

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Lucila Maria Lopes de Carvalho

DETECÇÃO E EFEITO DE DROGAS NO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS
IMATURAS E ADULTAS DE CHRYSOMYA ALBICEPS (WIEDEMANN) E
CHRYSOMYA PUTORIANA (WIEDEMANN) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE),
DUAS MOSCAS VAREJEIRAS DE INTERESSE FORENSE

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor em
Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Arício Xavier Linhares

Campinas
2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	UNICAMP
	C253d
V	EX
TOMBO BC/	62995
PROC.	16.00086.05
C	<input type="checkbox"/>
	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	13/04/05
Nº CPD	

BIBID- 347096

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C253d

Carvalho, Lucila Maria Lopes

Detecção e efeito de drogas no crescimento e desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), duas moscas varejeiras de interesse forense / Lucila Maria Lopes de Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Arício Xavier Linhares

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

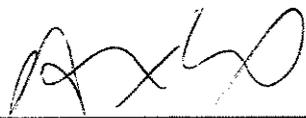
1. Mosca-varejeira. 2. Drogas. 3. Toxicologia.

I Linhares, Arício Xavier. II Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III Título.

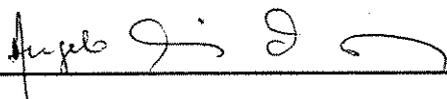
Data da defesa: 25/01/2005

Banca Examinadora

Prof. Dr. Arício Xavier Linhares (Orientador)



Prof. Dr. Angelo Pires do Prado



Profa Dra. Sônia Valéria Pinheiro Malheiros Marques Fernandes



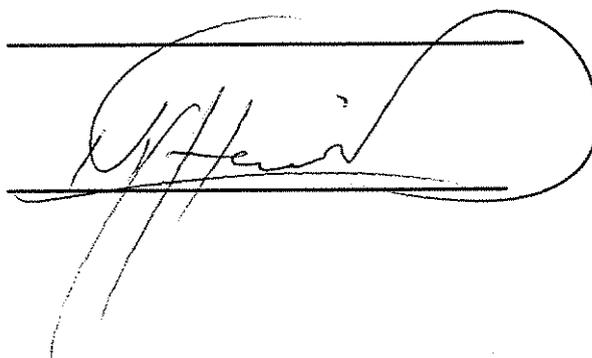
Prof. Dr. Wesley Augusto Conde de Godoy



Prof. Dr. Fortunato Antonio Badan Palhares

Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben

Prof. Dr. Mohamed Ezz El Din Mostafa Habib



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Arício X. Linhares pela orientação;

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo pelas exaustivas horas de tentativas, erros e acertos e sugestões durante os experimentos;

Ao Prof. Dr. Madison L. Goff pela confiança em meu trabalho e incentivo;

Aos professores da banca;

Aos Departamentos de Parasitologia e Zoologia pela oportunidade;

Aos docentes, funcionários e colegas do Departamento;

A Maria pela participação e amizade;

Ao Paulo E. Rubbo pela paciência, participação e amizade;

A Karina e ao Paiva pelo incentivo e colaboração;

Aos técnicos Ivo, João, Nilson e Daniel pela colaboração e dedicação;

Aos motoristas do Instituto;

A FAPESP pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Landinha que me incentivaram a todo o momento e que tiveram toda a paciência do mundo com o Daniel para eu poder terminar a tese;

Ao meu marido Luiz Rubens pelo apoio técnico;

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos para aqueles que não foram citados mas de alguma forma colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

E a Deus, o verdadeiro mestre e doutor da vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
REFERÊNCIAS	16
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO I . DETERMINATION OF DRUG LEVELS AND THE EFFECT OF DIAZEPAM ON THE GROWTH OF NECROPHAGOUS FLIES OF FORENSIC IMPORTANCE IN SOUTHEASTERN BRAZIL	25
CAPÍTULO II - O EFEITO DA COCAÍNA NO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS IMATURAS E ADULTAS DE <i>CHRYSOMYA ALBICEPS</i> E <i>CHRYSOMYA PUTORIA</i> , DUAS MOSCAS VAREJEIRAS DE INTERESSE FORENSE	38
2.1 Material e métodos	39
2.2. Experimento com dípteros	40
2.2.1 Análise estatística	40
2.3 Purificação da cocaína	41
2.4 Resultados	41
2.5 Discussão	47
2.6 Conclusão	50
2.7 Referência bibliográfica	50
CAPÍTULO III – QUANTIFICAÇÃO E EFEITO DA ANFEPRAMONA NO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS IMATURAS E ADULTAS DE <i>CHRYSOMYA ALBICEPS</i> E <i>CHRYSOMYA PUTORIA</i> , DUAS MOSCAS VAREJEIRAS DE INTERESSE FORENSE	53
3.1 Material e métodos	55

3.2. Experimento com dípteros	56
3.2.1 Análise estatística	56
3.3 Preparação e extração da anfepramona das amostras de tecidos de coelhos e de dípteros	57
3.3.1 Preparação da curva padrão	57
3.3.2 Análise no GC-MS das amostras	58
3.4 Resultados	58
3.5 Discussão	64
3.6 Conclusão	68
3.7 Referência bibliográfica	69
CAPÍTULO IV – QUANTIFICAÇÃO E EFEITO DA <i>Cannabis sativa</i> L. NO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS IMATURAS E ADULTAS DE <i>CHRYSOMYA ALBICEPS</i> E <i>CHRYSOMYA PUTORIA</i> , DUAS MOSCAS VAREJEIRAS DE INTERESSE FORENSE	72
4.1 Material e métodos	72
4.2. Experimento com dípteros	73
4.2.1 Análise estatística	74
4.3 Preparação e extração da <i>Cannabis sativa</i> (princípio ativo)	74
4.3.1 Preparação e extração da <i>Cannabis sativa</i> das amostras de tecidos de coelhos e de dípteros	75
4.3.2 Análise no GC-MS das amostras	75
4.4 Resultados	76
4.5 Discussão	81
4.6 Conclusão	84
4.7 Referência bibliográfica	84
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
5.1 Referência bibliográfica	92

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO I

- Table 1. Larvae weight (mg) means of *Chrysomya albiceps* related to time of exposure (hours) on rabbit liver containing diazepam and control (\pm sd) 34
- Table 2. Larvae weight (mg) means of *Chrysomya putoria* related to time of exposure (hours) on rabbit liver containing diazepam and control (\pm sd) 34
- Table 3. Time of pupariation (hours) of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* larvae which were exposed to liver containing diazepam and control (\pm sd) 35
- Table 4. Time of emergence (hours) of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* larvae which were exposed to liver containing diazepam and control (\pm sd) 35
- Table 5. Percentage of larval and pupal mortality and non-emerged adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (\pm sd) 36
- Table 6. Diazepam quantification (μ g/ml) in samples of rabbit tissues and fly specimens through of GC-MS analysis 36
- Figure 1. Rates of development of maggots of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* reared on liver tissues from rabbits containing diazepam ($C_a = C. albiceps$, $C = C. putoria$) 37

CAPÍTULO II

- Tabela II -1. Peso das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição no fígado de coelho contendo cocaína ($\bar{x} \pm dp$) 42
- Tabela II - 2. Tempo de pupariação (em horas) das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado à exposição à cocaína e grupo controle ($\bar{x} \pm dp$) 43
- Tabela II - 3. Tempo de pupariação (em horas) de cada espécie de larva de mosca exposta a cocaína($\bar{x} \pm dp$) 44
- Tabela II - 4. Tempo de emergência (em horas) de cada espécie de mosca exposta a cocaína ($\bar{x} \pm dp$) 44
- Tabela II - 5. Mortalidade larval, pupal e adultos não emergidos para cada espécie de mosca relacionada à cocaína ($\bar{x} \pm dp$) 45
- Tabela II – 6. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya albiceps* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de cocaína 46
- Tabela II - 7. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya putoria* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de cocaína 46

CAPÍTULO III

- Tabela III - 1. Peso das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição no fígado de coelho contendo anfepramona ($\bar{x} \pm dp$) 59
- Tabela III - 2. Tempo de pupariação (em horas) das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado à exposição à anfepramona e ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$) 60
- Tabela III - 3. Tempo de pupariação (em horas) de cada espécie de larva de mosca exposta a anfepramona ($\bar{x} \pm dp$) 60
- Tabela III - 4. Tempo de emergência (em horas) de cada espécie de mosca exposta a anfepramona ($\bar{x} \pm dp$) 61
- Tabela III - 5. Mortalidade larval, pupal e adultos não emergidos para cada espécie de mosca relacionada à anfepramona ($\bar{x} \pm dp$) 61
- Tabela III – 6. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya albiceps* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de anfepramona 62
- Tabela III - 7. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya putoria* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de anfepramona 62

- Tabela III - 8. Concentração de anfepramona detectada em amostras dos coelhos que receberam a droga em relação à concentração encontrada na curva de calibração pela análise no GC-MS 63
- Tabela III - 9. Concentração de anfepramona detectada em amostras de larvas, pupários e adultos de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* em relação à concentração encontrada na curva de calibração pela análise no GC-MS 64

CAPÍTULO IV

- Tabela IV - 1. Fracionamento dos canabinóides e metabólitos na coluna de Sephadex LH-20 76
- Tabela IV - 2. Peso das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição no fígado de coelho contendo maconha ($\bar{x} \pm dp$) 77
- Tabela IV - 3. Tempo de pupariação (em horas) das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado a exposição à maconha e grupo controle ($\bar{x} \pm dp$) 78
- Tabela IV- 4. Tempo de pupariação (em horas) de cada espécie de larva de mosca exposta a maconha ($\bar{x} \pm dp$) 78
- Tabela IV - 5. Tempo de emergência (em horas) de cada espécie de mosca exposta à maconha ($\bar{x} \pm dp$) 79
- Tabela IV - 6. Mortalidade larval, pupal e de adultos não emergidos para cada espécie de mosca relacionada à maconha ($\bar{x} \pm dp$) 79

- Tabela IV - 7. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya albiceps* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de maconha 80

- Tabela IV - 8. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya putoria* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de maconha 80

- Tabela IV - 9. Concentração de maconha detectada em amostras de coelho em relação à concentração encontrada na curva de calibração pela análise no GC-MS 81

- Tabela IV - 10. Concentração de maconha detectada em amostras de larvas, pupários e adultos de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* em relação à concentração encontrada na curva de calibração pela análise no GC-MS 81

ÍNDICE DE ANEXOS

- Figura A - 1. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya albiceps* criadas em tecidos contendo cocaína 94
- Figura A - 2. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya putoria* criadas em tecidos contendo cocaína 94
- Figura A - 3. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya albiceps* criadas em tecidos contendo anfepramona 95
- Figura A - 4. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya putoria* criadas em tecidos contendo anfepramona 95
- Figura A - 5. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya albiceps* criadas em tecidos contendo maconha 96
- Figura A - 6. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya putoria* criadas em tecidos contendo maconha 96
- Figura A -7. Peso das larvas de *Chrysomya albiceps* relacionado ao tempo (em horas) de exposição nos fígados de coelhos contendo as drogas utilizadas no experimento($\bar{x}\pm dp$) 97
- Figura A - 8. Peso das larvas de *Chrysomya putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição nos fígados de coelhos contendo as drogas utilizadas no experimento ($\bar{x}\pm dp$) 98

- Figura A - 9. Tempo de pupariação (início e fim) de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* em relação às drogas utilizadas nos 4 experimentos 99
- Figura A - 10. Tempo de emergência de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* em relação às drogas utilizadas nos 4 experimentos 100
- Figura A - 11. Mortalidade larval, pupal e adultos não emergidos para *Chrysomya albiceps* relacionados às drogas utilizadas ($\bar{x} \pm dp$) 101
- Figura A - 12. Mortalidade larval, pupal e adultos não emergidos para *Chrysomya putoria* relacionados às drogas utilizadas ($\bar{x} \pm dp$) 102
- Figura A - 13. Concentração de anfepramona nas amostras de coelhos analisadas em GC-MS 103
- Figura A - 14. Concentração de anfepramona nas amostras de dípteros analisadas em GC-MS 103
- Figura A - 15. Área obtida de maconha nas amostras de coelhos analisadas em GC-MS 104
- Figura A - 16. Área obtida de maconha nas amostras de dípteros analisadas em GC-MS 104

RESUMO

A análise toxicológica de formas imaturas e adultas de insetos como amostra biológica, contribui em investigações criminais para uma estimativa do tempo de morte mais acurada e permite confirmar a presença ou ausência de substâncias químicas no cadáver.

Duas espécies de moscas varejeiras, *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) foram selecionadas para o presente estudo e colonizadas em laboratório. Tais espécies foram escolhidas por serem úteis nas investigações médico-legais, haja vista, sua abundância e frequência, tanto de imaturos como de adultos, em carcaças e cadáveres em decomposição, sendo consideradas boas indicadores forenses (MOURA *et alli*, 1997; CARVALHO & LINHARES, 2001). Diazepam, cocaína, anfepramona e maconha foram as drogas utilizadas nos experimentos por serem amplamente consumidas em nosso país. O coelho comum foi utilizado como animal teste e foi submetido à concentração 2x letal de cada droga. Os animais foram sacrificados e sangue, fígado, coração, pulmão e urina foram coletados para a análise toxicológica, que foi feita utilizando-se um aparelho de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS). Uma parte do fígado foi utilizada como meio de criação das larvas de moscas durante um período de 54 horas. Durante esse período foram pesadas de 6 em 6 horas, sendo posteriormente coletadas e analisadas. Amostras de pupários e adultos também foram analisadas toxicologicamente. Fatores como tempo de desenvolvimento e crescimento das larvas, mortalidade e longevidade dos adultos foram estudados.

Todas as drogas testadas influenciaram as fases de desenvolvimento das espécies estudadas, acelerando ou retardando tais fases, agindo de forma mais visível em algumas fases do que em outras. Foi possível detectar a presença de drogas tanto nas amostras biológicas dos coelhos como na dos dípteros. Os dados obtidos confirmam a relevância da utilização dos insetos nas investigações legais.

ABSTRACT

The toxicological analysis of biological samples such as immature stages and adults of insects can contribute to criminal investigations to improve the estimate the *post mortem* interval and to determine the absence or presence of a drug in the corpse.

Two blow fly species: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) were selected to the studies. Colonies of these two flies were established in the laboratory. These species were chosen because they are commonly found visiting and breeding in decomposing corpses and carcasses, being, therefore, of forensic importance (MOURA *et alli*, 1997; CARVALHO & LINHARES, 2001). Diazepam, cocaine, anphepramone and marijuana were the drugs chosen for the experiments because of their heavy consumption among drug users in Brazil.

Rabbits were used as test animals and were submitted to twice the lethal dosages of different drugs to study the effects of these drugs on the development of the flies. Heart, liver, blood, and urine samples were taken for chromatographic analyse using a GC-MS equipment. A liver sample was used to rear the maggots and from hours 0 to 54 of exposition, larvae feeding on tissues were weighted and analysed. The time required for pupariation and adult emergence was also determined. Some factors such as developmental time, mortality and longevity were also determined.

All drugs influenced the developmental stages of both fly species, accelerating or delaying these stages related to control the flies. It was possible to detect the drug presence in fly and rabbit samples. The data confirm the importance of these insects as tools in criminal investigations.



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artrópodes estão amplamente distribuídos pelo mundo, e, dentre estes, os insetos representam uma grande porcentagem e estão adaptados a vários ambientes como o aquático ou terrestre e a diferentes altitudes e latitudes (LORD & GOFF, 1990).

A entomologia pode ser aplicada em três diferentes categorias (LORD & STEVENSON, 1986):

- urbana, relacionada às pestes dos animais e/ou dos homens e pragas de plantas;
- de produtos estocados, relacionada aos cereais, mantimentos ou até mesmo a bebida;
- médico-legal ou forense, ligada inclusive à patologia ou toxicologia forense

A entomologia forense significa então o estudo dos insetos que interagem com os acontecimentos do âmbito pericial legal.

Uma vez que os artrópodes são o maior e mais diverso grupo zoológico, eles podem ser encontrados em uma grande variedade de locais incluindo cenas de crime. Isto é a porta de entrada para sua aplicação na investigação criminal (BENECKE, 2001).

O potencial de contribuição dos insetos para as investigações periciais é conhecido por pelo menos 700 anos, mas, apenas recentemente a entomologia foi reconhecida definitivamente como um campo da ciência forense.

O primeiro caso documentado de entomologia forense é reportado na China pelo advogado e investigador Sung Tzu no século 13 num livro texto chamado "The washing away of wrongs". Ele descreve o caso de uma morte por golpes de foice perto de um campo de arroz. No dia seguinte do assassinato, o investigador pediu que todos os trabalhadores colocassem suas foices no chão. As moscas eram atraídas por uma foice em comum, que possuía traços de sangue. E o proprietário confessou o crime (BENECKE, 2001). Além disso, médicos legistas, escultores, pintores e poetas já evidenciaram a decomposição de corpos humanos, detalhando em particular a atividade das larvas. No século 15, é notificado o trabalho "Dances of the Dead", e no século 16, "Skeleton in the Tumba". Em 1767, o biólogo Carl von Linné reportou que três moscas poderiam destruir um cavalo tão rápido quanto um leão! O poema "Une Charogne" do poeta francês Charles

Baudelaire (1821-1867) deve ser mencionado, uma vez que ele contém claras observações de decomposição de cadáveres humanos, incluindo uma acurada referência ao som da massa de larvas nos corpos. Durante exumações realizadas na França e Alemanha nos séculos 18 e 19, legistas observaram que corpos enterrados eram habitados por várias espécies de artrópodes. Em 1831, o famoso médico francês Orfila verificou também em exumações que os insetos desempenhavam grande papel na decomposição dos corpos (BENECKE, 2001).

O relato do primeiro caso moderno de entomologia forense utilizando a estimativa do tempo de morte foi feito pelo médico francês Bergeret em 1855. Em 1879, o presidente da Sociedade Francesa de Medicina Forense, publica um novo caso, sendo que Perier e Mégnin auxiliam na identificação das espécies. Mégnin calculou ainda as possíveis gerações de ácaros e quando abandonariam o corpo, passou a pesquisar o ciclo de vida dos insetos e em 1894 publicou o seu principal livro "La faune des cadavres". O primeiro estudo sistemático de entomologia forense foi feito em 1881 pelo alemão Reinhard. Klingelhoffer, Maschka e Horoskiewicz, também alemães, trabalharam em casos envolvendo mordidas de baratas e formigas. Um dos casos foi interessante, haja vista que um bebê morreu e o pai foi acusado de envenenar a criança, permanecendo na prisão durante 3 semanas, entretanto, após o laudo dos médicos, a lesão encontrada na boca do bebê era consequência da ação da barata e não de veneno e o pai foi inocentado. O legista Eduard von Niezabitowski trabalhou com fetos resultantes de abortos de gato, raposa, rato, toupeira e boi. Com isso, sua contribuição foi fundamental para provar que cadáveres humanos apresentam a mesma fauna que carcaças animais, sendo esta de invertebrados ou vertebrados. Em 1907, Claude Morley publicou um artigo no Reino Unido, tentando selecionar as espécies necrófagas de besouros. Nos anos 20, as espécies de insetos de importância forense foram listadas e catalogadas, com o foco na ecologia, metabolismo ou anatomia. Nos anos 30, 40 e 50 poucos casos foram relatados. Porém, entre 1960 e 1980 a entomologia forense tomou novo fôlego, principalmente pela atividade do médico belga Marcel Leclecq e do biólogo finlandês Pekka Nuorteva (BENECKE, 2001). Desde então, a aplicação da entomologia em investigações legais tem se tornado rotina em países como os Estados Unidos, Canadá, França, Japão, Inglaterra,

entre outros. E grandes nomes surgiram como Bernard Greenberg, Madison L. Goff, Jeffrey D. Wells, etc.

Centenas de espécies de artrópodes são atraídas para uma carcaça, primeiramente adultos de moscas, besouros e suas larvas, e também ácaros, opiliões, e nematóides. Depois dos fungos e bactérias, os insetos são os mais importantes decompositores de carcaças animais e/ou humanas. Esses animais se alimentam, vivem ou se reproduzem na carcaça, dependendo de suas preferências biológicas e do estágio de decomposição (ABBOT, 1937; DEONIER, 1940; MOURA *et alii*, 1997; BENECKE, 2004). Diferenças evidentes foram observadas no processo de decomposição de carcaça, de acordo com a presença ou ausência de artrópodes (PAYNE, 1965). Estudos demonstraram que carcaças expostas sem nenhuma proteção, perderam cerca de 90% de seu peso em uma semana, enquanto carcaças cobertas e protegidas contra a ação de insetos, gradualmente secaram e se tornaram mumificadas num período maior que 100 dias (LORD & GOFF, 1990).

