & CHAUMONT, A. J. **Fly larvae and their relevance in forensic toxicology.** American J. of Forensic Medical and Pathology, 11(1): 63-65, 1990.
- MANHOFF, D. T.; HOOD, I.; CAPUTO, F.; PERRY, J.; ROSEN, S. & MIRCHANDANI, H. G. **Cocaine in decomposed human body: variables and observations in case and experimental field studies.** J. Forensic Sci., 35 (1): 103-111, 1991.
- MUSVASVA, E.; WILLIAMS, K. A.; MULLER, W. J. & VILLET, M. H. **Preliminary observations on the effects of hydrocortisone and sodium methohexital on development of *Sarcophaga (Curraea) tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae), and implications for estimating post mortem interval.** Forensic Sci. Int. 120: 37-41, 2001.
- NOLTE, K. B.; PINDER, R. D. & LORD, W. D. **Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body.** J. Forensic Sci. 37: 1179-1185, 1992.
- Nuorteva, P. & Nuorteva, S. L. **The fate of mercury in Sarcosaprophagous flies and insects eating them.** Ambio, 11: 34-37, 1992.
- O'BRIEN, C. & TURNER, B. **Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development.** Int. J. Legal Med. 118:188-189, 2004.

- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios.** Editora Millenium, Campinas-SP, 2003.
- PIEN K.; LALOUP, M.; PIPELEERS-MARICHAL, M.; GROOTAERT, P.; DE BOECK, G.; SAMYN, N.; BOONEN, T.; VITS, K & WOOD, M. **Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study.** Int. J. Legal Med. 118: 190-193, 2004.
- POUNDER, D. **Forensic entomotoxicology.** J. Forensic Sci., 31: 469-472, 1991.
- SANDLER, D. W.; CHUTER, G.; SENEVERATNE C. & POUDEUR, D. J. **Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae.** J. Forensic Sci., 42 (3): 481-485, 1997.
- SCHOTT, S. & NUORTEVA, P. **Methylkvicksilvrets inverkan PA aktivitet hos *Tenebrio molitor* (L.) (Col. Tenebrionidae).** Acta Entomol. Fennici, 42: 78-81, 1993.
- SOHAL, R. S. & LAMB, R. E. **Intracellular deposition of metals in the midgut of the house fly, *Musca domestica*.** J. Insect Physiology, 23: 1349-1354, 1977.
- TABOR, K. L.; FELL, R. D.; BREWSTER, C. C.; PELZER, K. & BEHONICK, G. S. **Effects of antemortem ingestion of ethanol on insect successional patterns and development of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae).** J. Med. Entomol., 42 (3): 481-489, 2005.
- TRACQUI, A.; KEYSER-TRACQUI, C.; KINTZ, P. & LUDÉS, B. **Entomotoxicology for the forensic toxicology: much ado about nothing?** Int. J. Legal Med. 118: 194-196, 2004.
- UTSUMI, K. **Studies on arthropods congregating to animal carcasses, with regard to the estimation of postmortem interval.** Ochanomizu Med., 7: 202-223, 1958.
- WOHLENBERG, N.; LINSEY, T.; BACKER, R. & NOLTE, K. B. **Isolation of nortriptyline from maggots, muscle, hair, skin and cancellous vertebral bone in skeletonized remains,** in: Proceedings of the 44th Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences, New Orleans, L.A., Vol. 1, p. 199, 1992.

CAPÍTULO II - ESTUDO PRELIMINAR DA AÇÃO DA CAFEÍNA NO CICLO DE VIDA DE *SARCONESIA CHLOROGASTER* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) SOB CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

2.1 INTRODUÇÃO

As estimativas de intervalo pós-morte (IPM) usam freqüentemente dados entomológicos, como a velocidade de desenvolvimento e padrão de sucessão dos insetos. A precisão destas estimativas tem sido questionada em mortes envolvendo a intoxicação por drogas (GOFF *et al.*, 1994). Há poucos estudos detalhando a relação entre substâncias químicas, tais como medicamentos, toxinas e poluentes ambientais, presentes nos tecidos em decomposição, e a velocidade e/ ou padrão de desenvolvimento dos insetos necrófagos.