A entomologia forense pode ser baseada na sucessão entomológica, onde as várias espécies de insetos chegam em diferentes intervalos de tempo numa carcaça ou cadáver, ocasionando uma substituição e/ou adição gradual ou abrupta de espécies (NUORTEVA, 1977; WATANABE, 1985; SMITH, 1986). A sucessão também está relacionada com os estágios de decomposição da carcaça, uma vez, que as espécies apresentam certa preferência por determinados estágios (CARVALHO & LINHARES, 2001). Os insetos adultos são atraídos para a carcaça em todos os cinco estágios de decomposição (BORNEMISSZA, 1957), mas várias espécies visitam-na apenas durante estágios específicos (GODDARD & LAGO, 1985; CARVALHO *et alii*, 2004), sugerindo a preferência pelos estágios e, possivelmente, amenizando uma competição. A competição gerada na carcaça é importante para a comunidade que a compõe, e isto acaba gerando um certo grau de dominância de espécies na comunidade (HANSKI & KUUSELA, 1977). As diferentes famílias e espécies só conseguem coexistir no ambiente de carcaça, devido à capacidade de cada uma se especializar em diferentes estratégias de exploração do recurso (DENNO & COTHRAN, 1975).

Uma carcaça pode ser utilizada como fonte de nutrição ou substrato para oviposição das formas imaturas (NORRIS, 1965). Os adultos podem detectar uma carcaça pelo odor até longas distâncias. O odor liberado por uma carcaça muda com a forma de decomposição do corpo, tornando-se mais atrativo para algumas espécies e menos atrativo para outras (NUORTEVA, 1977). A visão, coloração e a presença de outros fatores específicos da carcaça também contribuem para a sua detecção (HALL *et alii*, 1995). Após a detecção do corpo, a oviposição é estimulada pela presença de compostos ricos em amônia, bem como ferormônios e estímulos táteis (ASHWORTH & WALL, 1994). Embora algumas espécies da família Piophilidae e Muscidae apresentem preferência por estágios avançados de decomposição a maioria das fêmeas de dípteros não ovipõem em tecidos desidratados ou mumificados, pois tanto ovos como larvas necessitam de líquidos ou tecidos moles para se desenvolver (INTRONA & CAMPOBASSO, 2000). A oviposição ocorre primeiramente nos orifícios naturais ou nas lesões. O tamanho da carcaça parece afetar a atratividade pelo menos para espécies das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (THYSSEN, 2000). Porém, nem todas espécies necrófagas preferem carcaças grandes; algumas ovipõem preferencialmente em carcaças pequenas. Sabe-se também que fatores como se o corpo está ou não enterrado, carbonizado, com ou sem vestimenta, em ambiente fechado ou aberto, influenciam ou restringem o acesso dos insetos (ROGRIGUEZ & BASS, 1985; SMITH, 1986; GOFF, 1991). O fato de cadáveres estarem expostos em ambientes fechados ou enterrados, usualmente restringe o acesso de muitos insetos necrófagos, mas não para pequenas dípteros, como a *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Phoridae), *Ophyra* sp Robineau-Desvoidy (Diptera: Muscidae), *Conicera tibialis* Schmitz (Diptera: Phoridae) entre outras, que são encontradas freqüentemente em corpos exumados (CAMPOBASSO *et alii*, 2004; BOUREL *et alii*, 2004). Ainda, algumas espécies são encontradas indistintamente em áreas urbanas e rurais, enquanto outras são muito específicas para certos habitats (CATTS & HASKELL, 1997; CARVALHO & LINHARES, 2001; RIBEIRO, 2003; TAVARES, 2003).

Corpos com lesões, traumas e/ou extravasamento de sangue atraem imediatamente insetos adultos pois são locais ideais para postura e desenvolvimento das larvas e se decompõem mais rapidamente em consequência da presença e do número de

insetos. Entretanto, corpos cujo acesso é difícil ou restrito aos insetos necrófagos, se decompõem mais lentamente uma vez que a velocidade da decomposição é reduzida pela ausência dos insetos (MANN *et alii*, 1990). No Brasil, OLIVEIRA-COSTA *et alii* (2001) verificaram a influência de diferentes fatores na frequência de dípteros em cadáveres e constataram que a presença ou ausência de vestimenta ou cobertura não foi significativa, as condições climáticas bem como o tipo de ambiente (interno ou externo) foram significativos, mas a presença de sangue foi altamente significativa quando relacionada com a frequência dos insetos. Quase todos (97%) os corpos que apresentaram extravasamento sangüíneo tiveram insetos coletados.

Muitas vezes, baratas, formigas e outros animais produzem abrasões na pele que podem ser confundidas por exemplo com sinais de envenenamento (ácido sulfúrico) ou orifícios causados por violência (KLINGELHOFFER, 1898 in BENECKE, 2004). Artrópodes aquáticos principalmente pequenos crustáceos produzem pequenas lesões que destroem as camadas da pele de partes do corpo que ficam expostas ou não estão cobertas por roupas.

Além dos fatores climáticos, geográficos e o tamanho da carcaça um outro fator que afeta o desenvolvimento e a sobrevivência dos insetos é a presença de parasitas e parasitóides. Algumas espécies de himenópteros têm sido encontradas parasitando larvas e ou pupas de moscas necrófagas e este acontecimento é de singular importância, pois pode alterar o seu desenvolvimento causando até mesmo a morte e conseqüentemente influenciando os dados para a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) (TURCHETTO & VANIN, 2004).

Particular importância é dada às moscas sarcossaprófagas pertencentes à família Calliphoridae, comumente conhecidas como varejeiras, e Sarcophagidae (Diptera) pois são os principais invertebrados consumidores de carcaças (REED, 1958; BRAACK, 1987), suas larvas são capazes de viver num meio semilíquido (LORD & GOFF, 1990), são geralmente os primeiros a chegar em pouco tempo após a morte e permanecem na carcaça durante os estágios de decomposição (CATTS & GOFF, 1992), embora a atratividade diminua quando o corpo se torna mumificado ou seco (NUORTEVA, 1977).

Os insetos são utilizados nas investigações criminais como evidência física em um julgamento e, ainda, auxiliam na determinação do local do crime, visto que algumas espécies têm distribuição geográfica e habitat específico. Até mesmo a ausência de insetos em situações em que eles deveriam estar presentes é uma grande evidência de que o corpo foi modificado ou mantido submerso, enterrado, congelado, etc (SMITH, 1986). Mas, eles podem principalmente contribuir para a estimativa do IPM. Essa estimativa envolve o intervalo máximo e mínimo de tempo entre a morte e a descoberta do corpo. Entretanto, segundo BENECKE (2004) tecnicamente isto não seria uma estimativa de intervalo de morte, uma vez que a pessoa pode ter morrido em condições que parcialmente restringe o acesso dos insetos. Com isso, o autor sugere a utilização do termo intervalo de colonização como sendo mais apropriado, mas neste trabalho manteremos o IPM.

A determinação do intervalo de morte pode ser feita por meio da sucessão entomológica ou pela aplicação do tempo do ciclo de vida dos insetos (CATTS, 1992). É possível estimar-se o IPM pela determinação do instar da larva e pelo tempo que ela leva para completar o seu ciclo, associados a valores de temperatura e fatores ambientais (ERZINÇLIOGLU, 1983; SMITH, 1986), entretanto, erros podem ocorrer na estimativa, desde que as larvas venham a ser dessecadas, congeladas ou contaminadas com substâncias químicas (NUORTEVA *et alli*, 1974; MICOZZI, 1986). Ademais, a presença de drogas nos tecidos pode interferir no resultado em consequência da alteração do tempo de desenvolvimento dos insetos que se alimentaram em tal tecido (GOFF *et alli*, 1991a). Uma determinação do IPM acurada é de suma importância em qualquer investigação forense relacionada à morte seja ela homicídio, suicídio, acidental ou de causa natural (INTRONA *et alli*, 1998).

Grande parte dos métodos usados para a estimativa está baseada na taxa ou padrão de desenvolvimento. Medidas do comprimento ou do peso seco da larva também podem revelar a idade dos imaturos quando comparados com um banco de dados (WELLS & La MOTTE, 1995). Um outro método bastante utilizado está relacionado com o acúmulo de calor em graus hora (ADH) ou graus dias (ADD), isto é, a quantidade total de calor requerido por uma espécie se desenvolver desde a oviposição até o estágio adulto

(KAMAL, 1958; GREENBERG, 1991; SOUZA, 1998; MARCHENKO, 2001; GREENBERG & KUNICH, 2002).

A maior vantagem da utilização dos artrópodes contra os métodos rotineiros para determinação do intervalo de morte recente é que os artrópodes podem ser uma medida eficaz quando os métodos tradicionais não podem ser utilizados, principalmente depois de aproximadamente 4-5 dias após a morte (BENECKE, 2004). Desta forma, usando-se técnicas médico-legais como temperatura do corpo, rigidez cadavérica, mancha verde abdominal e análise de livores, o tempo de morte pode ser apenas medido com eficácia nos dois ou três dias após a morte. Em contraste, pelo cálculo da idade/ tempo dos estágios imaturos dos insetos que se alimentam num corpo e analisando as espécies necrófagas presentes, o intervalo de morte de um dia até várias semanas pode ser estimado (AMENDT *et alii*, 2004).

Além da estimativa do tempo de morte, há inúmeras maneiras em que os artrópodes podem ser usados como evidência ou prova física em uma investigação, seja em casos onde a pessoa esteja viva ou morta (AMENDT *et alii*, 2004). Possíveis aplicações da entomologia forense incluem movimentação do corpo, identificação por DNA, artefatos (lesão no cadáver ou manchas de sangue), casos de negligência, identificação de suspeitos que tenham ligação com a cena do crime por apresentarem picadas ou lesões feitas por insetos específicos do local, a localização de uma lesão pode ser determinada por sítios de alimentação não usuais de imaturos e adultos e também na toxicologia. Em casos onde são encontrados apenas esqueletos ou o corpo está em má conservação, a análise dos insetos necrófagos ou de suas partes, pode significar a fonte qualitativa mais eficaz para uma informação toxicológica (GOFF & LORD, 2001).

É certo que fatores como o resfriamento do corpo, livores, rigidez, mancha verde abdominal, o exame de fundo de olho, entre outros, são utilizados primariamente para a estimativa do IPM. Porém, a fauna cadavérica tem um grande valor, não apenas pelas características supracitadas, mas também porque há vantagem no que diz respeito ao método e tempo de coleta de amostra. Os insetos podem ser coletados no local do crime, no cadáver, no necrotério, durante a necropsia, na geladeira ou até mesmo em uma exumação (CATTS & HASKELL, 1997).

A fim de se minimizar erros e aumentar a eficácia da utilização da entomologia forense, VON ZUBEN *et alii*, (1996) descreveram um modelo matemático baseado em equações de difusão para estudar a dispersão de larvas de 3º estágio na fase pós alimentar em moscas varejeiras pertencentes à família Calliphoridae. Nesta fase, as larvas tendem a abandonar o corpo para empuparem e se a dispersão não for considerada pode levar a uma estimativa errônea do IPM, visto que a não consideração de pupas localizadas a distâncias variáveis do cadáver acarretará na não inclusão de larvas mais antigas que abandonaram o cadáver para empupar.

Os insetos podem, assim ser considerados indicadores forenses seja para a estimativa do tempo de morte, local do crime, modo de morte, etc. Um bom indicador forense é aquele inseto que não apenas visita a carcaça utilizando-a como fonte protéica e sim aquele que deixa sua descendência, ou seja, que se cria no substrato, uma vez que se o corpo se encontrar em avançado estágio de decomposição, os adultos poderão não estar mais presentes (CARVALHO, 1996).

A entomotoxicologia estuda a aplicação dos insetos necrófagos na análise toxicológica a fim de se identificar drogas e toxinas presentes em um tecido. A entomotoxicologia também investiga o efeito causado por estas substâncias no desenvolvimento dos artrópodes para aumentar a precisão na estimativa do tempo de morte. O aumento de mortes relacionadas a drogas, principalmente heroína e cocaína, ou ainda mortes ligadas ao consumo acidental ou proposital de venenos ou substâncias tóxicas, justifica o grande interesse por esse novo ramo da medicina forense (INTRONA *et alii*, 2001).

A toxicologia pode ser encarada sob diversos aspectos. Na área forense, a investigação da substância “fatal” deve ser feita com um esforço cooperativo entre os investigadores, peritos, biólogos, químicos ou farmacêuticos. Tudo deve ser bem detalhado desde a cena do crime até ao laboratório de análises.

Além da detecção e quantificação, a diferenciação das amostras de drogas ilícitas é importante para a determinação da origem da substância e presença de metabólitos. A cocaína, por exemplo, apresenta uma origem natural: as folhas de coca e a caracterização de certos produtos naturais ou derivados presentes podem contribuir para a determinação

de uma origem comum ou diferente das amostras. Por outro lado, as amostras de anfetaminas ou metanfetaminas têm sido sintetizadas quimicamente e elas contêm produtos e resíduos químicos. Amostras de vários produtos manufaturados podem ser caracterizados pela detecção e quantificação de impurezas e contaminantes tais como adulterantes e diluentes (TANAKA *et alii*, 1994).

Nas últimas décadas, tem sido registrado um aumento no número de mortes relacionadas a drogas em vários países. Em muitos casos, tais mortes não são descobertas ou relatadas imediatamente às autoridades competentes e o corpo permanece em oculto por alguns dias ou mais (GOFF & LORD, 1994).

Sabe-se que há inúmeras técnicas e metodologias para a análise toxicológica, entretanto, existem dificuldades na aquisição da amostra e cada vez mais os insetos vêm sendo utilizados como recurso para a análise, pois apresentam vantagens e podem ser utilizados em vários casos (KINTZ *et alii*, 1990b; POUNDER, 1991):

- em virtude do longo tempo para a disponibilização das amostras, o material pode sofrer autólise e se decompor;
- as amostras não estão mais disponíveis pelo fato da avançada decomposição e esqueletização do corpo;
- material biológico pode estar alterado em conseqüência do modo de morte. Ex. morte decorrente de intoxicação por monóxido de carbono, ou ainda
- casos em que a família não permite que haja a retirada de sangue ou algum órgão, por questão de princípios religiosos; porém, nos casos forenses a família não tem autonomia, ficando o Estado responsável pelo cadáver.

Com isso, podemos dizer que quando não há elementos necessários para a realização da análise toxicológica e/ou o cadáver se encontra em estágio de decomposição avançada, os insetos também são utilizados, e são os responsáveis pela possibilidade de se detectar a ocorrência ou não de abuso de substâncias tóxicas, uma vez que eles apresentam uma relação direta com o cadáver ou carcaça e não poderia haver uma outra fonte de contaminação pela droga (BEYER *et alii*, 1980; KINTZ *et alii*, 1990a). Então, a análise dos insetos, especialmente larvas de dípteros, encontradas num corpo em decomposição pode servir não apenas para a estimativa do intervalo pós-morte

(IPM) e como indicador forense, mas também pode ser usada na identificação qualitativa de drogas ou substâncias estimulantes, soníferas, antidepressivas, etc (BEYER *et alii*, 1980).

Substâncias têm sido detectadas através de vários métodos de extração em larvas, pupas, pupários e adultos de dípteros bem como em material fecal de coleóptero (MILLER *et alii*, 1994). Além da detecção da droga através de técnicas cromatográficas, os insetos também podem contribuir para o estudo de metabolismo e detecção de substâncias através de métodos imuno-histoquímicos. Morfina foi detectada em larvas de 3º estágio de *Calliphora vomitoria* Linnaeus (Diptera: Calliphoridae) que se alimentaram em uma dieta contendo a droga através deste método. Os espécimens positivos demonstraram uma coloração específica da hemolinfa e uma intensa imunorreação na área localizada no limite entre a exocutícula e endocutícula. Esses resultados constituem uma evidência do acúmulo da morfina dentro da cutícula das larvas de dípteros durante o seu desenvolvimento (BOUREL *et alii*, 2001b).

A vantagem de usar a larva ao invés de tecidos de um cadáver, são os resultados encontrados na cromatografia, pois as larvas apresentam menos contaminantes do que os tecidos (KINTZ *et alii*, 1990b), e são de fácil coleta e manutenção. A análise de larvas de insetos coletadas de um corpo em decomposição para uma identificação qualitativa de droga foi primeiramente proposta por BEYER *et alii* (1980). Desde então, alguns pesquisadores estrangeiros, principalmente aqueles ligados ao “Federal Bureau of Investigation” (FBI), vêm desenvolvendo trabalhos com larvas, utilizando várias drogas e técnicas diferentes, e muitas vezes solucionando casos envolvendo homicídios, suicídios, seqüestros, entre outros (GUNATILAKE & GOFF, 1989; GOFF *et alii*, 1991a; GOFF *et alii*, 199; SADLER *et alii*, 1997; BOUREL *et alii*, 1999). Larvas de moscas têm sido utilizadas como amostras toxicológicas para detectar-se diversas substâncias como bromazepam, levomepromazine (KINTZ, 1990a), malation (GUNATILAKE *et alii*, 1989), fenobarbital, brazotam, oxazepam (KINTZ, 1990b), cocaína (GOFF *et alii*, 1989), morfina (BOUREL *et alii*, 2001), diazepam (CARVALHO *et alii*, 2001), entre outras.

NOLTE *et alii* (1992) trabalharam no primeiro caso forense registrado onde foi possível a detecção de cocaína e benzoilecgonina em larvas de moscas que se

alimentaram em um corpo de um homem em decomposição. O corpo foi encontrado quase totalmente esqueletizado e sem nenhuma lesão aparente. Qual seria a *causa mortis*? Segundo sua namorada ele poderia ter feito uso de cocaína e provavelmente teria desaparecido. Amostras de músculo da perna e larvas de moscas mortas foram coletadas e preparadas para análise cromatográfica e o resultado foi positivo para benzoilecgonina. A cocaína apresenta uma certa toxicidade e pode causar sérias manifestações fatais que incluem acometimento pulmonar, cerebral, cardíaco e intestinal. No caso descrito, o conhecimento destas circunstâncias associado com a ausência de injúrias e a presença da cocaína na larva e no músculo, permitiu determinar uma “overdose” da droga como causa da morte.

No Brasil, todavia, nossa pesquisa é pioneira e estamos aprimorando os conhecimentos e técnicas a serem utilizadas.

Embora os estudos comprovem a eficácia das larvas como amostra alternativa nas análises toxicológicas, é necessário determinar os efeitos das substâncias na taxa de desenvolvimento desses insetos, como foi citado anteriormente. Os insetos freqüentemente envolvidos na estimativa do IPM são os dípteros da família Calliphoridae e Sarcophagidae, conhecidos como varejeiras, e que são também os mais utilizados na análise de drogas, por serem ágeis, bons voadores e tipicamente, os primeiros a chegar na carcaça (GOFF & LORD, 1994).

As larvas de dípteros que se alimentam em tecidos humanos com a presença da droga introduzem em seu próprio metabolismo drogas e toxinas ingeridas quando o indivíduo ainda estava vivo. A transferência dessas substâncias do organismo humano para os dípteros não é acompanhada apenas neste nível da cadeia alimentar, mas continua também nos coleópteros predadores (besouros) de larvas destas moscas (INTRONA *et alii*, 2001). Assim, os coleópteros podem também ser submetidos à análise toxicológica, haja vista que uma segunda bioacumulação pode ocorrer. Foi observado que uma substância química pode influenciar ou não o desenvolvimento dos insetos, acelerando ou retardando este processo em uma segunda bioacumulação. NUORTEVA & NUORTEVA (1982) detectaram mercúrio em adultos de *Creophilus maxillosus* Linnaeus (Coleoptera: Staphilinidae) e *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) que

se alimentaram de larvas necrófagas criadas em tecidos contendo o mercúrio. Não foi observado nenhum efeito adverso no comportamento ou na taxa de desenvolvimento nos adultos do estafilínídeo. Entretanto, os adultos do tenebrionídeo apresentaram uma alteração no comportamento, com diminuição ou redução de atividades.

Na ausência de larvas de dípteros, principalmente quando o corpo se encontra em avançado estágio de decomposição, os coleópteros podem ser utilizados como amostra biológica para a análise toxicológica, uma vez que algumas espécies apresentam hábitos necrófagos e outras são predadoras de espécies necrófagas. Duas espécies de besouros, *Dermestes frischi* Kugelann (Coleoptera: Dermestidae) e *Thanatophilus sinuatus* Fabricius (Coleoptera: Silphidae) foram criadas em substratos contendo concentrações de morfina. Amostras de larva, pupa e adulto foram analisadas e foi possível detectar a droga em todos os estágios de desenvolvimento de *D. frischi* e nos estágios larvais de *T. sinuatus* (BOUREL *et alii*, 2001).

Os insetos podem ser facilmente analisados após homogeneização de uma amostra representativa de espécimens através de procedimentos toxicológicos como rádio-imunoensaio (RIA), cromatografia gasosa (GC), líquida (HPLC), de placa (TLC) ou gasosa com espectrometria de massas (GC-MS).

Entre 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 (COLLINS *et alii*, 1997). A utilização da cromatografia permite ainda a caracterização do nível de impurezas nas drogas ilícitas (MOORE & CASALE, 1994). Além da determinação da droga, os métodos cromatográficos, como exemplo para maconha, têm sido aplicados com pelo menos três aplicações forenses (GUDZINOWICZ *et alii*, 1980):

- 1 – determinar se a amostra de planta apreendida contém maconha;
- 2 – determinar se amostras de maconha apreendidas em diferentes locais originam de um mesmo lote, e;
- 3 – traçar o perfil das amostras de cada região geográfica

Dentre as técnicas de cromatografia a gasosa merece atenção, pois apresenta um poder de resolução e sensibilidade bastante elevados, 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, o que muitas vezes, é um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas. Apesar dessas vantagens, a cromatografia gasosa pode apresentar alguns inconvenientes, pois, anterior à análise é necessária a preparação da amostra em várias etapas, o que acaba gerando um custo maior da análise e um certo tempo para a determinação do resultado (COLLINS *et alii*, 1997).

Nos anos 70, SOHAL & LAMB (1977) demonstraram o acúmulo de vários metais incluindo cobre, ferro e zinco em adultos de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera: Muscidae). Similarmente, NUORTEVA & NUORTEVA (1982) registraram a presença de mercúrio em larvas, pupários e adultos de insetos criados em peixe contendo mercúrio. Esta experiência foi aplicada num caso forense onde o corpo de uma mulher foi encontrado em avançado estágio de decomposição e colonizado com larvas de dípteros em uma área rural da Finlândia. A baixa concentração de mercúrio obtida na análise toxicológica das moscas tornou possível a localização da provável área geográfica de onde a vítima era proveniente, uma área relativamente livre da contaminação por mercúrio.

Em 1985, LECLERCQ & BRAHY demonstraram a presença de arsênico em dípteros das famílias Piophilidae, Psychodidae e Fanniidae num caso ocorrido na França.

Em um caso de suicídio por envenenamento, GUNATILAKE & GOFF (1989) detectaram organosfosforados (malation) em larvas de califorídeos submetidos à análise toxicológica.

KINTZ *et alii* (1990c) demonstraram o potencial da entomotoxicologia descrevendo vários casos, entre eles um corpo encontrado aproximadamente 2 meses após a morte que teve amostras de tecidos (coração, pulmão, fígado e rim) e de larvas de califorídeos analisadas pela cromatografia líquida. A análise mostrou a presença de benzodiazepínicos, barbitúricos e outros antidepressivos. A análise comparativa dos resultados mostrou alta sensibilidade, uma vez que um benzodiazepínico foi detectado apenas nas larvas e foi negativo para os tecidos. O mesmo autor estabeleceu uma correlação entre as concentrações de drogas em larvas e em tecidos humanos.

INTRONA *et alii* (1996) conseguiram um resultado positivo para morfina em pupários vazios de uma espécie de califorídeo criada em uma dieta contendo a droga. Similarmente, GOFF *et alii* (1993) encontraram amitriptilina e nortriptilina em larvas e pupários vazios de dípteros que se desenvolveram em carcaças de coelhos que receberam diferentes doses das substâncias em questão. A presença destas drogas também foi detectada em pupários de moscas e fezes de besouros que foram encontrados perto de um corpo mumificado que havia desaparecido há cerca de dois anos.

MANHOFF *et alii* (1991) detectaram cocaína em tecidos mumificados, no sangue e em larvas de moscas e fezes de besouros coletados em um corpo. A cocaína e outras drogas têm sido identificadas na proteína do cabelo de usuários de droga e elas podem ser detectadas vários anos após a morte. Essas substâncias podem ser depositadas nos pupários, que também contém proteína.

WOLFF *et alii* (2004) pesquisaram a presença de paration em insetos necrófagos, que é um inseticida e acaricida amplamente utilizado na agricultura e fortemente absorvido pelo solo. O número de casos de intoxicações seja pelo uso indiscriminado, mau uso de equipamento de proteção ou como tentativa de suicídio é elevado, especialmente nas áreas consideradas agrícolas no estado de São Paulo. O inseticida foi administrado em coelhos, que após a necropsia foram expostos para a colonização de insetos. Amostras de imaturos (larvas e pupas) e adultos de artrópodes tais como dípteros, coleópteros, himenópteros, hemípteros, isópodos e acarídeos foram coletadas para a análise toxicológica. O paration foi detectado em várias espécies, mas a análise foi qualitativa e não quantitativa. Embora isópodos e ácaros sejam pequenos, foi possível a extração do inseticida pois eles acumularam níveis suficientes para a detecção. A constituição de quitina na epiderme pode contribuir para a deposição ou fixação da droga no artrópode (INTRONA *et alii*, 2001). A presença do paration apresentou alguns efeitos na atratividade dos insetos. Foi verificado que a presença do inseticida na região oral dos coelhos repeliu os artrópodes nesta região. Esse fator é interessante uma vez que normalmente os dípteros ovipõem nas cavidades naturais do corpo. Nenhuma diferença significativa foi observada no padrão de sucessão dos insetos. Estes dados mostram a importância de novos estudos utilizando inseticidas, pois GUNATILAKE & GOFF (1989) relataram

diferenças na taxa de oviposição e padrão sucessional dos insetos que se alimentaram em carcaças contendo malation.

Assim, várias drogas têm sido detectadas por meio dos insetos. Embora muitos destes casos e estudos descrevam uma correlação entre concentração da larva e tecidos humanos nos quais elas se alimentaram, outros estudos não mostraram nenhuma relação ou mesmo a concentração encontrada na larva ser significativamente menor que a do tecido.

Estes exemplos demonstram não apenas que os insetos encontrados em cadáveres podem ser utilizados nas análises toxicológicas, mas também explicitam o risco de um cálculo de intervalo de morte incorreto devido a taxa de desenvolvimento alterada dos estágios imaturos.

Portanto, é de fundamental importância que outros trabalhos sejam feitos com o objetivo de se caracterizar a relação entre exposição a estes agentes tóxicos com o padrão sucessional de artrópodes com hábitos necrófagos.

Este projeto pretende estudar a ação de algumas drogas que são amplamente consumidas em nosso país, como o diazepam, a cocaína, a anfepramona e a maconha no crescimento, desenvolvimento e na mortalidade de moscas de interesse forense utilizando uma concentração 2x a letal.

Referências

- ABBOT, C.E., The necrophilous habit in coleoptera. **Bull. Brooklyn Entomol. Soc.**, **32** (1937): 202-204.
- AMENDT, J.; KRETTEK, R. & ZEHNER, R., Forensic entomology. **Naturwissenschaften**, **91** (2004): 51-65.
- ASHWORTH, J.R. & WALL, R., Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits. **Med. Vet. Entomol.**, **8** (1994): 303-309.
- BENECKE, M., A brief history of forensic entomology. **Forensic Sci. International.**, **120** (2001): 2-14.
- BENECKE, M., Forensic entomology: arthropods and corpses. Tsokos M (ed) **Forensic Pathology Reviews**, Vol.2, Human Press, Totowa (USA), (2004) p. 207-248.
- BEYER, J.C.; ENOS, W.F. & STAJIC, M., Drug identification through analysis of maggots. **JFSCA**, **25** (1980): 411-412.
- BORNEMISSZA, G.F. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. **Australian J. Zool.**, **5** (1957): 1-12.
- 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** (1999): 354-358.
- BOUREL, B.; TOURNEL, G.; HEDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOFF, M.L. & GOSSET, D., Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci Int.**, **120** (2001): 127-131.
- BOUREL, B.; FLEURISSE, L.; HEDOUIN, V.; CAILLIEZ, J.C.; CREUSY, C.; GOFF, M.L. & GOSSET, D., Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomototoxicology. **J. Forensic Sci.**, **46** (2001): 596-599.

- BOUREL, B.; TOURNEL, G.; HEDOUIN, V.; GOFF, M.L. & GOSSET, D., Determination of drug levels in two species of necrophagous coleoptera reared on substrates containing morphine. **J. Forensic Sci.**, **46** (2001): 600-603.
- BOUREL, B.; TOURNEL, G.; HEDOUIN, V. & GOSSET, D., Entomofauna of buried bodies in northern France. **Int. J. Legal Med.**, **118** (2004): 215-220.
- BRACK, L.E.O., Community dynamics of carrion-attendant arthropods in tropical african woodland. **Oecologia**, **72** (1987): 402-409.
- CAMPOBASSO, C.P.; DISNEY, R.H.L. & INTRONA, F., A case of *Megaselia scalaris* (Loew)(Diptera: Phoridae) breeding in a human corpse. **Aggrawal`s Internet J. Forensic Med. Toxicol.**, **5** (2004): 3-5.
- CARVALHO, L.M.L., Sucessão e ecologia de populações de insetos associados a decomposição de carcaças de suínos expostas em ambiente natural de mata mesófila semidecídua, Campinas-SP. Tese de mestrado, 1996, Departamento de Parasitologia, IB, Unicamp, 77p
- CARVALHO, L.M.L. & LINHARES, A.X., Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil, **J. Forensic Sci.**, **46** (2001): 604-608.
- CARVALHO, L.M.L.; LINHARES, A.X. & TRIGO, J.R. 2001. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. **Forensic Sci. Int.**, **120**: 140-144.
- CARVALHO, L.M.L; THYSSEN, P.J.; GOFF, M.L. & LINHARES, A.X., Observations on the succession patterns on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. **Aggrawal`s Internet J. Forensic Med. Toxicol.**, **5** (2004): 33-39.
- CATTS, E.P., Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, **9** (1992): 245-255.
- CATTS, E.P. & GOFF, M.L., Forensic entomology in criminal investigations. **Annu Rev. Entomol.**, **37** (1992): 253-272.
- CATTS, E.P. & HASKELL, N.H., Entomology and death: a procedural guide. Joyce`s print Shop, Inc., Clemson, South Carolina, 1997.

- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S., Introdução a métodos cromatográficos, editora da UNICAMP, 7ª edição, 1997.
- DENNO, R.F. & COTHRAN, W.R., Niche relationships of a guild of necrophagous flies. **Annals Entomol. Soc. Amer.**, **68** (1975): 741-754.
- DEONIER, C.C., Carcass temperatures and their relation to winter blowfly populations and activity in the southwest. **J. Economic Entomol.**, **33** (1940): 166-170.
- ERZINCLIOGLU, Y.Z., The application of entomology to forensic medicine. **Med. Sci. Law**, **23** (1983): 57-63.
- GODDARD, J. & LAGO, P.K., Notes on blowfly (Diptera: Calliphoridae) succession on carrion in Northern Mississippi. **J. Entomol. Sci.**, **20** (1985): 312-317.
- 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** (1989): 91-93.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A.; HEWADIKARAM, K.A. & OMORI, A.I., Effect of heroin in decomposing tissues on the development of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. **JFSCA**, **36** (1990a): 537-542.
- GOFF, M.L.; CHARBONNEAU, B.A. & SULLIVAN, W., Presence of fecal material in diapers as a potential source of error in estimations of postmortem interval using arthropod development rates. **JFSCA**, **36** (1991b): 1603-1606.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A. & OMORI, A.I., Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. **JFSCA**, **37** (1992): 867-872.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A.; OMORI, A.I. & LaPOINTE, D.A., Preliminary observations of the effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of postmortem interval. **JFSCA**, **38** (1993): 316-322.
- GOFF, M.L. & LORD, W.D., Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, **15** (1994): 51-57.

- GOFF, M.L. & LORD, W.D., Entomotoxicology: insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development. In: BYRD, J.H. & CASTNER, J.L., (Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. 2001, CRC, Boca Raton, Florida, pp 331-340.
- GREENBERG, B., Flies as forensic indicators. **J. Med. Entomol.**, **28** (1991): 565-577.
- GREENBERG, B. & KUNICH, J.C., Entomology and the law: flies as forensic indicators. Cambridge University press, Cambridge (2002).
- GUDZINOWICZ , B.J.; GUDZINOWICZ, M.J.; HOLOGGITAS, J. & DRISCOLL, J.L., The analysis of *Marijuana* cannabinoids and their metabolites in biological media by GC-MS techniques. In: Advances in chromatography. GIDDINGS, J.S.; GRUSHKA, E.; CAZES, J. & BROWN, P.R., vol. 18, Chapter 5, Marcel Dekker, Inc, New York and Basel, 1980.
- GUNATILAKE, K. & GOFF, M.L., Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. **J. Forensic. Sci.**, **34** (1989): 714-716.
- HALL, M.J.R.; FARKAS, R.; KELEMEN, F.; HOSIER M.J. & EL-KHOGA, J.M., Orientation of agents of wound myiasis to hosts and artificial stimuli in Hungary. **Med. Vet. Entomol.**, **9** (1995): 77-84.
- HANSKI, I. & KUUSELA, S., An experiment on competition and diversity in the carrion fly community. **Ann. Ent. Fenn.**, **4** (1977): 108-115.
- INTRONA, F.; GAGLIANO-CANDELA, R. & DI VELLA, G., Opiate analysis on empty puparia-positive results, in: Proceedings of XX International Congress of Entomology, Firenze, Italy, 25-31 August 1996, p. 755.
- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C.P. & DiFAZIO, A., Three case studies in forensic entomology from Southern Italy. **J. Forensic Sci.**, **43** (1998): 210-214.
- INTRONA, F. & CAMPOBASSO, C.P., Forensic dipterology. In: Papp, L. & Darvas B. (eds), Contributions to a manual of palearctic diptera.1. General and applied dipterology. Science Herald, Budapest, 2000, pp 793-846.
- INTRONA, F. Jr.; CAMPOBASSO, C.P. & GOFF, M.L. Entomotoxicology, **Forensic Sci. Int.**, **120** (2001): 42-47.

- KAMAL, A.S., Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera). I. Bionomics. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **51** (1958):261-270.
- KINTZ, P.; TRACQUI, A.; LUDES, B.; WALLER, J.; BOUKHABZA, A.; MANGIN, P.; LUGNIER, A.A. & CHAUMONT, A.J., Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, **11** (1990a): 63-65.
- KINTZ, P., TRACQUI, A. & MANGIN, P., Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. **J. Forensic Sci. Soc.**, **30** (1990b): 243-246.
- 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. Soc.**, **35** (1990c): 243-246.
- KLINGELHOFFER, Zweifelhafte Leichenbefunde durch Benagung von Insekten. (Misinterpretation on the cause of death as a result of onsects feeding on corpses). **Vjschr Gerichtl Med.**, **25** (1898): 58-63.
- LECLERQ, M. & BRAHY, G., Entomologie et médecine legale: datation de la mort. **J. Med. Leg.**, **28** (1985): 271-278.
- LORD, W.D. & STEVENSON, J.R., Directory of forensic entomologists, 2nd. Ed. Def. Pest Mgmt. Info. Anal. Center, Walter Reed Army Medical Center, Washington, D.C., 42p.
- LORD, W.D. & GOFF, M.L., Forensic entomology: insects in the investigation of violent crimes. **Forensic aspects of DNA. Department of justice**, jacket 342-488, vol. 1 (1990): 163-171.
- MANN, R.W.; BASS, W.M. & MEADOWS, L., Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. **J. Forensic Sci.**, **35** (1990): 103-111.
- MANHOFF, D.T.; HOOD, I.; CAPUTO, F.; PERRY, J.; ROSEN, S. & MIRCHANDANI, H.G., Cocaine in decomposed human remains. **J. Forensic Sci**, **36** (1991): 1732-1735.
- MARCHENKO, M.J., Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of time since death. **Forensic Sci. Int.**, **120** (2001): 89-109.

- MICOZZI, M.S., Experimental study of postmortem change under field conditions: effects of freezing, thawing and mechanical injury. **J. Forensic Sci.**, **3** (1986): 953-961.
- MILLER, M.L.; LORD, W.D.; GOFF, M.L.; DONNELLY, B.; MCDONOUGH, E.T. & ALEXIS, J.C., Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuvia (Dermestidae) associated with mummified human remains. **J. Forensic Sci.** **39** (1994): 1305-1213.
- MOORE, J.M. & CASALE, J.F., In depth chromatography analyses of illicit cocaine and its precursor, cocas leaves. **J. Chromatography A.**, **674** (1994): 165-205.
- MOURA, M.O.; CARVALHO, C.J.B. & MONTEIRO-FILHO, E. L.A., A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92** (1997): 269-274.
- NOLTE, K.B.; PINDER, R.D. & LORD, W.D., Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. **J. Forensic Sci.**, **4** (1992): 179-185.
- NORRIS, R.R., The bionomics of blow flies. **Ann. Rev. Entomol.**, **10** (1965): 47-68.
- NUORTEVA, P.; SCHUMANN, H.; ISOKOSKI, M. & LAIHO, K., Studies on the possibilites of using blowflies (Diptera: Calliphoridae) as medicolegal indicators in Finland. **Ann. Ent. Fenn.**, **40** (1974): 70-74.
- NUORTEVA, P., Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards, vol. 2, C.G. Tedeschi, W.G. Eckert and Tedeschi, L.G., pp 1072-1095. Saunders, Philadelphia. 1977.
- NUORTEVA, P. & NUORTEVA, S.L., The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. **Ambio**, **11** (1982): 34-37.
- OLIVEIRA-COSTA, J.; MELLO-PATIU, C.A. & LOPES, S.M., A influência de diferentes fatores na freqüência de dípteros muscóides em cadáveres humanos no Rio de Janeiro. **Bol. Mus. Nac., Zool.**, **470** (2001): 1-10.
- PAYNE, J.A., A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. **Ecologia**, **46** (1965): 592-602.
- POUNDER, D.J., Forensic entomotoxicology. **J. Forensic Sci.**, **31** (1991): 469-472.
- REED, H.B.Jr., A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. **Am. Midl. Nat.**, **59** (1958): 213-245.

- RIBEIRO, N.M.D. 2003. Comparação entre a decomposição e a sucessão entomológica em carcaças de suínos expostas em área de cerrado e mata ciliar, no Sudeste Brasileiro. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 64p.
- RODRIGUEZ, W.C. & BASS, W.M., Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. **J. Forensic Sci.**, **30** (1985): 836-852.
- SADLER, D.W.; PATL, M.R.; ROBERTSON, L.; BROWN, G.;FUKE,E. & POUNDER, D.I., Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci**, **42**(1997):481-485.
- SMITH, K.G.V., A manual of forensic entomology. British Museum and Cornell University Press, 1rst ed.1986.
- SOHAL, R.S.& LAMB, R.E., Storage excretion of metallic cations in the adult housefly *Musca domestica*. **J. Insect. Physiol.**, **25** (1979): 119-124.
- SOUZA, A.M. 1998. Biologia em laboratório dos estágios imaturos de espécies de Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera), de importância medicolegal na região de Campinas, São Paulo. Tese de Doutorado. 94p.
- TANAKA, K.; OHMORI, T., INOVE, T. & SETA, S., Impurity profiling analysis of illicit methamphetamine by capillary gas chromatography. **JFSCA**, **39** (1994): 500-511.
- In INTERNET: NTP Chemical Repository (Radian Corporation, August 29, 1991) MSDS for diazepam and 1-trans-delta-9-tetrahydrocannabinol.
- TAVARES, M.C.H. 2003. Sucessão faunística de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostas em diferentes altitudes e condições pluviométricas na reserva florestal da Serra do Japi, Jundiá, SP. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Tese de Doutorado. 121p
- THYSSEN, P.J. 2000. Decomposição e sucessão entomológica em carcaças de suínos (*Sus scrofa* L.) de tamanhos diferentes: estudos em ambiente de mata natural na região de Campinas - SP. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 85p.

- TURCHETTO, M. & VANIN, S., Forensic evaluations on a crime case with monospecific necrophagous fly population infected by two parasitoid species. **Aggrawal`s Internet J. Forensic Med. Toxicol.**, **5** (2004): 12-18.
- VON ZUBEN, C.J., BASSANEZI, R.C.; REIS, S.F.; GODOY, W.A.C. & VON ZUBEN, F.J., Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Appl. Entomol.**, **120** (1996): 379-382.
- WATANABE, S. Glossário de ecologia.1987. ACIESP, CNDCT, FAPESP, CNPq. Academia de Ciências de São Paulo. 1ª edição, 271p.
- WELLS, J.D. & LaMOTTE, L.R., Estimating maggot age from weight using inverse prediction. **J. Forensic Sci.**, **40** (1995): 585-590.
- WOLFF, M.; BUILES, A.; ZAPATA, G.; MORALES, G. & BENECKE, M., Detection of parathion (0,0-diethyl 0-(4-nitrophenyl) phosphorothioate) by HPLC in insects of forensic importance in Medellín, Colombia. **Aggrawal`s Internet J. Forens Med Toxicol.**, **5** (2004): 6-11.

OBJETIVOS

Essa pesquisa teve como propósitos:

- 1 - comparar o crescimento (peso) e o desenvolvimento (tempo) de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria*, duas espécies de moscas necrófagas que foram expostas as drogas: diazepam, cocaína, anfepramona e maconha com um grupo controle;
- 2 – determinar a mortalidade larval, pupal e dos adultos em relação ao grupo controle;
- 3 – determinar a longevidade dos adultos em relação ao grupo controle;
- 4 – detectar a presença das drogas nas amostras de tecido e fluídos do coelho;
- 5 – detectar a presença das drogas nas amostras de dípteros;
- 6 – quando possível, quantificar a droga nas amostras dos coelhos e dípteros.