A cafeína (1,3,7- trimetilxantina guanina) é a substância estimulante mais consumida (RIESELMANN *et al.*, 1999) no mundo. É um alcalóide derivado de plantas que está presente no café, em grãos de cacau e folhas de chá. Cafeína e seus metabólitos, paraxantina, a teofilina e a teobromina, podem ser detectados em análises toxicológicas (KERRIGAN *et al.*, 2005). Uma xícara de café ou chá pode conter entre 40-150 mg de cafeína (BASELT, 2004), embora especialidades diferentes de café possam conter doses mais altas (MCCUSKER *et al.*, 2003). Uma dose de 130 mg de cafeína pode produzir uma concentração plasmática média de 4,0 mg/l dentro de 20-40 minutos (O'CONNELL *et al.*, 1984). Embora a vida-média plasmática em adultos seja de 2-10 horas (MOFFATT *et al.*, 2004) no neonato ela pode ser tão longa quanto quatro dias (ALDRIDGE *et al.*, 1979).

A 1,3,7-trimetilxantina guanina é um estimulante moderado do sistema nervoso central. Conforme a dose pode produzir rubor, calafrios, agitação, irritabilidade, perda de apetite, fraqueza e tremores. Hipertensão, hipotensão, taquicardia, vômito, febre, delírios, alucinações, convulsões, arritmia, coma e morte são relatados em casos de overdose, a qual é promovida em humanos por uma concentração sanguínea maior que 100 µg/ml (WINEK *et al.*, 2001). A causa da morte é freqüentemente descrita como fibrilação ventricular.

HOLMGREN *et al.* (2003) verificaram em casos de autópsia, concentrações de 1,3,7-trimetilxantina guanina acima de 10 µg/g de sangue. Durante o ano de 2002 estes mesmos pesquisadores, encontraram cafeína acima deste valor em 58 casos, de 4500 analisados, sendo a concentração média 14 µg/g de sangue. Em quatro casos de overdose analisados por HOLMGREN *et al.* (2003) a concentração de cafeína encontrada esteve entre 153-210 µg/g de sangue.

Foi verificado que a cafeína é capaz de produzir diversos efeitos em insetos. Esta tem ação inibitória no desenvolvimento larval de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) (LARANJA *et al.*, 2006) e em *Xyleborus fornicatus* (Eichhoff) (Coleoptera: Scolytidae) atua inibindo a oviposição e retardando diferentes estágios do ciclo de vida (HEWAVITHARANAGE *et al.*, 1999). Em *Phormia regina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) contribui inibindo o ganho de peso das larvas (GREEN *et al.*, 2002). Em *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae), além de produzir malformação alar (MOHAMED & NAIR, 2001), diferentes concentrações são capazes de causar: retardamento do ciclo ontogenético, formação de adultos com pouca mobilidade e inviáveis (CIOBOTARI & BARA, 2002), redução do número de pupas e, na concentração de 1000 µg/ml, a morte (MOHAMED *et al.*, 1991). Em espécimes de *Drosophila prosaltans* (Duda) (Diptera: Drosophilidae) levou a diminuição da fecundidade, sendo que esta se mostrou diretamente ligada ao aumento da concentração de cafeína, contudo a droga afetou de forma positiva a longevidade das fêmeas tratadas (ITOYAMA & CAMPOS-BICUDO, 1992).

No Brasil, os estudos de campo, realizados por FREIRE (1914) na Bahia; MONTEIRO-FILHO E PENREIRO (1987) e SOUZA (1994) em São Paulo e MOURA, CARVALHO E MONTEIRO-FILHO (1995) no Paraná comprovam a importância das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae na decomposição de cadáveres. Estas famílias são frequentemente utilizadas nas análises toxicológicas, por serem, geralmente, as primeiras a chegar ao corpo (GOFF & LORD, 1994) e suas larvas se desenvolverem nos tecidos.