CAPÍTULO I

Determination of Drug Levels and The Effect of Diazepam on the Growth of Necrophagous Flies of Forensic Importance in Southeastern Brazil

Forensic Science International, Vol.120, Nº 1-2: 140-144 (2001)

Lucila M. L. Carvalho, MS¹, Arício X. Linhares, Ph.D¹ & José Roberto Trigo, Ph.D²,
Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Depto. de Parasitologia¹,
Depto. de Zoologia², CP 6109, CEP 13083-970 Campinas-SP, Brazil

Grant: FAPESP # 96/1637-5

Key words: forensic science, entomotoxicology, Calliphoridae, drug, *postmortem* interval

Corresponding author:

Lucila Maria Lopes de Carvalho

Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas

CP 6109 Campinas, SP/Brasil

e-mail: lucilacarvalho@terra.com.br

Tel: (55) 19-7887651 Fax: (55) 19-2893124

ABSTRACT

Larvae of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) were reared on tissues from rabbits administered two times a lethal dosage of diazepam to study the effects of this drug on the development of these two species. The rabbits were given 50 mg of diazepam via ear vein infusion. From hours 18 to 54, larvae feeding on tissues containing the drug developed more rapidly than larvae from the control colony for both flies species. The time required for pupariation and adult emergence was significantly greater for colony fed on tissues from diazepam dosed rabbits than for the control ones. These differences are significant for they are large enough to alter the estimate of *postmortem* interval based on fly development. The presence of diazepam could be detected through gas chromatography – mass spectrometer in all rabbit samples and in almost all Diptera samples in this experiment.

INTRODUCTION

Necrophagous insects have been used as an alternative in estimating the time of death. In addition, the study of insects, especially the larvae found in cadavers can also contribute to the qualitative identification of substances or abuse drugs present in the corpse [1]. Drug related deaths have increased in Brazil [2] and other countries of the world. Usually, victims are not discovered for many days to months and, because of it, entomological techniques are useful in forensic analysis [3].

Larvae are easily collected and maintained in the laboratory and they present less contaminants than tissues that are usually sampled for toxicological analysis [4]. However, if larvae are no longer present due to the long time of body exposition, it is still possible to use insect puparia. Recently, researchers have shown that is possible to detect chemical substances in puparia [5, 6].

Diazepam, a benzodiazepine drug, has sedative and tranquilizing effects, with large number of them are available on drugstores. They can be classified into short, intermediate and long-acting compounds. Diazepam is included in the long duration group and it is widely prescribed as an antianxiety, antispasmodic and antiepileptic drug [7, 8]. It is one of the tranquilizer drugs mostly associated with unexpected deaths in Brazil caused by drug overdose [2].

The purpose of this study was to determine the effect of diazepam on the development and growth of larvae as well as to verify the time of emergence of adults, that can affect the estimate of *postmortem* interval. It was also studied if is possible to detect this drug in rabbit and fly samples using gas chromatography-mass spectrometry.

MATERIALS AND METHODS

NECROPHAGOUS FLIES EXPERIMENT

Male rabbits weighing 3.2 to 4.0 kg were used as test animals for the administration of pure diazepam. The drug was supplied through the courtesy of Intoxication Control Center, University Hospital of Campinas State University. The lethal dose for rabbits is 9 mg/Kg [9] and a two times the letal concentration (50 mg) diluted in 2.5 ml of saline solution was administered by ear vein injection. Five replicates were done, and the control rabbit received only normal saline solution. The rabbits were killed mechanically, and samples of blood, liver, heart, lung and urine were taken for chemical analysis of diazepam in GC-MS.

A sample of liver was exposed to newly emerged larvae of *Chrysomya putoria* and *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). Both colonies of larvae were established from adults insects collected on exposed rat carcasses. At 6-h intervals up to 54-h, total weighs were individually recorded for ten larvae of each liver sample and each species. These larvae samples were taken to toxicological analysis. Subsequently, the rest of the larvae were placed in an artificial diet and kept in the laboratory at 27°C, in order to complete their development. The time in hours required for pupariation, emergence and longevity were also recorded. Samples of puparia and adult specimens were collected for toxicological analysis.

The statistical program used to analyze the data of the life cycle of the flies was the SAS Package [10]. ANOVA tests were performed using the General Linear Models (GLM). The means for each main factor and for each species were compared using the Duncan multiple comparisons test.

CHEMICAL ANALYSIS

We used a modified Greaves [7] procedure to extract diazepam. Approximately 1.0 g of tissue, fluids and insect samples were weighed and homogenized on a homogenator equipment in 5 ml of borate buffer (pH 9). The buffer solution was prepared with 21.3 ml of 0.1 M sodium hydroxide solution and 50 ml of each of 0.1 M boric acid and 0.1 M potassium chloride solution and diluting to 100 ml with distilled water. An 8 ml

volume of *tert*-butyl methyl ether was added and the sample was shaken for 2 min in a vortex equipment and centrifuged at 3.000 RPM for 20 min. The solvent layer was transferred into a centrifuge tube containing 2.0 ml of 2 M hydrochloric acid. The mixture was then shaken in a vortex for 2 min and centrifuged at 3.000 RPM for 20 min. To the acid layer was added 4 ml of *tert*-butyl methyl ether and the sample was shaken for 2 min in a vortex and centrifuge at 3.000 RPM for 20 min to remove lipid materials from the acid phase. The organic phase was discarded and the aqueous phase received 2 drops of bromothymol blue solution (0.04%) as indicator and the mixture was made alkaline by adding 2 M sodium hydroxide solution until the indicator turned blue. To the solution were added 2 ml of *tert*-butyl methyl ether and the sample was shaken for 2 min in a vortex and centrifuged. After centrifugation, the solvent layer was dried with sodium sulfate and evaporated. The residue was dissolved in 50 μ l of ethyl acetate. A 2 μ l aliquot of the solution was injected into the gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS)[6].

Rabbit and fly samples were analyzed in the laboratory of Chemical Ecology-Institute of Biology. The analysis were performed on a Hewlett Packard model-6890 series II, coupled on a selective mass detector HP-5973A. Chromatographic separations were done on a HP-5MS 30mx0,32mmx0,25 μ capillary column (HP). A programmed column temperature, initially set at 200°C and increased to 300°C at 25°/min was used. The GC injection port was operated at 250°C. The helium carrier gas linear velocity was 1.0 ml/min. Detection was done by multiple ion monitoring (m/z 256 e 283).

CURVES

Five mg of diazepam were dissolved in 50 ml of methanol. Aliquots containing concentrations of 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.1 μ g/ml were taken, dissolved in 50 μ l of ethyl acetate, from which, 2 μ l were collected and injected in the GC-MS. The same concentrations were collected and added to whole blood samples and extracted as describe above. Calibration curves were obtained by plotting the peak-area ratio of diazepam. The curve obtained was: $y = 1E - 08x$, $R^2 = 0.98$.

RESULTS AND DISCUSSION

All analyzed variables and interactions were significant to the fly weight: Species (F=14.62, P=0.0001); Drug (F=306.49, P=0.0001); Time of exposure (F=572.78, P=0.0001); Species*Drug (F=5.24, P=0.0222); Species*Time (F=4.80, P=0.0001) and Drug*Time (F=88.62, P=0.0001). In the first few hours of exposure, the difference of larval development was not noticed, but from 18 hours on, it was observed that the presence of the drug was significant for fly development. Control larvae developed slower than larvae exposed to liver containing the drug. In general, *C. albiceps* (x=88.44) showed higher means than *C. putoria* (x=75.55), both for control larvae and for larvae containing the drug. In addition, in both species of flies exposed to diazepam, the larval growth was faster when compared to the controls in almost all hours of observation. In general, the larvae that developed on livers treated with diazepam weighed significantly more than the others and the weight differences between the control and drug exposed groups were almost two times heavier. The time of exposure to the liver was significant to fly development and the weight increased directly with time of exposure. The only moment that the control larvae were heavier than treatment larvae was in the sixty hour after exposure. This suggests that the drug probably is incorporated and affects the larval development after six hours of exposure to the drug.

The initial time required for pupariation was significant (F=16.55, P=0,0001). However, among the two studied variables and the interaction of variables: Species, Drug and Species*Drug, only the drug was significant (F=47.74, P=0.0001). The total time required for pupariation was also significant (F=7.81, P=0.0020) and it was affected by the drug (F=22.96, P=0.0002). The interval between the initial and final development time was not significant. *Chrysomya albiceps* and *C. putoria* started and finished their pupariation time almost at the same time. For *C. albiceps*, the pupariation time was affected by the drug concentration from the beginning (F=79.53, P=0.0001) to the end (F=32, P=0.0005) of this stage of development. The difference was marginally significant (F=5.85, P=0.0419). Diazepam was significant to *C. putoria* from the beginning (F=19.01, P=0.0024) to the end (F=6.90, P=0.0303) of pupariation process and the difference was not significant. The results show that the drug affected the pupariation time from the beginning to the end for

both fly species, suggesting that diazepam cause an acceleration effect on this developmental stage of the flies when compared to the controls.

It was also analyzed if significant mortality occurred after the larvae have been taken from the rabbit liver and transferred to an artificial diet to continue their development: larval mortality (LM), pupal mortality (PM) and the non-emerged adults (NEA). Therefore, the studied variables and interaction: Species, Drug and Species*Drug were also not significant since their means did not differ significantly for individual analysis.

The presence of the drug was significant for the emergence time ($F=71.69$, $P=0.0001$), although both species required different periods of time to reach the adult stage. The drug was significant for this event specially for *C. putoria* that emerged before *C. albiceps*. All two studied variables and interaction were significant: Species ($F=26.56$, $P=0.0001$), Drug ($F=165.98$, $P=0.0001$) and Species*Drug ($F=22.53$, $P=0.0002$) and accelerated the emergence time of adults.

It was observed that the initial adult mortality ($F=20.44$, $P=0.0001$) was significant for the fly species ($F=20.34$, $P=0.0004$) and for the drug ($F=38.53$, $P=0.0001$). Only the species ($F=141.39$, $P=0.0001$) was significant for the ending of adult mortality ($F=48.77$, $P=0.0001$). On the other hand, for the difference between the initial and final mortality ($F=90.48$, $P=0.0001$) was significant for all studied variables: Species ($F=174$, $P=0.0001$), Drug ($F=87.78$, $P=0.0001$) and Species*Drug ($F=9.66$, $P=0.0068$). When the initial mortality of both fly species was compared, it was verified that *C. albiceps* began to die before *C. putoria*. The same fact occurred to the final mortality and to the difference. When the species were analyzed separately, the initial mortality ($F=154.51$, $P=0.0001$) and the difference ($F=11.52$, $P=0.0094$) for *C. albiceps* was significant and the drug influenced the mortality, but the drug was not significant at the end of mortality. For *C. putoria*, the drug also influenced the initial time ($F=15.64$, $P=0.0042$) and the difference ($F=261.36$, $P=0.0001$), but it did not influence the end time of mortality.

Larvae of both species that were fed on the livers containing diazepam developed more rapidly than the control ones. If a larvae feed on a tissue containing some kind of drug or substance, there are two process that may happen: a bioacumulation or a excretion of the drug and its metabolites. Some authors diverge about this [3, 11]. The present report

deals with the effect and detection of diazepam in fly tissues and we verified that there was a bioaccumulation since the presence of the drug had a significant impact on larval growth, pupariation, adult emergence and mortality. In addition, diazepam could be detected not only in maggot samples but also in puparia and adults. It means that the drug affects the fly development since the larval stage until the total mortality of adults. Previous works [3, 4, 6] using methamphetamine, amitriptyline, cocaine and morphine showed that these drugs can alter the rate of development of some Diptera flies. Colonies of both calliphorids *C. albiceps* and *C. putoria* fed on tissues containing diazepam showed a faster development when related to control. Methamphetamine, amitriptyline and cocaine Produced similar effects, although they Presented differences in larval and puparial stages. On the other hand, morphine demonstrated to retard the fly development.

All rabbit and fly samples were positive to diazepam, although some adults presented only a trace of drug. This suggests that GC-MS is a valuable sensitive analytical procedure in detecting diazepam in Diptera samples. The concentration was higher on heart and liver samples, probably, because of metabolic activities. It was possible to detect the drug on fly samples although the concentration was smaller than that found in rabbit samples. There was no correlation between liver and larvae concentrations.

Based on results of this study, between hours 18 and 54, estimations of larval age based on total weight can be significantly in error if presence of diazepam in the tissues is not considered.

Studies must be done in order to stablish which and how drugs can affect insect development. This will allow for needed corrections to the life-cycle data and implicate in more accurate results of *post mortem* interval estimate. Thus, insects and other arthropods used as witness of a crime can prove to be valuable tools in investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from FAPESP. To Paulo E. Rubbo for help with toxicological analysis.

BIBLIOGRAPHY

1. P. Kintz, A. Tracqui, B. Ludes, J. Waller, A. Boukhabza, P. Mangin, A.A. Lugnier and A.J. Chaumont, Fly larvae and their relevance in forensic entomology. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 11 (1990) 63-65.
2. M. E. Bortolletto, Tóxicos, civilização e saúde. Contribuição à análise dos sistemas de informações tóxico-farmacológicas no Brasil, série Política de Saúde n.º 12, Rio de Janeiro, 1993. pp. 61-74.
3. M.L. Goff, W.A. Brown and A.I. Omori, Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. *J. Forensic Sci.* 37 (1992) 867-872.
4. M.L. Goff and W.D. Lord, Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 15 (1994) 51-57.
5. M.L. Goff; M.L. Miller; J.D. Paulsson; W.D. Lord; E. Richards and A.I. Omori, 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.* 42 (1997) 276-280.
6. M.L. Miller; W.D. Lord; M.L. Goff; B. Donnelly; E.T. McDonough and J.C. Alexis, Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuvia (Dermestidae) associated with mummified human remains. *J. Forensic Sci.* 39 (1994) 1305-1213.
7. K. Kudo; T. Nagata; K. Kimura; T. Imamura and M. Noda, Sensitive determination of diazepam and n-desmethyldiazepam in human material using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom.* 431 (1988) 358-359.
8. B. Knight, *Forensic Pathology*, Oxford University Press, New York, 1991. p. 518.
9. In INTERNET: NTP Chemical Repository (Radian Corporation, August 29, 1991) MSDS for diazepam.
10. SAS Institute, Inc. (1986) *SAS User`s Guide: Statistics*, Version 6th en. Cary, North Caroline.
11. D.W. Sadler, L. Robertson, G. Brown, C. Fuke and D.J. Pounder, Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. *J. Forensic Sci.* 42 (1997) 481-485.

RESULTS

Table 1. Larvae weight (mg) means of *Chrysomya albiceps* related to time of exposure (hours) on rabbit liver containing diazepam and control (\pm sd)

Time of exposure (hours)	Diazepam	Control
1	1.0 (0)a*	1.0 (0)a
6	2.34 (0.92)b	4.96 (1.40)a
18	30.82 (8.19)a	16.86 (3.11)b
24	49.08 (17.88)a	31.26 (8.01)b
30	91.86 (40.72)a	45.22 (9.47)b
42	251.18 (126.01)a	81.66 (36.64)b
54	426,34 (173.43)a	204.6 (103.93)b

* Means in a line followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 2. Larvae weight (mg) means of *Chrysomya putoria* related to time of exposure (hours) on rabbit liver containing diazepam and control (\pm sd)

Time of exposure (hours)	Diazepam	Control
1	1.0 (0)a*	1.0 (0)a
6	1.68 (0.77)b	3.90 (1.45)a
18	15.72 (4.49)a	12.26 (2.88)b
24	35.10 (13.74)a	27.96 (8.86)b
30	75.30 (32.08)a	38.44 (7.64)b
42	219.1 (129.31)a	107.32 (34.47)b
54	360.50 (163.86)a	158.46 (68.67)b

* Means in a line followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 3. Time of pupariation (hours) of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* larvae which were exposed to liver containing diazepam and control (\pm sd)

Time (hours)	Diazepam (N=10)	Control (N=10)
Initial		
<i>C. albiceps</i>	118.8 (2.68)a*	150 (7.35)b
<i>C. putoria</i>	110.4 (21.47)a	157.2 (10.73)b
Final		
<i>C. albiceps</i>	144 (16.97)a	192 (8.48)b
<i>C. putoria</i>	137.6 (24.1)a	184.8 (32.14)b
Difference		
<i>C. albiceps</i>	25.2 (2.68)a	42 (4.24)b
<i>C. putoria</i>	27.2 (9.55)a	27.2 (29.58)a

* Means in a line followed by the same letters are not significantly different (P<0.05)

Table 4. Time of emergence (hours) of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* larvae which were exposed to liver containing diazepam and control (\pm sd)

Time (hours)	Diazepam (N=10)	Control (N=10)
<i>C. albiceps</i>	273.6 (13.14)a*	273.6 (13.14)a
<i>C. putoria</i>	167.2 (4.38)a	276 (8.48)b

* Means in a line followed by the same letters are not significantly different (P<0.05)

Table 5. Percentage of larval and pupal mortality and non-emerged adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (\pm sd)

	Larval	Pupae	Nom emerged adults
<i>C. albiceps</i>			
Diazepam	9.4 (17.73)	1.6 (0.55)	22.6 (27.48)
Control	15.4 (14.15)	1 (1.41)	1.8 (1.09)
<i>C. putoria</i>			
Diazepam	9.4 (6.91)	13.2 (26.21)	9.2 (5.45)
Control	27 (25.88)	4.4 (3.78)	10 (5.48)

Table 6. Diazepam quantification (∞ g/ml) in samples of rabbit tissues and fly specimens through of GC-MS analysis

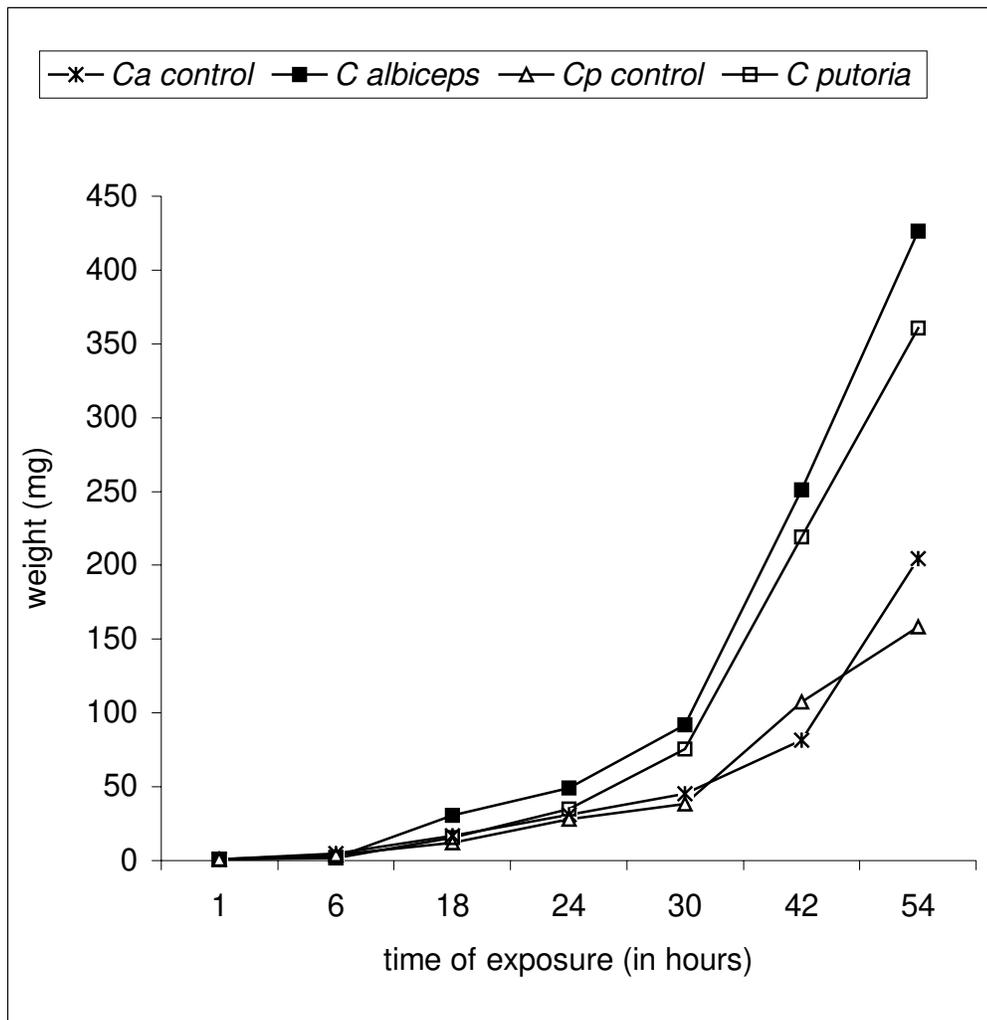
Sample	Quantification
Heart	9,531 (a)
Liver	5,943 (a)
Blood	3,228 (b)
Lung	3,341 (b)
Urine	4,029 (b)
Larvae of <i>C. albiceps</i>	0,342 (b)
Larvae of <i>C. putoria</i>	0,479 (b)
Puparia of <i>C. albiceps</i>	0,233 (b)
Puparia of <i>C. putoria</i>	3,022 (b)
Adult of <i>C. albiceps</i>	0,051 (b)
Adult of <i>C. putoria</i>	0,000 (b)

* Means in a column followed by the same letters are not significantly different (P<0.05)

LEGEND

Figure 1 – Rates of development of maggots of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* reared on liver tissues from rabbits containing diazepam (*Ca* = *C. albiceps*, *C* = *C. putoria*)

Figure 1



CAPÍTULO II - O EFEITO DA COCAÍNA NO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS IMATURAS E ADULTAS DE *CHRYSOMYA ALBICEPS* E *CHRYSOMYA PUTORIA*, DUAS ESPÉCIES DE MOSCAS VAREJEIRAS DE INTERESSE FORENSE

A cocaína é uma das drogas de abuso mais consumidas mundialmente, com altos índices de usuários na América do Norte (CORBURT & KOVES, 1994) e na América do Sul (BORTOLLETO, 1993). A Espanha, onde o uso da droga também é bastante disseminado, é considerada a maior porta de entrada de cocaína da América do Sul para a Europa. Somente entre 1990 e 1992, 533 pessoas morreram em consequência da droga, sendo que 84% apresentaram em seu organismo a cocaína e a heroína concomitantemente e 16% somente a cocaína (LORA-TAMAYO, 1994). A cocaína pode ser caracterizada como um dos mais potentes estimulantes do sistema nervoso central e tem sido freqüentemente associada a acidentes nas estradas e a diversos crimes violentos (GOLDSTEIN, 1992 *apud* TAGLIARO *et alli*, 1994). Sua absorção e ação no organismo dependem da via de administração. Ela é rapidamente metabolizada pelo organismo quando tomada oralmente. Por essa razão, usualmente ela é injetada via endovenosa ou aspirada. Recentemente, os usuários, principalmente os homossexuais, vêm administrando-a via anal, onde a absorção e o efeito são mais rápidos. A morte pode ocorrer usando-se apenas 20-30mg na mucosa nasal, mas um grama tomado pela boca, pode não ser fatal. A tolerância varia de pessoa para pessoa e devido ao tempo de uso. Geralmente as doses intravenosas são da ordem de 100mg e uma dose letal seria 10 vezes maior. Entretanto, usuários habituais podem tolerar doses maiores. A absorção via mucosa nasal é menos efetiva, sendo necessárias dosagens maiores para o mesmo efeito quando usada via parenteral. A morte pode ocorrer com rapidez considerável por “overdose” de cocaína ou por hipersensibilidade. Aumentos dramáticos na pressão sangüínea podem ocorrer levando o indivíduo a uma hemorragia cerebral. As taxas da droga no sangue em casos fatais variam amplamente, mas taxas típicas estendem-se de 1-21mg/l, com uma média de 5,2 (KNIGHT, 1991). Em razão das inúmeras preparações resultando em diferentes formas da droga, métodos de transporte, entre outros, é importante o desenvolvimento de métodos versáteis para a determinação da concentração

da cocaína (CORBURT & KOVES, 1994). Para uma acurada determinação da droga em fluidos biológicos nos casos forenses, o método analítico ideal deveria ser específico, estatisticamente definido (preciso e sensível) e rotineiramente aplicável (CORBURT & KOVES, 1994). Muitos métodos estão sendo desenvolvidos para a determinação da cocaína e seus metabólitos, a benzoilecgonina, a metilecgonina e a ecgonina, em fluídos biológicos como soro, plasma, urina, sangue, humor vítreo e em tecidos, entre os quais o cabelo e as larvas de insetos têm recebido particular atenção (GOFF *et alli*, 1989; HARKEY & HENDERSON, 1989).