Sarconesia chlorogaster (Wiedemann) ocorre nas regiões planas, incluindo o Sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile. MOURA *et al.* (1995) relataram que esta espécie coloniza carcaças em estágio fresco, no período de inverno em área urbana. Ainda, segundo OLIVEIRA-COSTA (2003) *S. chlorogaster* é um dos dípteros de

interesse forense em nosso país. Esta espécie teve seu ciclo de vida muito bem detalhado tanto para condições ambiente quanto para condições laboratoriais. GREENBERG & SZYSKA (1984) descreveram o ciclo de vida de *S. chlorogaster* em condições ambiente, incluindo descrições do primeiro, segundo e terceiro instar e velocidade de desenvolvimento. Em contrapartida, BONATTO (1996) realizou a criação desta espécie em laboratório, sob condições de umidade e temperatura controladas, em dieta artificial oligídica. Nesta ocasião, além de outros relatos, o autor descreveu o ciclo de vida desta espécie e caracterizou morfológicamente as formas imaturas.

Experimentos realizados com larvas de dípteros expostas à cocaína (GOFF *et al.*, 1989), heroína (GOFF *et al.*, 1991), morfina (BOUREL *et al.* 1999) e metanfetamina (GOFF *et al.*, 1992) entre outros mostraram que a presença de substâncias químicas pode influenciar no ciclo biológico dos insetos divergindo suficientemente para alterar a estimativa de IPM. Estes exemplos justificam a pesquisa relacionando a possível ação de drogas e/ou toxinas no ciclo biológico dos insetos de interesse forense, os quais são utilizados como método auxiliar para as estimativas de IPM.

2.1.1 Objetivos

- Realizar um experimento piloto a partir da criação em laboratório de *Sarconesia chlorogaster*, testando a ação da cafeína associada à dieta artificial descrita por SINGH (1976) e sua possível influência no intervalo de tempo entre a larva de 1^o instar e a emergência do adulto.
- Adquirir conhecimento prático referente à observação e manipulação do organismo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de adultos

Os adultos foram coletados em área residencial localizada no bairro Cajuru, próxima ao quilometro 81 da BR 277 em Curitiba, Paraná. Os espécimes foram capturados com armadilhas de isca, semelhantes à descrita por FERREIRA (1978) (FIGURA 1) construídas com latas de cor preta, com 10 cm de diâmetro e 10,5 cm de altura, contendo três aberturas na parte inferior para a entrada dos insetos. Foi colocado na abertura original da lata, um cone feito de tela, que além de direcionar as moscas para o saco plástico de coleta, impedia seu retorno para a lata. A isca utilizada foi peixe (sardinha), pois, *S. chlorogaster* é um dos califorídeos mais freqüentes neste tipo de isca (FERREIRA, 1978).



Figura 1 – Armadilha de isca.

2.2.2 Acondicionamento da geração parental

Após a coleta, os adultos foram separados em tubos de ensaio vedados com rolhas de algodão para posterior identificação e verificação do sexo. Este procedimento foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico Olympus 306547. Quatorze casais foram acondicionados em gaiola com armação metálica de alumínio e laterais de tela medindo 93X47 cm (FIGURA 2). Esta foi mantida sobre suporte de madeira o qual teve seus pés imersos em potes contendo água com detergente para evitar o possível acesso de outros insetos à gaiola. A gaiola foi

mantida na casa de criação anexa ao Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.



Figura 2 – Gaiola para acondicionamento da geração parental.



Figura 3 – Alimentação dos adultos.

Como alimentação, foi oferecido aos adultos, uma mistura composta por açúcar, levedo de cerveja e leite em pó, na proporção de 1:1:1 em placa de Petri medindo 4,5 cm de diâmetro; a água foi fornecida em recipiente de vidro de 7X5 cm com substrato para pouso feito de algodão (FIGURA 3). Tanto a alimentação quanto a água, fornecidos *ad libitum*, foram substituídos a cada 48 horas (BONATTO, 1995), para a obtenção de posturas, foram expostas duas cabeças de peixe em placas de Petri medindo 4,5 cm de diâmetro.