2.1 Material e métodos

Neste ensaio, foram utilizados 10 coelhos domésticos brancos (5 controles e 5 experimento), machos, com variação de peso entre 3,0-4,0 Kg, obtidos na Fazenda Floresta situada em Porto Feliz, SP. A metodologia foi modificada segundo GOFF *et alli* (1989). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia por 1 semana antes do início do experimento, foram também pesados, colocados em gaiolas isoladas e alimentados com ração e água.

A droga utilizada no ensaio foi cocaína purificada a partir da droga obtida no Instituto Médico Legal. Após a purificação da droga, foram adicionadas algumas gotas do emulsificador “tween 60”, para que ocorresse a sua diluição e homogeneização antes da administração nos animais. A droga foi administrada via endovenosa em 2ml de solução salina. No experimento, cada réplica recebeu dosagem de 138mg (dose 2x DL 50), sendo que a dose letal 50 (DL50) para coelhos é de 17mg / K (GOFF *et alli*, 1989). No controle, cada coelho recebeu apenas 2ml de solução salina. Após 30 minutos da administração da droga, os coelhos que não morreram em consequência da droga e o controle, foram mortos mecanicamente, sem nenhuma lesão superficial, evitando o extravasamento de sangue. Em seguida foi realizada a necropsia para a retirada de fígado. Duas amostras do fígado de cada coelho foram coletadas e expostas para as larvas de duas espécies de dípteros pertencentes à família Calliphoridae criadas em laboratório: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann).

2.2 Experimento com dípteros

As espécies foram colocadas separadamente nas amostras de fígado. Foram utilizadas 100 larvas de 1º instar da mesma oviposição de cada espécie, com aproximadamente 10 horas de idade. Esse material foi colocado em potes plásticos cobertos com organza e levado para uma sala de criação com temperatura ambiente de aproximadamente 27°C. Em intervalos de 6 horas, amostras de 10 larvas de cada espécie em todas as réplicas e controle foram pesadas individualmente até completarem 54 horas. Em seguida, as larvas foram retiradas do fígado, contadas para determinação da mortalidade, colocadas em frascos de vidro e expostas em uma dieta artificial contendo levedo de cerveja, leite em pó, caseína, agar, nipagim e água (LEAL *et alli*, 1982) para continuarem e completarem o seu desenvolvimento. O tempo de pupariação (início e fim) foi observado, bem como o tempo de emergência do adulto. A longevidade e mortalidade de cada espécie também foram verificadas.

2.2.1 Análise estatística

A análise dos dados relacionados aos experimentos com dípteros e drogas foi feita através do programa estatístico S.A.S. (S.A.S. Institute, Inc., 1987).

Para a análise de variância (ANOVA), utilizou-se o procedimento PROC GLM (Modelos Lineares Gerais); para o teste “t” student, foi utilizado o PROC TEST e para a correlação, o PROC CORR.

O teste F de comparações múltiplas de Duncan, foi usado para verificar possíveis diferenças entre as médias, para cada fator ou variável estipulada. Foram analisados os seguintes fatores: o crescimento (peso) das larvas após sua exposição no fígado contendo droga e controle, a espécie de mosca, a droga utilizada, o tempo de exposição no fígado em horas, as interações espécie*droga, espécie*tempo e droga*tempo e a variável resposta foi o peso da larva (mg), o tempo de pupariação (horas), o tempo de emergência (horas) e a mortalidade.

2.3 Purificação da cocaína

Nos laboratórios de ciência forense a cocaína raramente é encontrada em seu estado puro. É bastante comum a adição de substâncias adulterantes e a cocaína preparada contém muito pouco da droga propriamente dita (JANE *et alli*, 1981). Com isso, faz-se necessária a purificação da droga apreendida antes do início do experimento.

Um (1) grama de cocaína foi diluído em 100ml de hidróxido de amônio 2N. Foi feita uma extração com clorofórmio (5x100ml), para separação da fase aquosa e da orgânica. A fase do clorofórmio foi recuperada e em seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro, para que ocorresse a adsorção de água. A solução foi filtrada, recuperada e seca em um rotaevaporador à baixa temperatura. Após esse procedimento, adicionou-se 1ml de metanol e novamente a solução foi levada ao rotaevaporador para a obtenção dos cristais. Foram obtidos 485mg de cocaína pura.

2.4 Resultados

Larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* foram expostas ao fígado contendo cocaína e ao fígado controle num período de 54 horas. Durante este período as larvas foram pesadas de 6-6 horas (Tabela II -1).

Na 1ª hora de exposição não houve diferença no peso para ambas as espécies de moscas, seja para o controle seja para a cocaína.

Tanto para a 6ª como para 18ª hora de observação e pesagem, as larvas controle de *C. albiceps* se desenvolveram mais rápido que as expostas à droga, porém, o inverso ocorreu com as larvas de *C. putoria*.

Quando as larvas atingiram 24 horas de contato com o fígado, o desenvolvimento de *C. albiceps* controle foi maior do que as expostas à cocaína, entretanto, não houve diferença significativa para *C. putoria* controle e experimento.

Na pesagem de 30 e 42 horas, verificou-se que não houve diferença significativa no desenvolvimento de *C. albiceps*, mas as larvas de *C. putoria* expostas à droga se desenvolveram significativamente mais rápido em relação ao controle.

Quando foram atingidas 54 horas de exposição no fígado, ambas as espécies expostas à cocaína obtiveram um crescimento maior em relação a seu controle, sendo que as larvas de *C. putoria* que se alimentaram no fígado contendo cocaína apresentaram peso dobrado quando comparado ao controle.

Tabela II -1. Peso (mg) das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição no fígado de coelho contendo cocaína ($\bar{x} \pm dp$)

Tempo de exposição	Peso Controle (N 50)	Peso Cocaína (N 50)
1		
<i>C. albiceps</i>	1,0 ± 0a#	1,0 ± 0a
<i>C. putoria</i>	1,0 ± 0a	1,0 ± 0a
6		
<i>C. albiceps</i>	4,9 ± 1,4a	2,1 ± 0,9b
<i>C. putoria</i>	3,9 ± 1,4b	4,1 ± 1,3a
18		
<i>C. albiceps</i>	16,9 ± 3,1a	11,2 ± 4,3b
<i>C. putoria</i>	12,3 ± 2,8b	13,9 ± 3,5a
24		
<i>C. albiceps</i>	31,3 ± 8,0a	22,0 ± 6,2b
<i>C. putoria</i>	28,0 ± 8,8a	27,3 ± 6,5a
30		
<i>C. albiceps</i>	45,2 ± 9,5a	42,3 ± 10,3a
<i>C. putoria</i>	38,4 ± 7,6 b	57,2 ± 11,5a
42		
<i>C. albiceps</i>	81,6 ± 36,6a	112,1 ± 38,3a
<i>C. putoria</i>	107,3 ± 34,5b	167,2 ± 46,6a
54		
<i>C. albiceps</i>	204,6 ± 103,9b	316,2 ± 81,9a
<i>C. putoria</i>	158,4 ± 68,7b	386,2 ± 74,1a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

As larvas expostas ao fígado contendo cocaína iniciaram e terminaram o processo de pupariação antes que as do controle, com uma diferença entre eles do início ao fim deste processo de aproximadamente 13 horas (Tabela II - 2). Os tempos de pupariação das duas espécies foram significativamente diferentes entre aquelas expostas ao fígado contendo a droga e ao controle.

Tanto *C. albiceps* como *C. putoria* expostas à droga tiveram um tempo de pupariação (início e fim) significativamente mais rápido em relação a seus respectivos controles. Quando as espécies foram comparadas, *C. albiceps* iniciou a pupariação com 96 horas e terminou o processo com 115 horas, enquanto *C. putoria* iniciou com 114 horas e o processo foi finalizado com 138 horas (Tabela II - 3).

Tabela II - 2. Tempo de pupariação (em horas) das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado à exposição à cocaína e ao grupo controle (\bar{x})

	Controle (N=10)	Cocaína (N=10)
Início	153,6 a#	105 b
Fim	188,4 a	126,6 b
Diferença	34,8 a	21,6 a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Tabela II - 3. Tempo de pupariação (em horas) de cada espécie de larva de mosca exposta a cocaína ($\bar{x} \pm dp$)

	Controle (N=5)	Cocaína (N=5)
Início		
<i>C. albiceps</i>	150 ± 7,3a	96 ± 0b
<i>C. putoria</i>	157,2 ± 10,7a	114 ± 0b
Fim		
<i>C. albiceps</i>	192 ± 8,5a	115,2 ± 2,7b
<i>C. putoria</i>	184,8 ± 32,1a	138 ± 0b
Diferença		
<i>C. albiceps</i>	42 ± 4,2a	19,2 ± 2,7b
<i>C. putoria</i>	27,6 ± 29,6a	24 ± 0a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

As diferenças entre o tempo de emergência dos adultos foram significativas para ambas as espécies expostas à droga. A diferença do tempo em horas em relação ao controle foi de aproximadamente 60 horas. Embora tenha ocorrido a diferença entre o controle e o experimento para as espécies, quando estas foram comparadas entre si, a diferença não foi significativa. E, apesar de *C. putoria* ter empupado em tempo posterior a *C. albiceps*, não houve diferença significativa na emergência, ou seja, ambas emergiram praticamente com 216 horas (Tabela II - 4).

Tabela II - 4. Tempo de emergência (em horas) de cada espécie de mosca exposta a cocaína ($\bar{x} \pm dp$)

Espécie/droga	Controle (N=10)	Cocaína (N=10)
<i>C. albiceps</i>	273,6 ± 13,1	216,8 ± 1,8
<i>C. putoria</i>	276 ± 8,5	216 ± 0

Foi verificado se a presença da droga influenciou a mortalidade para cada estágio de desenvolvimento: sobra, morte 1 (larva), morte 2 (pupa) e adulto não emergido (adulto).

Considera-se sobra, as larvas que restaram da exposição ao fígado e foram colocadas numa dieta artificial, lembrando que a quantidade inicial no estudo era 100 larvas/pote. A morte 1 é a fase quando as larvas começaram a empupar, a morte 2 está relacionada com quantidade de larvas que não empuparam e morte 3, as pupas que morreram ou adultos que não emergiram (Tabela II - 5).

A mortalidade de *C. albiceps* controle foi maior que a de *C. albiceps* exposta à droga desde o momento da passagem do fígado para a dieta artificial (sobra) até a mortalidade pupal (morte 2). Apenas na morte 3, porcentagem de adultos não emergidos, foi maior para *C. albiceps* do grupo experimental. O mesmo ocorrendo para *C. putoria*.

As diferenças do tempo de duração do estágio larval e pupal e a mortalidade foram significativamente menores para ambas espécies expostas a cocaína do que as do controle, o que mostra a influência desta no desenvolvimento dos dípteros (Tabela II – 6 e II - 7).

Tabela II - 5. Mortalidade (porcentagem) larval, pupal e adultos não emergidos para cada espécie de mosca relacionada à cocaína ($\bar{x} \pm dp$)

	Sobra	Morte 1	Morte 2	Morte 3
Controle (N=5)				
<i>C. albiceps</i>	64,6 ± 14,1b#	15,4 ± 14,1b	1 ± 1,4b	1,8 ± 1,1a
<i>C. putoria</i>	53 ± 25,9a	27 ± 25,9a	4,4 ± 3,7a	10 ± 5,5a
Cocaína (N=5)				
<i>C. albiceps</i>	79,6 ± 0,9a	0,4 ± 0,9b	0 ± 0b	2,6 ± 1,7a
<i>C. putoria</i>	74 ± 0,9a	6,0 ± 4a	2,4 ± 3,6a	24 ± 1,1b

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Tabela II – 6. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya albiceps* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de cocaína

	Controle	Cocaína
Duração do estágio larval (h)	150	96
Mortalidade larval (%)	15	0,4
Duração de pré-pupa para pupa (h)	42	19
Mortalidade pupal (%)	1	0
Tempo de exposição no fígado até emergência do adulto (h)	273	216
Mortalidade total (%)	16	0,4

Foi feita uma comparação na taxa de desenvolvimento do estágio larval, pupal e emergências das moscas que foram expostas a cocaína e com o grupo controle (anexos 1 e 2).

Tabela II - 7. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya putoria* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de cocaína

	Controle	Cocaína
Duração do estágio larval (h)	157	114
Mortalidade larval (%)	27	6
Duração de pré-pupa para pupa (h)	27	24
Mortalidade pupal (%)	4	2
Tempo de exposição no fígado até emergência do adulto (h)	276	216
Mortalidade total (%)	31	8

2.5 Discussão

A análise detalhada de espécies de moscas presentes num corpo em decomposição e de dos seus estágios de desenvolvimento associada ao conhecimento das condições ambientais do local da morte, podem ser uma informação útil do ponto de vista forense para a estimativa do tempo de morte, movimento do corpo após a morte de um local para outro, presença de injúrias *antemortem* e como será discutida, a informação de drogas ou toxinas presentes no corpo (GOFF & LORD, 1994).

Através dos resultados obtidos, verificou-se que a presença de uma substância “estranha” ao organismo pode fazer com que haja uma alteração no padrão de desenvolvimento dos insetos utilizados em investigações forenses.

Em um experimento preliminar, foram testadas 3 (três) concentrações diferentes de cocaína nos coelhos: 2x letal (2x DL 50), letal (DL 50) e sub-letal (DL 25). Como houve uma alteração no padrão de desenvolvimento das larvas independente da dose administrada optou-se por trabalhar apenas com uma concentração. A mesma situação foi observada por GOFF *et alii* (1989) que detalharam os efeitos da cocaína na taxa de desenvolvimento de *Boettcherisca peregrina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae) e não houve diferença significativa na taxa de desenvolvimento larval relacionada às diferentes concentrações da droga e as colônias tiveram um desenvolvimento similar, havendo uma diferença entre as colônias criadas em tecidos contendo a droga e as do controle.

Neste experimento foi observada uma variação na alteração do peso de acordo com o tempo de exposição das larvas no substrato e também de espécie para espécie (*C. albiceps* e *C. putoria*). Esta variação provavelmente está relacionada com a reação do organismo da larva, seja na excreção ou bioacumulação da droga e de cada espécie propriamente dita.

A presença de cocaína no fígado dos coelhos produziu a diminuição da duração do estágio larval de *C. albiceps* e *C. putoria* que se alimentaram nele.

No estudo feito por GOFF *et alii* (1989) as primeiras diferenças detectáveis no desenvolvimento apareceram com 30 horas de exposição. O mesmo ocorrendo no presente estudo, principalmente para *C. putoria*.

O rápido desenvolvimento continuou até as 54 horas de exposição (última pesagem) e foi verificado até o período de pré-pupa.

O início e o final do processo de pupariação ocorreu mais cedo nas colônias que se alimentaram nos tecidos de coelhos contendo a cocaína do que no controle, com isso, a duração do estágio pupal foi significativamente menor.

Os adultos do tratamento também emergiram antes que os do controle sendo a diferença altamente significativa, uma vez que houve uma diferença de mais de 2 dias.

A mortalidade dos adultos também foi influenciada pela droga, sugerindo que a presença da droga nestas espécies pode contribuir para uma diminuição da mortalidade quando relacionada ao grupo controle.

Esses resultados têm uma importante implicação para a estimativa do IPM feita através de técnicas entomológicas nos casos envolvendo cocaína. Primeiramente porque se um indivíduo fez uso de cocaína antes de sua morte, provavelmente a droga ou um dos seus metabólitos estará presente no organismo e a probabilidade de larvas que se alimentaram do tecido deste indivíduo ingerir quantidades de droga é alta. Segundo, para a estimativa do IPM muitas vezes até os minutos são importantes e o que se verifica aqui é uma diferença em horas e até dias. GOFF *et alii* (1989) demonstraram que a presença de cocaína e benzoilecgonina ou ecgonina nas larvas de *B. peregrina* podem acelerar a taxa de desenvolvimento em 12 a 18 horas entre 30 e 78 horas de exposição, adiantando assim o processo de pupariação. Num experimento utilizando heroína (GOFF *et alii*, 1991a) houve uma diferença de aproximadamente 29 horas no período larval, entretanto, no período de pupariação o processo foi entre 18 a 36 horas mais demorado para as larvas do tratamento quando comparado com as do controle.

BOUREL *et alii* (1999) trabalharam com 3 (três) concentrações de morfina utilizando espécimes de *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) e relataram que as larvas criadas no controle e as larvas criadas nas concentrações mais baixas tiveram um desenvolvimento similar, enquanto que as larvas criadas na concentração mais alta

apresentaram um padrão de desenvolvimento mais lento que o controle. Isto sugere que a presença de morfina em tecidos parece retardar o crescimento normal da mosca durante estágios larvais. Esses resultados diferem dos encontrados por GOFF *et alii* (1989) que trabalhou com sarcófagídeo, e por nós que utilizamos duas espécies de califorídeo no presente estudo, onde as larvas do tratamento exibiram um desenvolvimento mais rápido que as controle, ou seja, a droga parece acelerar o desenvolvimento.

PIEN *et alii* (2004) trabalharam com três diferentes concentrações de nordiazepam, usando como estudo espécimes de *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). A concentração de nordiazepam na dieta afetou a concentração de nordiazepam e oxazepam detectada na larva e no pupário. O aumento da concentração de droga nas larvas foi observado com o aumento de concentração de nordiazepam na dieta. Foi observada uma variação na concentração de acordo com o tempo de exposição à dieta. Diferenças significativas foram observadas e os maiores picos de concentração da droga foram registrados no dia 4. Os níveis de concentração tiveram um declínio nos dias 5 e 6 e a partir do 7º e 8º dia de exposição, não foi possível detectar a droga e nem seu metabólito respectivamente na larva. A droga também pode ser detectada nos pupários vazios, embora em uma concentração baixa. A detecção da droga e seu metabólito nos pupários vazios sugere que a metabolização e a bioacumulação pode ocorrer, descartando a hipótese de excreção neste caso. Foi observado um efeito mínimo no desenvolvimento e peso larval quando comparado ao controle, não sendo este significativo.

Em outro trabalho com *Calliphora vicina* o mesmo efeito foi observado no que diz respeito à detecção da droga, apresentando um pico relacionado com os dias 2-4 de exposição na dieta contendo a droga. Várias concentrações de paracetamol foram testadas e não houve diferença significativa entre as diferentes doses da droga, a ser quando comparadas ao controle (O'BRIEN & TURNER, 2004).

Desta forma, estes dados sugestionam que há diferentes respostas pela presença da droga para sarcófagídeos e califorídeos e que dentro da própria família ocorre uma variação, haja vista a ocorrência de diferenças sistemáticas. Embora estudos de entomotoxicologia tenham sido feitos com poucas espécies de moscas, podemos assumir

que variações similares também existam para demais espécies de Diptera que se alimentem em tecidos contendo cocaína.

Assim, a falta de dados relacionados à presença de drogas em uma estimativa baseada no padrão de desenvolvimento normal de *C. albiceps* e *C. putoria* poderia acarretar um grande erro e ser significativamente diferente do tempo real de morte.

Podemos dizer que embora os tecidos do corpo conttenham a droga, a análise toxicológica é feita em sua maioria apenas de maneira qualitativa, pois a quantificação por GC-MS muitas vezes não é possível devido à interferência dos produtos da decomposição. Os insetos, principalmente larvas, provêm uma amostra com menos contaminantes, pois não apresentam produtos de decomposição, não ocorrendo interferência nos resultados (NOLTE *et alii*, 1992); assim sendo a análise qualitativa é facilitada.

2.6 Conclusão

Os efeitos da droga em *C. albiceps* e *C. putoria* podem alterar o tempo requerido para o desenvolvimento e gerar erros na estimativa do IPM utilizando técnicas/métodos entomológicos.

A informação toxicológica combinada com dados entomológicos e do local da cena de morte e da necropsia são essenciais na determinação de envenenamento ou da utilização da droga como causa de morte e na estimativa do IPM.

De modo geral, a cocaína acelerou o desenvolvimento larval e pupal de *C. albiceps* e *C. putoria*.

2.7 Referência Bibliográfica

- BORTOLLETO, M.E., Tóxicos, civilização e saúde. Contribuição à análise dos sistemas de informações tóxico-farmacológicas no Brasil, série Política de Saúde n.º 12, Rio de Janeiro, 1993.

- BOUREL, B.; HÉDOUIN, V.; MARTIN-BOUYER, L.; BÉCART, 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** (1999): 354-358.
- CONE, E.J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **J. Anal. Toxicol.**, **19** (1988): 459-478.
- CORBURT, M.R. & KOVES, E.M., Gas chromatography/mass spectrometry for the determination of cocaine and benzoylecgonina over a wide concentration range (<0.005-5mg/dl) in post mortem blood. **JFSCA**, **39** (1994): 136-149.
- 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** (1989): 91-93.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A.; HEWADIKARAM, K.A. & OMORI, A.I., Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and its implications og this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. **JFSCA**, **36** (1991): 537-542.
- GOFF, M.L. & LORD, W.D., Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, **15** (1994) 51-57.
- HARKEY, M.R. & HENDERSON, G.L., in Baselt, R.C. (Editor), **Advances in Analytical Toxicology**, vol. II, Year Book Medical, Chicago, 1989, pp. 298-329.
- JANE, I; SCOTT, A.; SHARPE, R.W.L. & WHITE, P.C., Quantitation of cocaine in a variety of matrices by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatography**, **214** (1981): 243-248.
- KNIGHT, B., Forensic Pathology, Oxford University Press, New York, 1991. p. 518.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A.J., Rearing the larvae of the blowfly *C. chloropyga* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Revta Bras. Zool.**, **1**(1992): 41-44.
- LORA-TAMAYO, C.; TENA, T. & RODRIGUEZ, A., Cocaine-related deaths. **J. Chromatography A**, **674** (1994): 217-224.

- NOLTE, K.B.; PINDER, R.D. & LORD. W.D., Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposing body. **J. Forensic Sci.**, **4** (1992): 1179-1185.
- O`BRIEN, C. & TURNER, B., Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, **118** (2004): 188-189.
- PIEN, K.; LALOUP, M.; PIPELEERS-MARICHAL, M.; GROOTAERT, P.; 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** (2004):190-193.
- SAS Institute, Inc. (1986) SAS User`s Guide: Statistics, Version 6th en. Cary, North Caroline.
- TAGLIARO, F.; ANTONIOLI, C.; DE BATTISTI, Z.; GHIELMI, S. & MARIGO, M., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of cocaine in plasma and human hair with direct fluorimetric detection. **J. Chromatography A**, **674** (1994): 207-215.

CAPÍTULO III - A DETECÇÃO E O EFEITO DA ANFEPRAMONA NO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS IMATURAS E ADULTAS DE *CHRYSOMYA ALBICEPS* E *CHRYSOMYA PUTORIA*, DUAS ESPÉCIES DE VAREJEIRAS DE INTERESSE FORENSE

As anfetaminas e metanfetaminas são consideradas drogas de abuso em vários países como Estados Unidos e Japão, ocorrendo freqüentemente também na Europa (MELGAR & KELLY, 1993; TANAKA *et alii*, 1994).

Anfetaminas são usadas com propósitos médicos, primeiramente para o tratamento de narcolepsia¹ e hipercinesia² em crianças e também como inibidores de apetite. Atuam no sistema nervoso central e podem causar euforia. Em casos de abuso, amostras de urina são analisadas, enquanto que para análise pós-morte amostras de sangue são utilizadas (GJERDE *et alii*, 1993). Após a ingestão, as drogas são metabolizadas e podem ser detectadas em amostras de urina por 72 horas (GOLDBERGER & CONE, 1994).

Contudo, pouco é conhecido sobre sua toxicologia. Não há muitos estudos sobre as condições do organismo após a morte e apenas alguns casos têm sido publicados, a sua maioria na literatura japonesa. Nos Estados Unidos, quando comparado com os casos de cocaína, o seu uso é relativamente modesto. Porém, em São Francisco, as mortes relacionadas com anfetaminas ocorrem com certa regularidade (KARCH *et alii*, 1999).

A anfepramona, um tipo de anfetamina utilizada neste experimento, é uma substância com ação semelhante à noradrenalina, agindo sobre os sistemas cardiovascular e nervoso central. As anfepramonas geralmente são utilizadas como inibidor de apetite ou quando misturadas a outras substâncias, transformam-se nos rebites, que são comumente utilizados por caminhoneiros, principalmente no Brasil, para não dormirem na estrada.

¹Narcolepsia é uma síndrome neurológica crônica, de causa desconhecida, caracterizada por sonolência excessiva durante o dia, cataplexia, paralisia de sono, alucinações hipnagógicas e sono noturno perturbado.

² Hipercinesia: Desordem por Défice de Atenção com Hiperatividade (DDAH),

Elas podem retardar o metabolismo das catecolaminas, acarretando o seu acúmulo no organismo, trazendo como conseqüências um estado clínico de intenso vasoconstricção, hipertensão, taquicardia e agitação. Ataques convulsivos podem ser observados após uma overdose de anfepramonas (BETRIS, 1997). O metabolismo da anfepramona, também conhecida como dietilpropiona, e a excreção da droga e seus metabólitos têm sido investigada por pesquisadores, entretanto, encontraram dificuldades na separação dos compostos, pois alguns são instáveis e por esta razão interpretada de maneiras diversas (BECKET & STANOJCIC, 1987). Alguns medicamentos como o Dualid[®] S; Hipofagin[®] S; Inibex[®] S e Moderine[®] contém a anfepramona.

As anfetaminas formam uma classe de várias substâncias, algumas com indicações médicas e venda controlada e outras fabricadas em laboratórios clandestinos e consideradas drogas ilícitas. No Brasil a maior parte da anfetamina consumida é vendida legalmente em farmácias, na forma de comprimidos ou cápsulas. No Japão, Austrália e costa leste dos Estados Unidos aparece na forma de pó branco refinado e de pedras translúcidas, chamadas de ice (gelo) ou cristal. São as anfetaminas modificadas, ou metanfetaminas (site: Álcool e Drogas sem Distorção (www.einstein.br/alcooledrogas) Programa Álcool e Drogas (PAD) do Hospital Israelita Albert Einstein, acesso em outubro de 2004)

Em um estudo realizado nos Estados Unidos foram verificados os tipos de morte e sua porcentagem. A morte acidental pelo uso de droga (54%), no caso metanfetamina foi significativamente maior que as demais: acidental por trauma (10%), natural (9%), suicídio (12%), homicídio (10%) e indeterminada (5%), o que mostra a importância de pesquisar mais esse tipo de substância (KARCH *et alii*, 1999).

O consumo destas drogas no Brasil chega a ser alarmante, tanto que até a Organização das Nações Unidas vem alertando o Governo brasileiro a respeito. Por exemplo, entre estudantes brasileiros do 1º e 2º graus das 10 maiores capitais do país, 4,4% revelaram já ter experimentado pelo menos uma vez na vida uma droga tipo anfetamina. O uso freqüente (6 ou mais vezes no mês) foi relatado por 0,7% dos

estudantes. Este uso foi mais comum entre as meninas. Outro dado preocupante diz respeito ao total consumido no Brasil: em 1995 atingiu mais de 20 toneladas, o que significa muitos milhões de doses (site: www.falandoseriosobredrogas.org.br/anfetaminas, acesso em outubro de 2004).

3.1 Material e métodos

Neste ensaio, foram utilizados 9 coelhos domésticos brancos (pois um coelho morreu antes do início do experimento), machos, com variação de peso entre 2,8-3,0 Kg, obtidos na Fazenda Floresta situada em Porto Feliz, SP. A metodologia foi modificada segundo GOFF *et alii* (1989). Os animais foram mantidos no biotério do departamento por 1 semana antes do início do experimento, foram pesados, colocados em gaiolas isoladas e alimentados com ração e água.

A LD 50 para coelhos é de 16mg / K (MSDS, 1991). A droga utilizada no ensaio foi anfepramona (anfepramona) 98%, obtida no centro de intoxicações do HC/UNICAMP. No experimento, os coelhos receberam dosagem de 110mg (dose 2x letal). A anfepramona foi diluída em 2,5 ml de solução salina e administrada via endovenosa através da orelha dos coelhos. No controle, cada coelho recebeu apenas 2ml de solução salina. Após 30 minutos da administração da droga, os coelhos foram mortos mecanicamente, sem nenhuma lesão superficial, evitando o extravasamento de sangue. Em seguida foi realizada a necropsia para a retirada das amostras. Foram coletadas amostras de sangue, coração, fígado, urina e pulmão, as quais foram acondicionadas em frascos de vidro, identificadas e congeladas para posterior preparação para a análise toxicológica utilizando o GC-MS. Mais duas amostras do fígado de cada coelho foram coletadas e expostas para as larvas de duas espécies de dípteros pertencentes à família Calliphoridae: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann), que foram colonizadas em laboratório. As espécies foram colocadas separadamente nas amostras de fígado.

3.2 Experimento com dípteros

Para cada amostra de fígado foram utilizadas 100 larvas de 1º instar da mesma oviposição de cada espécie, com aproximadamente 10 horas de eclosão. Esse material foi colocado em potes plásticos cobertos com organza e levado para uma sala de criação com temperatura ambiente. Em intervalos de 6 horas, amostras de 10 larvas de cada espécie em todas as réplicas e controle foram pesadas individualmente até completarem 54 horas. Quando às 54 horas foram atingidas, 10 larvas de cada espécie foram coletadas e colocadas em frascos de vidro e congeladas para depois serem analisadas toxicologicamente. As larvas restantes foram retiradas do fígado, contadas para determinação da mortalidade e expostas em uma dieta artificial contendo levedo de cerveja, leite em pó, caseína, agar, nipagim e água (LEAL *et alli*, 1982) para continuarem e completarem o seu desenvolvimento. O tempo de pupariação (início e fim) foi observado, bem como o tempo de emergência do adulto e, ainda coletou-se adultos e pupários para posterior análise cromatográfica. A longevidade e mortalidade de cada espécie também foram verificadas.

3.2.1 Análise estatística

A análise dos dados relacionados aos experimentos com dípteros e drogas foi feita através do programa estatístico S.A.S. (S.A.S. Institute, Inc., 1987).

Para a análise de variância (ANOVA), utilizou-se o procedimento PROC GLM (Modelos Lineares Gerais); para o teste “t” student, foi utilizado o PROC TEST e para a correlação, o PROC CORR.

O teste F de comparações múltiplas de Duncan, foi usado para se verificar possíveis diferenças entre as médias, para cada fator ou variável estipulada. Foram analisados os seguintes fatores: o crescimento (peso) das larvas após sua exposição no fígado contendo droga e controle, a espécie de mosca, a droga utilizada, o tempo de exposição no fígado, as interações espécie*droga, espécie*tempo e droga*tempo e a

variável resposta foi o peso da larva (mg), o tempo de pupariação (horas), o tempo de emergência (horas) e a mortalidade.

3.3 Preparação e extração de anfepramona das amostras de tecidos de coelhos e de dípteros

A metodologia utilizada para a extração da anfepramona e para as amostras controle foi modificada segundo BECKETT & STANOJCIC (1987).

Foram preparadas amostras de sangue, fígado, pulmão, coração e urina (coelho) e larvas, pupários e adultos (moscas) para injeção no GC-MS.

Um (1)g ou 1ml de amostra de coelho foi pesado, triturado no politron (moinho de tecidos) e em seguida, homogeneizado em vortex com meio (0,5) ml de hidróxido de amônia, para tornar a amostra alcalina. Em seguida, a amostra foi extraída 3x4ml de clorofórmio, sendo que a cada extração a amostra foi agitada por 1 minuto e centrifugada 5 minutos a 3.000 RPM. A água da amostra foi retirada utilizando-se sulfato de sódio anidro. A amostra foi então colocada para secar num rotaevaporador a 40°C. Ressuspendeu-se a amostra com 100µl de diclorometano. A injeção no cromatógrafo foi feita logo em seguida. A mesma metodologia foi utilizada para as amostras de dípteros, entretanto, ao invés de 1g ou 1ml foram pesados 10 exemplares de cada fase: larva, pupário e adulto.

3.3.1 Preparação da curva padrão

5mg de anfepramona puro (pó) foram diluídos em 50ml de metanol, produzindo uma solução “mãe”. Foram retiradas oito alíquotas diferentes (100µl, 80µl, 60µl, 40µl, 20µl, 10µl, 5µl e 1µl) da solução (equivalentes a µg/ml) e diluídas em 50µl de diclorometano para a obtenção dos pontos da curva de calibração/ padrão. Em seguida, foi feita a injeção de 2µl da amostra no GC-MS. Foi feito um gráfico e através deste, foi obtida a equação da reta. A curva de calibração de anfepramona pura apresentou um $R^2 = 0,92$ e sua equação foi $y = 2E+06x$.

3.3.2 Análise no GC-MS das amostras contendo anfepramona

A análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa foi realizada em um cromatógrafo Hewlett Packard®-5890 série II, acoplado a um detector seletivo de massa HP 5970 com uma coluna capilar S-5 30mx0,32mmx0,25 μ (Sigma). O programa de temperatura utilizado foi: 150-300°C 6°C /min – temperatura do injetor : 250°C, sem razão de divisão durante 0,25 min, com fluxo de He : 1 ml/min (OKEKE *et alii*, 1994). O íon utilizado para a determinação da anfepramona na análise foi o m/z 100. O tempo de retenção (pico) aconteceu em 6 minutos e 89 segundos (6,89).

3.4 Resultados

A diferença no crescimento das larvas de dípteros não foi significativa em relação ao controle na 1ª hora de observação e pesagem. Com 6 horas de exposição, as larvas de *C. albiceps* presentes no fígado com anfepramona não apresentaram crescimento significativo em relação às do controle e, para *C. putoria*, tanto o controle como o experimento tiveram um crescimento similar. E, com 18 horas pode-se verificar que a anfepramona influenciou o crescimento de *C. putoria* quando comparada ao controle, não ocorrendo o mesmo com *C. albiceps*.

Até o fim das 54 horas as larvas de *C. albiceps* que se alimentaram no fígado contendo droga não apresentaram crescimento significativo em relação ao controle.

A partir de 24 horas de contato com a anfepramona, houve uma diferença significativa no desenvolvimento das larvas de *C. putoria* em relação ao controle, sendo que no fim das 54 horas, o seu peso era quase o dobro do controle (Tabela III - 1).

Tabela III - 1. Peso (mg) das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição no fígado de coelho contendo anfepramona ($\bar{x} \pm dp$)

Tempo de exposição	Peso Controle (N 50)	Peso Anfepramona (N 40)
1		
<i>C. albiceps</i>	1,0 ± 0a#	1,0 ± 0a
<i>C. putoria</i>	1,0 ± 0a	1,0 ± 0a
6		
<i>C. albiceps</i>	4,9 ± 1,4a	1,8 ± 0,8b
<i>C. putoria</i>	3,9 ± 1,4a	3,8 ± 1,5b
18		
<i>C. albiceps</i>	16,8 ± 3,1a	11,1 ± 3,5b
<i>C. putoria</i>	12,3 ± 2,9b	26 ± 9,9a
24		
<i>C. albiceps</i>	31,3 ± 8,0a	22,8 ± 6,5b
<i>C. putoria</i>	27,9 ± 8,8b	46,2 ± 13,5a
30		
<i>C. albiceps</i>	45,2 ± 9,5a	34,4 ± 12,2b
<i>C. putoria</i>	38,4 ± 7,6b	54,8 ± 21,7a
42		
<i>C. albiceps</i>	81,6 ± 36,6a	86,6 ± 44,7a
<i>C. putoria</i>	107,3 ± 34,5b	186,6 ± 113,1a
54		
<i>C. albiceps</i>	204,6 ± 103,9a	192,2 ± 138a
<i>C. putoria</i>	158,4 ± 68,6b	294,1 ± 137,9a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Quando a variável estudada foi a espécie, não houve diferença significativa tanto para o início como para o fim da pupariação para *C. albiceps*. Já para *C. putoria*, as diferenças no tempo de pupariação foram significativas, com as larvas do experimento empupando mais rapidamente que as controle (Tabela III - 2 e III - 3).

Tabela III - 2. Tempo de pupariação (em horas) das larvas relacionado a exposição a anfepramona (\bar{x})

	Controle (N=10)	Anfepramona (N=8)
Início	153,6 (a)#	132 (b)
Fim	188,4 (a)	168 (b)
Diferença	34,8 (a)	36 (a)

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Tabela III - 3. Tempo de pupariação (em horas) de cada espécie de larva de mosca exposta a anfepramona ($\bar{x} \pm dp$)

	Controle (N=5)	Anfepramona (N=4)
Início		
<i>C. albiceps</i>	150 \pm 7,3a	156 \pm 30,9a
<i>C. putoria</i>	157,2 \pm 10,7a	108 \pm 13,8b
Fim		
<i>C. albiceps</i>	192 \pm 8,5a	186 \pm 40,9a
<i>C. putoria</i>	184,8 \pm 32,1a	150 \pm 22,9b
Diferença		
<i>C. albiceps</i>	42 \pm 4,2a	30 \pm 12b
<i>C. putoria</i>	27,6 \pm 29,6b	42 \pm 12a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Foi observado que o tempo de emergência para ambas as larvas que estiveram em contato com a anfepramona foi menor que o grupo controle, embora a diferença não tenha sido significativa para *C. albiceps*, enquanto que para *C. putoria* foi altamente significativo, com uma diferença de 48 horas entre o grupo experimental e o controle (Tabela III - 4)

Tabela III - 4. Tempo de emergência (em horas) de cada espécie de mosca para cada droga de abuso utilizada ($\bar{x} \pm dp$)

Espécie/droga	Controle (N=10)	Anfepramona (N=8)
<i>C. albiceps</i>	273,6 ± 13,1	267 ± 46,3
<i>C. putoria</i>	276 ± 8,5	228 ± 13,8

A mortalidade foi significativamente menor para todas as variáveis estudadas para *C. albiceps* e *C. putoria* expostas a anfepramona do que as do grupo controle (Tabela III – 5, III – 6 e III – 7).

Tabela III - 5. Mortalidade (porcentagem) larval, pupal e adultos não emergidos para cada espécie de mosca relacionados a anfepramona ($\bar{x} \pm dp$)

	Sobra	Morte 1	Morte 2	Morte 3
Controle (N=5)				
<i>C. albiceps</i>	64,6 ± 14,1b#	15,4 ± 14,1b	1 ± 1,4b	1,8 ± 1,1a
<i>C. putoria</i>	53 ± 25,8a	27 ± 25,9a	4,4 ± 3,8a	10 ± 5,5a
Anfepramona (N=4)				
<i>C. albiceps</i>	50 ± 17,1b	30 ± 17,1a	6,0 ± 2,9a	8,5 ± 4,8b
<i>C. putoria</i>	57 ± 12,1a	23 ± 12,1a	13 ± 2,9a	17,5 ± 8,4a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Tabela III - 6. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya albiceps* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de anfepramona

	Controle	Anfepramona
Duração do estágio larval (h)	150	156
Mortalidade larval (%)	15	30
Duração de pré-pupa para pupa (h)	42	30
Mortalidade pupal (%)	1	6
Tempo de exposição no fígado até emergência do adulto (h)	273	267
Mortalidade total (%)	16	36

Tabela III - 7. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya putoria* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de anfepramona

	Controle	Anfepramona
Duração do estágio larval (h)	157	108
Mortalidade larval (%)	27	23
Duração de pré-pupa para pupa (h)	27	42
Mortalidade pupal (%)	4	13
Tempo de exposição no fígado até emergência do adulto (h)	276	228
Mortalidade total (%)	31	36

Foi feita uma comparação na taxa de desenvolvimento do estágio larval, pupal e emergências das moscas que foram expostas a anfepramona e com o grupo controle (anexos 3 e 4).