2.2.3 Manipulação e acondicionamento das larvas

Para garantir o máximo de indivíduos no experimento, foram utilizadas larvas recém eclodidas. Estas foram retiradas do peixe com auxílio de pincel fino, lavadas com água destilada e então transferidas para frascos plásticos de sete centímetros de altura e quatro centímetros de diâmetro, contendo 20 g de dieta artificial acrescidas com concentrações diferentes de cafeína: zero, 15 e 150 µg/g de dieta. Estes são valores aproximados aos encontrados por HOLMGREN *et al.* (2003) em autópsias, sendo que o valor de 150µg foi registrado em caso de overdose. Foram preparados 10 frascos para cada concentração, com 10 larvas cada. Após isso os frascos eram recobertos por tule e então fechados com tampa com abertura de 1,5

cm de diâmetro, para permitir a aeração das larvas e impedir a fuga destas ou a entrada de outros organismos (FIGURA 4).



Figura 4 – Frascos de criação.



Figura 5 – Caixas entomológicas.

Estes frascos foram acondicionados em caixas entomológicas (FIGURA 5) de dimensões 25X45X30 cm, com armação de madeira e laterais de tela, fundo de madeira e tampa de vidro, e mantidas na casa de criação, em temperatura ambiente. Os frascos foram dispostos aleatoriamente, entretanto, a posição de cada frasco permaneceu a mesma durante todo o experimento, segundo a FIGURA 6.

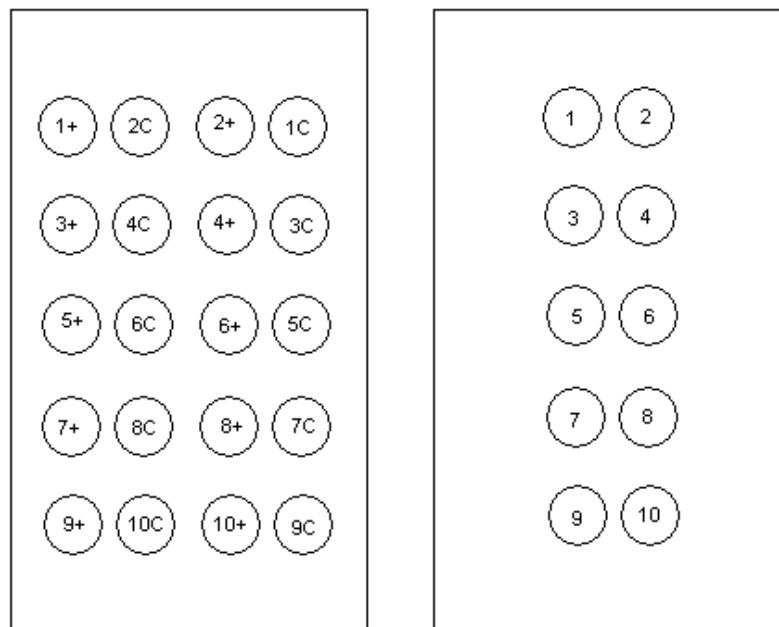


Figura 6 – Disposição dos frascos nas caixas entomológicas. Os símbolos + e C representam as concentrações de 15 e 150 μ g, respectivamente. Os frascos que contém apenas algarismos são controles.

A cada 72 horas foi realizada a troca de dieta. Antes de se realizar passagem das larvas para a nova dieta, os frascos eram aclimatados, após sua retirada do refrigerador, ou após seu preparo, por aproximadamente quatro horas (BONATTO, 1995). Devido à pequena amostra para cada tratamento, optou-se por verificar os instares larvais apenas durante a troca de dieta, onde duas larvas de cada frasco eram observadas com auxílio de microscópio estereoscópico.

Para a pupariação foram disponibilizados, junto com a dieta, sacos plásticos contendo vermiculita para que as larvas em fase pós-alimentar tivessem um lugar seco para iniciar o estágio de pupa. A partir do período pré-pupa, as observações ocorreram as oito, 12 e 18 h, os mesmos intervalos valem para as observações durante o período de pupa até a emergência do adulto.

O intervalo entre a larva de 1^o instar até o período de pré-pupa e a duração do período pré-pupa até a emergência do adulto foram analisados através de Análise de Variância e Teste de Tukey.

2.2.4 Composição e preparo da dieta artificial

Neste experimento foi utilizada a dieta oligídica com composição semelhante a elaborada por SINGH (1977). Os ingredientes e quantidades utilizadas na elaboração da dieta artificial foram os seguintes: ágar em pó, 2 g; caseína em pó, 0,5 g; leite em pó integral, 10 g; levedo de cerveja, 10 g; NIPAGIN, 0,4 g; e água destilada, 100 ml.

A água destilada era aquecida até entrar em ebulição, após isso, esperava-se esta atingir a temperatura de 85°C e então se acrescentava o ágar. Os demais ingredientes eram misturados em outro recipiente e apenas quando o ágar começava a atingir uma consistência de gel, aproximadamente a 50°C, eram acrescentados os demais ingredientes. Este procedimento visou manter os valores nutritivos da dieta que poderiam ser prejudicados pelas altas temperaturas.

A dieta que conteria cafeína era pesada e para cada 200 g de dieta era acrescentada uma cápsula de cafeína em pó de três e 30 mg (para se obter as

concentrações de 15 e 150 $\mu\text{g/g}$ de dieta, respectivamente). Após isso, para garantir a homogeneização, a dieta era misturada com auxílio de colher de metal, com movimentos circulares, por cerca de 10 minutos. A dieta controle foi depositada diretamente nos frascos de criação.

Cada frasco de criação recebeu 20 g de dieta. Após um período de 1 hora em temperatura ambiente, cobertos por tule fino os frascos eram tampados e armazenados em refrigerador a aproximadamente 10°C.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura na casa de criação durante o experimento esteve entre 15,6-24,8°C. Aproximadamente após três horas de exposição do substrato, foram visualizadas as primeiras posturas (FIGURA 7). O tempo de incubação durou entre 24-38 h, como observado por GREENBERG & SZYSKA (1984), para o desenvolvimento desta mesma espécie entre 13,7-24,8°C. As larvas tratadas com cafeína apresentaram um comportamento errante e na maior parte das vezes não ficavam agrupadas, além disso, não apresentaram fotofobia (FIGURA 8).



Figura 7 – Massas de ovos.



Figura 8 – O 1º e o 3º frascos são representantes das concentrações de 15 e 150 μg de cafeína.

Durante o 3º instar ocorreu o maior número de mortes para todos os tratamentos. O intervalo médio observado entre a larva de 1º instar até o período pré-pupa foi de 360 h para o controle, 359,96 h para 15 $\mu\text{g/g}$ e 343,29 h para 150 $\mu\text{g/g}$ (ver TABELA 1). A duração média do período pré-pupa até a emergência do adulto foi de 378,96 h para o controle, 493,94 h para 15 $\mu\text{g/g}$ e 454,93 h para 150 $\mu\text{g/g}$ (ver TABELA 2).

Tab. 1 – intervalo entre a larva de 1^o instar até o período pré-pupa, onde, n corresponde ao número de larvas e h ao número de horas.

DURAÇÃO DO PERÍODO LARVAL					
controle		15 µg		150 µg	
n	h	n	h	n	h
05	336	04	336	02	336
06	340	05	340	03	340
09	346	07	346	09	346
14	360	16	360		
05	364	07	364		
07	370	04	370		
08	384	07	384		
03	360	02	388		

Tab. 2 – intervalo entre o período pré-pupa até a emergência do adulto.