Todas as amostras analisadas de sangue, fígado, coração, pulmão e urina dos coelhos que receberam a droga foram positivas para a anfepramona. As amostras controle injetadas foram negativas para a anfepramona.

A quantificação foi feita de acordo com a área obtida do pico de retenção da droga e aplicou-se a reta da equação da curva de calibração padrão para a obtenção da concentração ($\mu\text{g/ml}$) (Tabela III – 8 e III - 9).

Tabela III - 8. Concentração ($\mu\text{g/ml}$) de anfepramona detectada em amostras dos coelhos que receberam a droga em relação à concentração encontrada na curva de calibração pela análise no GC-MS

Concentração	Área obtida	Sangue (\bar{x})	Coração (\bar{x})	Pulmão (\bar{x})	Fígado (\bar{x})	Urina (\bar{x})
0	0	0	0	0	0	0
0,1	6346751		1,207091	2,670521	0,502091	
0,2	6630161					
0,5	7895750	3,642214				
1	10193157					
2	11370793					
5	15008125					
						41,753553

As amostras de sangue apresentaram uma concentração menor de anfepramona quando comparadas com as da urina, embora a administração da droga tenha ocorrido via endovenosa.

Tabela III - 9. Concentração ($\mu\text{g/ml}$) de anfepramona detectada em amostras de larvas, pupários e adultos de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* em relação à concentração encontrada na curva de calibração pela análise no GC-MS

Concentração	Área obtida	Larva <i>C. albiceps</i> (\bar{x})	Pupa <i>C. albiceps</i> (\bar{x})	Adulto <i>C. albiceps</i> (\bar{x})	Larva <i>C. putoria</i> (\bar{x})	Pupa <i>C. putoria</i> (\bar{x})	Adulto <i>C. putoria</i> (\bar{x})
0	0	0	0		0	0	0
0,1	6346751	0,18554	0,155061	0,005273	1,901635	0,161572	0,018987
0,2	6630161						
0,5	7895750						
1	10193157						
2	11370793						
5	15008125						

3.5 Discussão

Uma toxina ou droga pode ser detectada na larva quando a taxa de absorção excede a taxa de eliminação (INTRONA *et alii*, 2001), mas o resultado negativo na análise toxicológica do material entomológico não significa que o substrato no qual as larvas se alimentaram esteja livre de drogas.

Estudos dos efeitos de drogas no desenvolvimento de dípteros vêm contribuindo para uma estimativa de intervalo pós- morte (IPM) mais acurada. Para a anfepramona, foi verificado um dado interessante com resultados opostos para as duas espécies de moscas estudadas. Durante a exposição no substrato, não houve diferença significativa para as larvas de *C. albiceps* em relação ao controle, mantendo a taxa de crescimento igual ou abaixo do controle. Por outro lado, para *C. putoria*, logo com 18 horas de exposição no fígado contendo a droga já pode ser observado um crescimento significativo em relação ao controle, atingindo o ápice com 54 horas. Esses dados mostram que a anfepramona alterou o padrão de crescimento de ambas moscas, todavia, retardou o crescimento de *C. albiceps* e acelerou o de *C. putoria*. Com isso ficou claro que apesar de

pertencerem à mesma família, apresentam susceptibilidade ou sensibilidade diferente a anfepramona, ou seja, cada espécie pode reagir de maneira diferente à mesma droga e sua concentração durante o estágio larval. Entretanto, no estágio pupal, tanto *C. albiceps* como *C. putoria* criadas no substrato contendo droga iniciaram e finalizaram o processo antes do controle.

A diferença no tempo de emergência foi significativa para *C. putoria* criada no substrato com a droga.

Cada fase de desenvolvimento: larval, pupal e adulta, foi influenciada e comportou-se de maneira diferente em presença da droga, sugerindo que não podemos estabelecer um padrão geral de crescimento da mosca, e sim para cada fase de desenvolvimento. Provavelmente esta alteração esteja ligada ao tempo de permanência de cada fase em contato com a droga e ao próprio metabolismo.

GOFF *et alii* (1992) trabalharam com diferentes concentrações de droga e demonstraram que a presença de metanfetamina acelerou o crescimento larval apenas nas larvas criadas em tecidos contendo a dose letal; as larvas da concentração sub-letal tiveram um desenvolvimento mais lento que as do controle. Os autores também registraram que houve uma relação entre a concentração de metanfetamina e anfetamina nos tecidos e a duração do estágio pupal. Em 1997, GOFF *et alii* observaram o efeito do 3-4 metilenodioxiametanfetamina (MDMA), conhecido como “ecstasy”, onde baixas concentrações da droga retardaram o crescimento das larvas. Em ambos estudos foram utilizados espécimens de *Parasarcophaga ruficornis* Fabricius (Diptera: Sarcophagidae).

Num estudo utilizando morfina (BOUREL *et alii*, 2001), as concentrações encontradas no pupário foram altas quando comparadas à dos adultos mas considerada baixa quando comparada com as concentrações nas larvas.

Não foi encontrada nenhuma correlação entre a concentração de anfepramona presente nos tecidos de coelhos com a concentração na larva que se alimentou no substrato. INTRONA *et alii* (1990) em um estudo experimental observou uma correlação entre as concentrações obtidas nas diferentes amostras, mas muitos pesquisadores não têm verificado qualquer correlação entre elas (GOFF & LORD, 1994, POUNDER, 1991 e KINTZ *et alii*, 1990). Esta variação no resultado ocorre provavelmente porque o

metabolismo da droga pela larva parece variar de acordo com o estágio de desenvolvimento (instar 1, 2 e 3).

TRACQUI *et alii* (2004) participaram de necropsias onde substâncias orgânicas (benzodiazepínicos, barbitúrios, antidepressivos, opiáceos, canabinóides, etc) foram detectadas em larvas necrófagas que se encontravam nos corpos. Foram 29 necropsias e não foi observada correlação entre a concentração da droga nas amostras de larvas versus as amostras de tecidos humanos. Os autores analisaram as larvas separadamente e depois foi feita uma análise comparativa com amostras de larvas retiradas de cada região do corpo humano e também do órgão ou tecido de onde foram coletadas. As diferenças entre as concentrações foram muitas e não reproduzíveis de um caso para outro. Assim, os autores sugerem que os insetos sejam utilizados somente como amostras qualitativas.

A utilização de larvas necrófagas para a determinação do modo de morte e estimativa do IPM é interessante pois elas passam todos os seus estágios no corpo, que serve como fonte protéica, se alimentando ativamente neste. Já, nos casos onde o tempo de morte é grande, os únicos materiais abundante são os pupários dos insetos. Estes permanecem na mesma condição diante de variações climáticas e são viáveis um bom tempo após a emergência do adulto (BOUREL *et alii*, 2001).

Os resultados do presente estudo e dos vários pesquisadores vêm confirmar a necessidade da investigação toxicológica com diferentes espécies de moscas ou até mesmo outros insetos necrófagos.

Podemos dizer que a taxa de desenvolvimento de *C. albiceps* e *C. putoria* foi afetada pela presença da anfepramona, mas o seu efeito depende do estágio do ciclo de vida em que a mosca se encontra.

MUSVASVA *et alii* (2001) investigaram se a presença de diferentes concentrações de metohexital de sódio e a hidrocortisona em fígado de galinha altera o desenvolvimento de *Sarcophaga tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae). Foi observado que tanto o metohexital como a hidrocortisona significativamente retardaram o desenvolvimento das larvas, especialmente nas baixas dosagens. Embora tenha sido verificada uma alta

mortalidade especialmente no experimento com metohexital estatisticamente não houve nenhuma diferença para a mortalidade em todos os estágios de desenvolvimento.

O experimento acima descrito trouxe um dado interessante para a entomologia forense que está relacionado com o processo de hormesis³ ou oligohormesis. Nos experimentos com cocaína (GOFF *et alii*, 1989), heroína (GOFF *et alii*, 1991/A), morfina (BOUREL *et alii*, 1999), etc., e mesmo no presente estudo, foi observado que a presença da droga alterou o desenvolvimento das moscas seja em um, dois ou nas três fases de desenvolvimento (larva, pupa e adulto), e ainda, o tempo de ciclo de vida foi também alterado, necessitando assim, uma correção na estimativa do IPM. Por outro lado, embora a metohexital e hidrocortisona tenham influenciado a taxa de desenvolvimento larval, o tempo do ciclo de vida não foi alterado, com isso, a estimativa do IPM baseada no tempo de eclosão dos adultos de *S. tibialis* não necessitará ser corrigida.

Todas as amostras de coelhos submetidas à análise toxicológica foram positivas. A alta concentração obtida na urina demonstra que a droga é extensivamente metabolizada e segundo GOLDBERGER & CONE (1994) pode ser detectada na urina por mais de 72 horas.

As amostras de larvas, pupários e adultos também foram positivas para anfepramona, o que sugere a bioacumulação da droga e a utilidade do material entomológico como amostra toxicológica.

As amostras de sangue e urina que foram analisadas toxicologicamente foram todas positivas para anfepramona, porém, a concentração foi bem maior na urina do que a detectada no sangue. Esse dado, mostra que a droga é eliminada/excretada com facilidade e rapidez pelo organismo, o que pode justificar o fato desta droga não ter influenciado tanto no ciclo biológico das moscas, em razão de uma possível concentração baixa no fígado (substrato em que as larvas se alimentaram). Após a injeção e análise estatística de todas as amostras, poderemos comprovar ou não esta hipótese. Segundo

³ Hormesis: conceito baseado na lei de Amdt-Schulz – de que concentrações de substâncias potencialmente tóxicas abaixo da quantidade que causa inibição (toxicidade) causarão estimulação (Glossário homeopático, Stephen Barret).

KNIGHT (1991) com a administração de 30mg de anfepramona, o nível da droga no plasma cerca de 2-5 horas depois foi de 2-3mg/l. A concentração no fígado é de 4-74mg/Kg (média de 30) e na urina, pode ocorrer uma alta excreção, variando de 25-700mg/l, com uma média de 237mg/l.

3.6 Conclusões

Sem dúvida, todos os esforços devem ser tomados para que a utilização dos insetos nas investigações criminais seja segura. Mas temos que lembrar que a entomologia forense está tomando novo fôlego e que os experimentos estão sendo desenvolvidos seja simulando cenas de crime e modos de morte ou abrangendo diversos modelos animais.

Através dos resultados foi verificado que não podemos usar taxas de desenvolvimento anômalas ou alteradas de estágios específicos para a estimativa do IPM, mas é necessário utilizar as medidas do ciclo completo para que a estimativa tenha uma base maior de segurança. Por outro lado, para a determinação da causa morte, amostras de qualquer estágio de desenvolvimento podem ser utilizadas, embora as larvas sejam as mais indicadas tanto para a análise qualitativa como quantitativa.

Podemos concluir que a anfepramona atuou de maneira significativamente diferente nas duas espécies de moscas, seja retardando ou acelerando o desenvolvimento, assim, fica evidente a necessidade de estudos com outras espécies de interesse forense e drogas.

A espécie *C. albiceps* não teve um aumento no tempo de desenvolvimento como ocorreu em *C. putoria*. No entanto, a anfepramona foi facilmente detectada em suas amostras. Sendo assim, ambas as moscas podem ser utilizadas como amostras biológicas para a detecção de anfepramona nos casos de investigação criminal.

3.7 Referência Bibliográfica

- BECKETT, A.H. & STANOJCIC, M., Re-evaluation of the metabolism and excretion of diethylpropion in non-sustained and sustained release formulations. **J. Pharm. Pharmacol.**, **39** (1987):409-415.
- BETRIS, A., Anfetaminas: perigo nas estradas. **Pharmacia Brasileira**, **7** (1997): 20-23.
- BOUREL, B.; HÉDOUIN, V.; MARTIN-BOUYER, L.; BÉCART, 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** (1999): 354-358.
- BOUREL, B.; TOURNEL, G.; HEDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOFF, M.L. & GOSSET, D., Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci Int.**, **120** (2001): 127-131.
- GJERDE, H.; HASVOLD, I.; PETTERSEN, G. & CHRISTOPHERSEN, A., Determination of amphetamine and methamphetamine in blood by derivatization with perfluorooctanoyl chloride and gas chromatography/mass spectrometry. **J. Analytical Toxicol.**, **17** (1993): 65-68.
- GOLDBERGER, B.A. & CONE, E.J., Confirmatory tests for drugs in the workplace by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatography A**, **674** (1994): 73-86.
- 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** (1989): 91-93.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A.; HEWADIKARAM, K.A. & OMORI, A.I., Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and its implications og this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. **JFSCA**, **36** (1991): 537-542.
- GOFF, M.L., BROWN, W.A. & OMORI, A.I., Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. **J. Forensic Sci.**, **37** (1992) 867-872.

- GOFF, M.L. & LORD, W.D., Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, **15** (1994) 51-57.
- GOFF, M.L.; MILLER, M.L.; PAULSSON, J.D.; LORD, W.D.; RICHARDS, E. & OMORI, A.I., 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.**, **42** (1997) 276-280.
- INTRONA, F.J.; LODICO, C.; CAPLAN, Y.H. & SMIALEK, J., Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. **JFSCA**, **35** (1990): 118-122.
- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C.P. & GOFF, M.L., Entomotoxicology, **Forensic Sci Int.**, **120** (2001): 42-47.
- KARCH, S.B.; STEPHENS, B.G. & HO, C.H., Methamphetamine related deaths in San Francisco: demographic, pathologic and toxicologic profiles. **J. Forensic Sci.**, **44** (1999): 359-368.
- KINTZ, P.; TRACQUI, A.; LUDS, B.; WALLER, J.; BOUKHABZA, A.; MANGIN, P.; LUGNIER, A.A. & CHAUMONT, A.J., Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, **11** (1990): 63-65.
- KNIGHT, B., Forensic Pathology, Oxford University Press, New York, 1991. p. 518.
- In INTERNET: NTP Chemical Repository (Radian Corporation, August 29, 1991) MSDS for diethyl-propione.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A.J., Rearing the larvae of the blowfly *C. chloropyga* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Revta Bras. Zool.**, **1**(1992): 41-44.
- MELGAR, R. & KELLY, R.C., A novel GC/MS derivatization method for amphetamines. **J. Anal. Toxicol.**, **17** (1993): 399-402.
- MILLER, M.L.; LORD, W.D.; GOFF, M.L.; DONNELLY, B.; MCDONOUGH, E.T. & ALEXIS, J.C., Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuvia (Dermestidae) associated with mummified human remains. **J. Forensic Sci.** **39** (1994) 1305-1213.

- 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 (Curranella) tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae) and implications for estimating post mortem interval. **Forensic Sci. Int.**, **120** (2002): 37-41.
- OKEKE, C.C.; WYNN, J.E. & PATRICK, H.S., Simultaneous analysis of cocaine, benzoylecgonine, methylecgonine and ecgonine in plasma using an exchange resin and gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, **38** (1994): 52-56.
- POUNDER, D.J., Forensic entomo-toxicology. **J. Forensic Sci.**, **31** (1991): 469-472.
- SAS Institute, Inc. (1986) SAS User`s Guide: Statistics, Version 6th en. Cary, North Caroline.
- TANAKA, K.; OHMORI, T.; INOVE, T. & SETA, S., Impurity profiling analysis of illicit methamphetamine by capillary gas chromatography. **JFSCA**, **39** (1994): 500-511.
- TRACQUI, A.; KEYSER-TRACQUI, C.; KINTZ, P. & LUDES, B., Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? **Int. J. Legal Med.**, **118** (2004): 194-196.

CAPÍTULO IV - A DETECÇÃO E O EFEITO DE *Cannabis sativa* L. NO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS IMATURAS E ADULTAS DE *CHRYSOMYA ALBICEPS* E *CHRYSOMYA PUTORIA*, DUAS MOSCAS VAREJEIRAS DE INTERESSE FORENSE

A maconha também é conhecida como marijuana, erva maldita, diamba entre outros. Seu consumo é feito através de xaropes, folhas de mascar e, mais comumente, em forma de cigarros. Alguns não a consideram propriamente uma droga tóxica por não trazer dependência física nem crises de abstinência. Entretanto é um excitante provocando graves perturbações psíquicas e leva o viciado a consumir outro tipo de droga (FRANÇA, 1998).

A respeito de sua farmacologia, foi observado que dos mais de 30 canabinóides presentes na maconha, sem dúvida o principal é o Δ^9 - tetrahydrocannabinol. Além da euforia, a maconha tem um significativo efeito na memória e parece afetar a habilidade de concentração, interferindo na informação já presente na memória. Os efeitos mais comuns observados variam de um aumento na frequência cardíaca (taquicardia), congestão vascular da conjuntiva, secura da boca e garganta, e aumento excessivo de apetite, especialmente para o consumo de doces. Ocasionalmente náusea, vomito e diarreia podem ocorrer (GUDZINOWICZ *et alii*, 1980).

A fim de se preservar a integridade dos compostos da maconha e evitar contaminações com compostos endógenos que possuem similar propriedade de extração, métodos de maior precisão, como o GC-MS, são indicados para a identificação estrutural da droga (HARVEY & PATON, 1980).

4.1 Material e métodos

Neste ensaio, foram utilizados 10 coelhos domésticos brancos, machos, com variação de peso entre 3,0-4,0 Kg, obtidos na Fazenda Floresta situada em Porto Feliz, SP. A metodologia foi modificada segundo GOFF *et alii* (1989). Os animais foram

mantidos no biotério do departamento por 1 semana antes do início do experimento, foram pesados, colocados em gaiolas isoladas e alimentados com ração e água.

A LD 50 utilizada foi de 35mg / K (NTP Chemical Repository-MSDS, 1991). A droga utilizada no ensaio foi a *Cannabis sativa*, fornecida pelo Instituto Médico Legal de Campinas - SP. No experimento, os coelhos receberam dosagem de 70mg (dose 2x letal) diluídos em 2,5ml de solução salina. Como o extrato da maconha estava praticamente puro e não se dissolveu somente em salina, adicionou-se também algumas gotas de tween (emulsificador), para que ocorresse a diluição homogênea. A droga foi administrada via endovenosa. Os coelhos foram colocados em gaiolas e suas reações anotadas. Após 30 minutos da administração da droga, os coelhos foram mortos mecanicamente sem nenhuma lesão superficial. Em seguida foi realizada a necropsia para a retirada das amostras. Foram coletadas amostras de sangue, coração, fígado, urina e pulmão, as quais foram acondicionadas em frascos de vidro e congeladas para posterior preparação para análise toxicológica utilizando o GC-MS. Em seguida, larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera:Calliphoridae) foram expostas separadamente em partes de fígado, utilizado como substrato de alimentação e desenvolvimento.

4.2 Experimento com dípteros

Em cada fígado, foram utilizadas 100 larvas de 1º instar da mesma oviposição de cada espécie, com aproximadamente 10 horas de idade. Esse material foi colocado em potes plásticos cobertos com organza e levado para uma sala de criação com temperatura ambiente. Em intervalos de 6 horas, amostras de 10 larvas de cada espécie em todas as réplicas e controle foram pesadas individualmente até completarem 54 horas. Quando às 54 horas foram atingidas, 10 larvas de cada espécie foram coletadas e colocadas em frascos de vidro e congeladas para depois serem analisadas toxicologicamente. As larvas restantes foram retiradas do fígado, contadas para determinação da mortalidade e expostas em uma dieta artificial contendo levedo de cerveja, leite em pó, caseína, agar, nipagim e água (LEAL *et alli*, 1982) para continuarem e completarem o seu

desenvolvimento. O tempo de pupariação (início e fim) foi observado, bem como o tempo de emergência do adulto e, ainda coletou-se adultos e pupários para posterior análise cromatográfica. A longevidade e mortalidade de cada espécie também foram verificadas.

4.2.1 Análise estatística

A análise dos dados relacionados aos experimentos com dípteros e drogas foi feita através do programa estatístico S.A.S. (S.A.S. Institute, Inc., 1987).

Para a análise de variância (ANOVA), utilizou-se o procedimento PROC GLM (Modelos Lineares Gerais); para o teste "t" student, foi utilizado o PROC TEST e para a correlação, o PROC CORR.

O teste F de comparações múltiplas de Duncan, foi usado para verificar possíveis diferenças entre as médias, para cada fator ou variável estipulada. Foram analisados os seguintes fatores: o crescimento (peso) das larvas após sua exposição no fígado contendo droga e controle, a espécie de mosca, a droga utilizada, o tempo de exposição no fígado, as interações espécie*droga, espécie*tempo e droga*tempo e a variável resposta foi o peso da larva (mg), o tempo de pupariação (horas), o tempo de emergência (horas) e a mortalidade.

4.3 Preparação e extração do princípio ativo da maconha

A preparação foi feita a partir da folha de *Cannabis sativa* L. e foi feita em frações.