DURAÇÃO DO PERÍODO PRÉ-PUPA ATÉ A EMERGÊNCIA DO ADULTO					
controle		15 µg		150 µg	
n	h	n	h	n	h
03	356	02	432	02	432
01	360	01	433	04	456
08	365	06	437	03	457
01	371	01	438	01	460
04	374	05	443	03	461
02	378	01	446	01	467
02	380	03	450		
12	384	04	452		
08	385	19	456		
02	388	06	460		
03	389	02	462		
02	390	01	470		
03	395				

O intervalo entre a larva de 1^o instar até o período de pré-pupa e a duração do período pré-pupa até a emergência do adulto foram analisados através de ANOVA para se verificar se as variações encontradas entre as duas concentrações de cafeína e o controle eram devidas ao acaso. Após isso as médias do controle e de cada uma das concentrações de cafeína foram analisadas através do Teste de Tukey, para se verificar se a diferença entre as médias eram significativas. Com exceção da duração do período larval até a fase de pré-pupa, verificada para o controle e para a concentração de 15µg/g, para ambos os testes os valores encontrados foram significativos ao nível de 1%. Isto é, houve diferença significativa entre os períodos analisados entre o controle e as concentrações de cafeína.

A viabilidade entre as pupas foi de 89,47% para o controle, 98,08% para 15 µg e 100% para 150 µg. A frequência de fêmeas e machos entre os tratamentos foi de aproximadamente 1:1. Todos os intervalos observados foram diferentes daqueles verificados por GREENBERG & SZYSKA (1984) e BONATTO (1996), o que se deve,

provavelmente, ao tipo de alimentação e as condições ambientais apresentadas na casa de criação.

LEAL *et al.* (1982) compararam o desenvolvimento larval de *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) quando alimentadas em quatro tipos diferentes de dieta: leite em pó (STOFFOLANO, 1974); leite em pó+caseína (SINGH, 1977); leite em pó+ovo liofilizado e carcaças de rato. Dentre as dietas artificiais a de leite em pó+ovo liofilizado desenvolvida por LEAL *et al.*, (1982) é a que contém mais proteína (5,8%). Neste estudo foi verificado que o peso atingido pelas larvas criadas nas diferentes dietas foi diferente, assim como a velocidade de desenvolvimento. As larvas criadas nas carcaças de rato se desenvolveram mais rapidamente e atingiram um peso maior do que aquelas criadas em dieta artificial.

GREENBERG & SZYSKA (1984) e BONATTO (1996) criaram *S. chlorogaster* em tipos diferentes de dieta e em temperaturas diferentes. O primeiro criou as larvas em carcaças em temperatura ambiente variando entre 13,7-24,8°C e o segundo em dieta artificial desenvolvida por LEAL *et al.* (1982) em temperatura de 27°C (condições controladas). Para estes autores o intervalo entre o ovo e a emergência do adulto foi, respectivamente, 22,84-26,44 dias e 19,97 dias.

A cafeína é um alcalóide assim como a cocaína e ambas possuem efeito estimulante. Foi verificado por GOFF *et al.* (1989) que a cocaína atua acelerando o desenvolvimento de *Boettcherisca peregrina*. Entretanto, apesar desta observação ter sido confirmada, no que se refere ao período larval das larvas criadas na concentração de 150 µg/g, no presente trabalho foi verificado que a presença de cafeína parece atuar prolongando o intervalo entre o período pré-pupa e a emergência do adulto de *Sarconesia chlorogaster*.

A ação inibitória da cafeína no desenvolvimento de artrópodes já havia sido descrita por outros autores em trabalhos sem relação com a área forense. Nestes, foi verificado que a cafeína pode atuar inibindo o desenvolvimento larval de *A. aegypti* (LARANJA *et al.*, 2006) e em *X. fornicatus* atua inibindo a oviposição e retardando diferentes estágios do ciclo de vida (HEWAVITHARANAGE *et al.*, 1999).

Para a elaboração da estimativa de IPM presume-se que os insetos, particularmente as larvas de dípteros, se desenvolverão em velocidades previsíveis,

de acordo com as condições climáticas (GOFF *et al.*, 1994). Entretanto, como verificado em diversos trabalhos, esta regularidade do desenvolvimento pode ser prejudicada quando estes insetos acabam ingerindo substâncias químicas presentes nos tecidos.

Neste estudo preliminar foi verificado que não apenas a concentração plasmática letal, mas também 1/10 desta foi capaz de atuar prolongando o período correspondente ao intervalo pré-pupa até a emergência do adulto.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cafeína mostrou interferir diminuindo o intervalo entre a larva de 1^o instar até a fase de pré-pupa e prolongando o intervalo entre a fase de pré-pupa e a emergência do adulto.

A repetição deste estudo faz-se necessária em condições controladas de temperatura, umidade relativa e luminosidade. Há também que se realizar observações mais precisas, ou seja, em intervalos de tempo mais curtos, para que os resultados sejam confirmados. Além disso, para que haja relevância forense, deve ser realizado um experimento utilizando-se ao invés de dieta artificial, algum organismo modelo, como, por exemplo, *Rattus norvegicus* (Berkenhout), *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus) ou *Sus scrofa* (Linnaeus) para que se verifique se os metabólitos da cafeína podem produzir os mesmos efeitos observados neste estudo preliminar.

2.5 REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, A. A.; ARANDA, J. V.; NEIMS, A. H. **Caffeine metabolism in the newborn.** Clin. Pharm. Ther. 25: 447-453, 1979.
- BASELT, R. C. **Disposition of toxic drugs and chemicals in man.** Biomedical Publications, 7^aed. Foster City, CA, pp. 157-159, 2004.
- BAUMGARTNER, D. L. & GREENBERG. **Distribution and medical ecology of the blow flies (Diptera: Calliphoridae) of Peru.** Ann. Entomol. Soc. Am., 78(5):565-587, 1985.
- BONATTO, S. R. **Ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae), criada sob condições de laboratório em dieta artificial.** Revista Brasileira de Zoologia 13(3): 685-706, 1996.
- BOUREL, B.; HEDOUIN, V.; MARTIN-BOUYER, L.; BECART, A. TOURNEL, G.; DEVEAUX, M. & GOSSET, D. **Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae).** J. Forensic Sci. 44: 354-358, 1999.
- CIOBOTARI, G. V. & BARA I. I. **The coffeine effect on *Drosophila melanogaster* individuals.** Analele Stiintifice ale Universitatii "Al I Cuza" din Iasi Serie Noua Sectiunea II a Genetica si Biologie Moleculara. 3: 131-132, 2002.
- FERREIRA, M. J. DE M. **Sinantropia de dípteros muscóideos de Curitiba, Paraná I. Calliphoridae.** Revta. Bras. Biol., 38 (2): 445-454, 1978.
- FREIRE, O. **Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia.** Gazeta Médica da Bahia, 46 (3):110-125, 1914.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; HEWDIKARAM, K. A. & OMORI, A. I. **Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications to the estimation of postmortem intervals using arthropod developmental patterns.** J. Forensic Sci. 36(2): 537-542, 1991.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I. & LA POINTE, D. A. **Preliminary observations of the effect of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications to this effect to estimation of postmortem interval.** J. Forensic Sci., 38: 316-322, 1993.

- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I. & LA POINTE, D. A. **Preliminary observations of the effects of phencyclidine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae).** J. Forensic Sci., 39 (1): 123-128, 1994.
- GREENBERG, B. & SZYSKA, M. L. **Immature Stages and Biology of Fifteen Species of Peruvian Calliphoridae (Diptera).** Ann. Entomol. Soc. Am., 77: 488-517, 1984.
- GREEN, P. W. C.; SIMMONDS, M. S. J. & BLANEY, W. M. **Toxicity and behavioural effects of diet-borne alkaloids on larvae of the black blowfly, *Phormia regina*.** Medical and Veterinary Entomology.16(2): 157-160, 2002.
- HEWAVITHARANAGE, P.; KARUNARATNE, S. & KUMAR, N. S. **Effect of caffeine on shot-hole borer beetle (*Xyleborus fornicatus*) of tea (*Camellia sinensis*).** Phytochemistry(Oxford).51(1): 35-41, 1999.
- HOLMGREN, P.; NORDÉN-PETTERSON, L. & AHLNER, J. **Caffeine fatalities – four cases reports.** Forensic Sci. International, 139: 71-73, 2003.
- INTRONA, F. JR.; CAMPOBASSO, C. P. & GOFFI, M. L. **Entomotoxicology.** Forensic Sci. International, 120: 42-47, 2001.
- ITOYAMA, M. M. & CAMPOS-BICUDO, H. E. M. **Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity, development time and longevity in *Drosophila prosaltans*.** Revista-Brasileira-de-Genetica.15(2): 303-321, 1992.
- KERRIGAN, S. & LINDSEY, T. **Fatal caffeine overdose: two case reports.** Forensic Sci. International, 153: 67-69, 2005.
- LARANJA, A. T.; MANZATO, A. J. & MELARA-DE-CAMPOS-BICUDO, H. E. **Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*.** Revista-de-Saude-Publica.40(6): 1112-1117, 2006.
- LEAL, T. T. DE S.; A. P. DO PRADO & ANTUNES, A. J. **Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wieddemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets.** Revta. Bras. Zoologia, 1(1): 41-44, 1982.
- MANHOFF, D. T.; HOOD, I.; CAPUTO, F.; PERRY, J., ROSEN, S. & MIRCHANDANI, H. G. **Cocaine in decomposed human body: variables and observations in case and experimental field studies.** J. Forensic Sci., 35 (1): 103-111, 1991.
- MCCUSKER, R. R.; GOLDBERGER, B. A. & CONE, E. J. **Caffeine content of specialty coffees.** J. Anal. Toxicol., 27 (7): 520-522, 2003.

- MOFFATT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. & GALLICHET, L. Y. **Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem materials**, 3^a ed., Pharmaceutical Press, London, pp736-738, 2004.
- MOHAMED, P. & NAIR, V. R. **Effect of caffeine on the different developmental stages of *Drosophila melanogaster***. Proceedings of the Indian National Science Academy Part B, Biological Sciences. 57(2): 141-145, 1991.
- MOHAMED, P., & NAIR, V. R. **Effect of caffeine on wing morphogenesis in *Drosophila melanogaster***. Entomon. 26(1): 87-90, 2001.
- MONTEIRO-FILHO, E. L. A. & PENEREIRO, J. L. **Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil**. Revista Brasileira de Biologia, 47 (3): 289-295, 1987.
- MOURA, M. O.; CARVALHO, C. J. B. & MONTEIRO-FILHO, E. L. A. **Insetos de possível uso medico legal em Curitiba, Paraná**. Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Zoologia. Porto Alegre: 123, 1995.
- O'CONNELL, S. E.; ZURZOLA, F. J. **Rapid quantitative liquid chromatographic determination of caffeine levels in plasma after oral dosing**. J. Pharm. Sci., 73 (7) 1009-1011, 1984.
- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios**. Editora Millenium, Campinas-SP, 2003.
- RIESELDMANN, B.; ROSENBAUM, F.; ROSCHER, S. & SCHNEIDER, V. **Fatal caffeine intoxication**. Forensic Sci. International, 103: 49-52, 1999.
- SINGH, P. **Artificial foods for the batfly *Mystacinobia zelandica* Holloway (Diptera: Calliphoridae)**. N. Z. J. Zool. 4(3): 331, 1976.
- SOUZA, A. M. **Sucessão Entomológica na decomposição da carcaça animal, com ênfase nas famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera)**. 96p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 1994.
- STOFFOLANO, J. G. JR. **Influence of diapause and diet on the development of the gonads and accessory reproductive glands of the Black blowfly *Phormia regina* (Meign)**. Can. J. Zool., 52: 981, 1974.
- WINEK, C. L.; WAHBA, W. W.; WINEK JR. & WINEK BALZER, T. **Drug and chemical blood-level data 2001**. Forensic Sci. International, 122: 107123, 2001.