15g de maconha com 80ml de acetona foram deixados para refluxar por 2 horas. O extrato ficou separado para decantar (1º extrato). Em seguida foi feita uma aplicação deste extrato em placa de sílica (hexano:éter etil)(8:2) para verificar a presença ou ausência da substância. O resíduo ficou em refluxo por 2 horas com 60ml de acetona. Uma segunda decantação foi feita (2º extrato). Os 1º e 2º extratos foram misturados e destilados com acetona sob vácuo em banho a 50°C (resíduo1). O resíduo foi diluído em 7ml de éter de petróleo (30-60°C) e extraído com 7ml de água. Então, foi centrifugado e a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica preservada. O procedimento anterior foi repetido. As duas

fases orgânicas foram misturadas e destiladas com acetona (resíduo 2). Foram adicionados 15ml de éter de petróleo e 1 gota de H₂SO₄ 98% para um refluxo de 2 horas. O material foi resfriado e lavado com 2 porções de 10ml de água. Depois, foi colocado no agitador magnético e a fase aquosa desprezada. Adicionou-se 1g de NaHCO₃ na fase orgânica, que foi lavada em seguida com 10ml de água. Uma nova aplicação em placa de sílica foi feita. O solvente foi evaporado no rotaevaporador. O extrato foi dissolvido em 25ml de hexano e eluído em 3g de silicagel 60 (1^a sílica). O eluato foi novamente filtrado em 2g de sílica 60 (2^a sílica). O eluato foi colocado para secar e pesado (Fração I). A 2^a sílica foi eluída com éter de petróleo (25ml). O eluato foi colocado para secar e pesado (Fração II). A 1^a e 2^a sílica foram eluídas com tolueno (25ml) e em seguida, foram passados por mais 2g de sílica (3^a sílica). O eluato foi seco e pesado (Fração III). O canabinol saiu nesta fração com RF = 0,44. Logo, foi dissolvido em 5ml de hexano e eluído sobre 0,5g de sílica (4^a sílica). O eluato foi colocado para secar e depois foi pesado (Fração IV).

4.3.1 Preparação e extração de maconha das amostras de tecidos de coelhos e de dípteros

A metodologia utilizada para a extração da maconha foi modificada segundo HARVEY *et alii* (1982). Foram preparadas amostras de sangue, fígado, pulmão, coração e urina (coelho) e larvas, pupários e adultos (moscas) para injeção no GC-MS.

Um (1)g ou 1ml de amostra foi pesado, triturado em um politron (moinho de tecidos) e em seguida, homogeneizado em vortex com 5ml de acetato de etila. Em seguida, a amostra foi lavada com solvente 5 vezes para a separação dos lipídios e dos metabólitos em uma coluna contendo 0,8g de Sephadex LH-20. Cada fração foi colocada no rotaevaporador para secar e foi ressuspensa com diclorometano para a injeção no cromatógrafo.

Tabela IV - 1. Fracionamento dos canabinóides e metabólitos na coluna de Sephadex LH-20

Fração	Solvente	Volume (ml)
1	Clorofórmio	18
2	Clorofórmio	8
3	Clorofórmio	10
4	Clorofórmio	35
5	Clorofórmio-metanol (4:1)	50

4.3.2 Análise no GC-MS das amostras

A análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa foi realizada em um cromatógrafo Hewlett Packard®-5890 série II, acoplado a um detector seletivo de massa HP 5970 com uma coluna capilar S-5 30mx0,32mmx0,25 μ (Sigma). O programa de temperatura utilizado foi: 150-300°C 6°C /min – temperatura do injetor : 250°C, sem razão de divisão durante 0,25 min, com fluxo de He : 1 ml/min (OKEKE *et alii*, 1994). O íon utilizado para a determinação da maconha na análise foi o m/z 295. O tempo de retenção (pico) aconteceu em 54.473 minutos.

4.4 Resultados

Para a 1ª hora de pesagem, não houve diferença significativa no desenvolvimento das larvas de dípteros do controle bem como às expostas a maconha.

Com 6 horas de exposição as larvas controle de *C. albiceps* desenvolveram-se significativamente menos que as larvas do experimento, entretanto, não houve diferença significativa entre controle e experimento para *C. putoria*.

Nas pesagens com 18, 24, 30 e 42 horas de exposição não houve diferenças significativas para as larvas de *C. albiceps*, por outro lado, a diferença do peso das larvas de *C. putoria* em contato com a droga foi altamente significativa em relação ao seu respectivo controle.

Quando as larvas estavam com 54 horas, a última pesagem foi feita e ambas as espécies expostas à maconha tiveram uma diferença no peso significativamente superior ao controle (Tabela IV - 2).

Tabela IV - 2. Peso (mg) das larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição no fígado de coelho contendo maconha ($\bar{x} \pm dp$)

Tempo de exposição	Peso	
	Controle (N 50)	Maconha (N 50)
1		
<i>C. albiceps</i>	1,0 ± 0a#	1,0 ± 0a
<i>C. putoria</i>	1,0 ± 0 ^a	1,0 ± 0a
6		
<i>C. albiceps</i>	4,9 ± 1,4a	2,5 ± 0,7b
<i>C. putoria</i>	3,9 ± 1,4a	3,3 ± 1,7a
18		
<i>C. albiceps</i>	16,8 ± 3,1a	15,6 ± 3,8a
<i>C. putoria</i>	12,2 ± 2,9b	35,1 ± 11,1a
24		
<i>C. albiceps</i>	31,3 ± 8,0b	28,7 ± 7,9b
<i>C. putoria</i>	27,9 ± 8,8b	95,1 ± 21,3a
30		
<i>C. albiceps</i>	45,2 ± 9,5a	45,1 ± 14,5a
<i>C. putoria</i>	38,5 ± 7,6b	125,5 ± 38,1a
42		
<i>C. albiceps</i>	81,6 ± 36,6a	110,9 ± 81,6a
<i>C. putoria</i>	107,3 ± 34,5b	392,4 ± 89,7a
54		
<i>C. albiceps</i>	204,6 ± 103,9b	278,8 ± 193,5a
<i>C. putoria</i>	158,4 ± 68,6b	478,8 ± 91,1a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Para o tempo de pupariação, independente da espécie estudada, considerando-se apenas larvas expostas à droga e ao controle, foi significativamente mais rápido para as larvas que tiveram contato com a maconha. Elas iniciaram e terminaram a pupariação antes que o controle, porém, a duração deste processo foi menor para as larvas controle (Tabela IV - 3). Quando a espécie de díptero foi levada em conta, observou-se que para *C. albiceps* o início da pupariação não foi estatisticamente significativo, mas o término foi significativo para as larvas do experimento, enquanto que para *C. putoria* exposta à droga a diferença no tempo de pupariação foi significativa tanto para o início como para o seu fim (Tabela IV – 4).

Tabela IV - 3. Tempo de pupariação (em horas) das larvas relacionado à maconha (\bar{x})

	Controle (N=10)	Maconha (N=10)
Início	153,6 (a)#	112 (b)
Fim	188,4 (a)	162 (b)
Diferença	34,8 (b)	50,6 (a)

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Tabela IV - 4. Tempo de pupariação (em horas) de cada espécie de larva de mosca exposta a maconha ($\bar{x} \pm dp$)

	Controle (N=5)	Maconha (N=5)
Início		
<i>C. albiceps</i>	150 \pm 7,3a	132 \pm 24a
<i>C. putoria</i>	157,2 \pm 10,7a	96 \pm 0b
Fim		
<i>C. albiceps</i>	192 \pm 8,5a	168 \pm 48b
<i>C. putoria</i>	184,8 \pm 32,1a	158,4 \pm 13,1b
Diferença		
<i>C. albiceps</i>	42 \pm 4,2a	36 \pm 24b
<i>C. putoria</i>	27,6 \pm 9,6b	62,4 \pm 13,1a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Os adultos do controle de ambas espécies de moscas emergiram antes que os expostos à maconha, embora tenham empupado após o grupo experimental (Tabela IV – 5).

Tabela IV - 5. Tempo de emergência (em horas) de cada espécie de mosca para maconha ($\bar{x} \pm dp$)

Espécie/droga	Controle (N=10)	Maconha (N=10)
<i>C. albiceps</i>	273,6h \pm 13,1	401,4 \pm 334,7
<i>C. putoria</i>	276 \pm 8,5	372,6 \pm 350,2

A droga influenciou a longevidade das espécies de moscas. A mortalidade de *C. albiceps* e *C. putoria* expostas à maconha, em sua maioria foi significativamente maior que as do controle (Tabela IV – 6, IV – 7 e IV – 8).

Tabela IV - 6 Mortalidade (porcentagem) larval, pupal e adultos não emergidos para cada espécie de mosca relacionados às drogas utilizadas ($\bar{x} \pm dp$)

	Sobra	Morte 1	Morte 2	Morte 3
Controle (N=5)				
<i>C. albiceps</i>	64,6 \pm 14,1b#	15,4 \pm 14,5b	1 \pm 1,4b	1,8 \pm 1,1a
<i>C. putoria</i>	53 \pm 25,9a	27 \pm 25,9a	4,4 \pm 3,8a	10 \pm 5,5a
Maconha (N=5)				
<i>C. albiceps</i>	47,6 \pm 29,6b	32,4 \pm 29,6a	7,2 \pm 3,3b	1,2 \pm 1,6c
<i>C. putoria</i>	66,4 \pm 13,6a	13,6 \pm 13,6b	7,4 \pm 7,1b	40 \pm 12,8a

#médias com a mesma letra em análise por linha (horizontal) não foram significativamente diferentes quando o teste de comparação múltipla de DUNCAN foi utilizado (taxa global de erro $\alpha = 0,05$)

Tabela IV - 7. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya albiceps* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de maconha

	Controle	Maconha
Duração do estágio larval (h)	150	132
Mortalidade larval (%)	15	32
Duração de pré-pupa para pupa (h)	42	36
Mortalidade pupal (%)	1	7
Tempo de exposição no fígado até emergência do adulto (h)	273	401
Mortalidade total (%)	16	39

Tabela IV - 8. Duração do estágio larval, mortalidade larval, duração do estágio pupal, mortalidade pupal e mortalidade total para as colônias de *Chrysomya putoria* criadas em fígados de coelhos contendo concentração 2x letal de maconha

	Controle	Maconha
Duração do estágio larval (h)	157	96
Mortalidade larval (%)	27	14
Duração de pré-pupa para pupa (h)	27	62
Mortalidade pupal (%)	4	7
Tempo de exposição no fígado até emergência do adulto (h)	276	372
Mortalidade total (%)	31	21

Foi feita uma comparação na taxa de desenvolvimento do estágio larval, pupal e emergências das moscas que foram expostas a maconha e com o grupo controle (anexos 5 e 6).

Todas as amostras de sangue, fígado, coração, pulmão e urina analisadas foram positivas para a maconha.

A quantificação não foi feita, mas foi possível observar a área obtida do pico de retenção da droga nos tecidos de coelho e dípteros (Tabela IV – 9 e IV - 10).

Tabela IV - 9. Área obtida de maconha detectada em amostras de coelho pela análise no GC-MS

Sangue (\bar{x})	Coração (\bar{x})	Pulmão (\bar{x})	Fígado (\bar{x})	Urina (\bar{x})
31574231	770379,8	7948256	5778607	21308684

Tabela IV - 10. Área obtida de maconha detectada em amostras de larvas, pupários e adultos de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* pela análise no GC-MS

Larva <i>C. albiceps</i> (\bar{x})	Pupa <i>C. albiceps</i> (\bar{x})	Adulto <i>C. albiceps</i> (\bar{x})	Larva <i>C. putoria</i> (\bar{x})	Pupa <i>C. putoria</i> (\bar{x})	Adulto <i>C. putoria</i> (\bar{x})
2363044	101805,2	123971,4	188548,6	35159,6	20447,6

4.5 Discussão

O metabolismo do Δ^9 -tetrahydrocannabinol, o principal princípio psicoativo da *Cannabis sativa* L., bem como dos demais metabólitos, é complexo e demonstra uma grande variabilidade nos organismos (HARVEY *et alii*, 1979 apud HARVEY *et alii*, 1982). Estudos mostram que amostras de tecidos são melhores para a caracterização e determinação do principal sítio de ação da droga em relação das amostras de urina ou fezes. Ainda, estudos do metabolismo e excreção da droga em coelhos têm demonstrado que a rota urinária é “preferida” do que a rota fecal, em contraste com a excreção de muitas outras espécies onde a eliminação fecal é usualmente dominante (AGURELL *et alii*, 1970 apud HARVEY *et alii*, 1982).

A baixa concentração dos compostos presentes em tecidos e fluidos animais, juntamente com a presença de um grande número de compostos com estruturas bem

similares, torna difícil o isolamento dos metabólitos mais abundantes (HARVEY *et alii*, 1982). Com isso, o método de extração utilizado neste experimento foi adotado para obter frações metabólicas contendo o maior número de metabólitos com o mínimo de contaminantes.

O padrão de desenvolvimento larval de *C. albiceps* e *C. putoria* criadas em substrato contendo maconha e controle foi observado num período de 54 horas. As larvas de *C. albiceps* tiveram um comportamento diferenciado apresentando variações no desenvolvimento durante as horas de exposição, tendo um desenvolvimento abaixo ou similar ao do controle até 42 horas. Quando 54 horas foram atingidas, *C. albiceps* teve um crescimento significativo em relação ao controle. Esse resultado sugere que as larvas desta espécie demoram mais para incorporar a maconha ou que são mais resistentes aos efeitos da droga.

Já para *C. putoria*, com 18 horas de exposição pôde-se notificar as primeiras alterações no crescimento, que se manteve até o fim das 54 horas. As larvas criadas nos tecidos contendo maconha desenvolveram-se significativamente mais que as do controle com uma diferença marcante na pesagem de 54 horas, sugerindo uma susceptibilidade maior aos efeitos causados pela droga.

As larvas são capazes de eliminar uma variedade de substâncias e se elas conseguem fazer isso antes da pupariação, este estágio de desenvolvimento pode não ser afetado pela dieta da larva (NUORTEVA *et alii*, 1982; WILSON *et alii*, 1993).

No experimento a droga influenciou o tempo de pupariação (início e fim) mas não o tempo de duração do processo, ou seja, as larvas criadas no fígado com a droga leva o mesmo tempo para completar a metamorfose quando comparadas ao grupo controle, embora o processo se inicie e termine antes que no controle, independentemente da espécie estudada. Outro fator que chama a atenção é que, embora a pupariação tenha se iniciado e terminado antes que o controle, as larvas expostas à droga emergiram após as do grupo controle.

Em um experimento realizado com sarcófagídeos, a sobrevivência de pupas que se alimentaram em tecido contaminado com cocaína ou heroína (GOFF *et alii*, 1989 e 1991) foi de aproximadamente 90%, não sendo afetada pela presença ou pela

concentração da droga. O "ecstasy" afetou a mortalidade apenas das larvas que se alimentaram no tecido contendo baixas concentrações (GOFF *et alii*, 1997) e a amitriptilina matou mais de 50% das larvas (GOFF *et alii*, 1993).

WILSON *et alii* (1993) analisaram larvas criadas em músculo esquelético humano obtido de um caso de suicídio por overdose de co-proxamol e amitriptilina. Amitriptilina, nortriptilina e propoxifeno foram todos detectados em larvas de terceiro instar em concentrações abaixo das encontradas no músculo. Análises dos pupários e adultos foram negativas. Esses resultados mostram que não ocorreu o bioacúmulo das drogas durante o ciclo de vida destas larvas, sugerindo uma eficiente eliminação através dos túbulos de Malpighi e nefrócitos das larvas.

Neste experimento pudemos observar que a droga foi detectada em todas as fases de desenvolvimento dos dípteros, sendo que o pico maior da droga foi encontrada nas larvas que se alimentaram diretamente no fígado. Os cinco tecidos dos coelhos analisados também foram positivos, sendo que no sangue, urina e pulmão foram detectados os maiores picos da droga e no fígado e coração respectivamente, picos mais baixos.

Um trabalho desenvolvido por KANESHRAJAH & TURNER (2004) demonstra a importância da amostra biológica oferecida como substrato para as larvas. Um corpo após a morte representa uma gama de tecidos e órgãos que estão disponíveis e servem como substrato de oviposição e colonização de moscas necrófagas. Particularmente, os tecidos moles, como pulmão e cérebro, são freqüentemente atacados primeiro e consumidos mais rapidamente que os demais. KANESHRAJAH & TURNER (2004) observaram o crescimento de *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) em diferentes tecidos do corpo (fígado, cérebro, músculo cardíaco, pulmão e rim) e verificaram que as larvas que se alimentaram no fígado se desenvolveram significativamente mais rápido que nos demais órgãos, o que levou a uma diferença de aproximadamente 2 dias quando comparados. Potencialmente, este encontro tem uma implicação importante no que diz respeito à estimativa do intervalo de morte. Os autores sugerem que os estudos realizados com entomotoxicologia sejam realizados não apenas com um tipo de substrato, mas com vários modelos para que possíveis erros no cálculo da estimativa do intervalo de morte (IPM) sejam minimizados.

4.6 Conclusão

As duas espécies de califorídeo utilizadas no experimento, *C. albiceps* e *C. putoria* podem ser empregadas na entomologia forense para a detecção de substâncias ilícitas presentes em um corpo.

A presença da maconha nos dípteros influenciou o crescimento e desenvolvimento alterando o padrão do ciclo biológico das moscas seja na fase imatura ou adulta. Potencialmente isto têm implicações quando taxas de desenvolvimento obtidas em laboratório são utilizadas para calcular o intervalo de morte em uma investigação forense.

4.7 Referência Bibliográfica

- FRANÇA, G.V. 1998. **Medicina Legal**. Ed. Guanabara e Koogan A.S., RJ, 5ª edição. Capítulo 15, pg. 264.
- 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** (1989): 91-93.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A.; HEWADIKARAM, K.A. & OMORI, A.I., Effect of heroin in decomposing tissues on the development of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. **JFSCA**, **36** (1991): 537-542.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A.; OMORI, A.I. & LA POINT, D.A., Preliminary observations of the effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of postmortem interval. **JFSCA**, **38** (1993): 316-322.
- GOFF, M.L.; MILLER, M.L.; PAULSSON, J.D.; LORD, W.D.; RICHARDS, E. & OMORI, A.I., 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.**, **42** (1997) 276-280.

- GUDZINOWICZ , B.J.; GUDZINOWICZ, M.J.; HOLOGGITAS, J. & DRISCOLL, J.L., The analysis of *Marijuana* cannabinoids and their metabolites in biological media by GC-MS techniques. In: Advances in chromatography. GIDDINGS, J.S.; GRUSHKA, E.; CAZES, J. & BROWN, P.R., vol. 18, Chapter 5, Marcel Dekker, Inc, New York and Basel, 1980.
- HARVEY, D.J. & PATON, W.D.M., The use of deuterium labelling in structural and quantitative studies of tetrahydrocannabinol metabolites by mass spectrometry. **Advan. Mass Spectrom.**, **8** (1980): 1194-1203.
- HARVEY, D.J.; LEUSCHNER, J.T.A. & PATON, W.D.M., Gas chromatographic and mass spectrometric studies on the metabolism and pharmacokinetics of Δ^1 tetrahydrocannabinol in the rabbit. **J. Chromatography**, **239** (1982): 243-250.
- KANESHRAJAH, G. & TURNER, B., *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. **Int. J. Legal Med.**, **118** (2004): 242-244
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A.J., Rearing the larvae of the blowfly *C. chloropyga* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Revta Bras. Zool.**, **1**(1992): 41-44.
- MILLER, M.L.; LORD, W.D.; GOFF, M.L.; DONNELLY, B.; MCDONOUGH, E.T. & ALEXIS, J.C., Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuvia (Dermestidae) associated with mummified human remains. **J. Forensic Sci.** **39** (1994) 1305-1213.
- In INTERNET: NTP Chemical Repository (Radian Corporation, August 29, 1991) MSDS for cannabinoids.
- NUORTEVA, P. & NUORTEVA, S.L., The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. **Ambio**, **11** (1982): 34-37.
- OKEKE, C.C.; WYNN, J.E. & PATRICK, K.S., Simultaneous analysis of cocaine, benzoylecgonine, methylecgonine, and ecgonine in plasma using an exchange resin and gas chromatography-mass spectrometry. **Chromatographia**, **38** (1994): 52-56.
- SAS Institute, Inc. (1986) SAS User`s Guide: Statistics, Version 6th en. Cary, North Caroline.

- WILSON, Z.; HUBBARD, S. & POUNDER, D.J., Drug analysis in fly larvae. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, **14** (1993): 118-120.

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

No projeto foram utilizados 10 coelhos domésticos brancos, machos, com variação de peso entre 3,0-4,0 Kg em cada experimento. Os animais foram mantidos no biotério do departamento por 1 semana antes do início de cada experimento e foram pesados, colocados em gaiolas isoladas e alimentados com ração e água.

Em cada experimento, os coelhos receberam dosagem 2x letal de diazepam, cocaína, anfepramona ou maconha diluídos em 2,0ml de solução salina. A droga foi administrada via endovenosa. Os coelhos foram colocados em gaiolas e suas reações anotadas. Após 30 minutos da administração da droga, os coelhos foram mortos mecanicamente sem nenhuma lesão superficial. Em seguida foi realizada a necropsia para a retirada das amostras. Foram coletadas amostras de sangue, coração, fígado, urina e pulmão, as quais foram acondicionadas em frascos de vidro e congeladas para posterior preparação para análise toxicológica. Em seguida, larvas de *Chrysomya albiceps* e de *Chrysomya putoria* (Diptera:Calliphoridae) foram expostas separadamente em partes de fígado, utilizado como substrato de alimentação e desenvolvimento.

O crescimento foi acompanhado de 6/6 horas e as larvas pesadas até 54 horas de exposição ao fígado, como dito anteriormente. O ciclo de vida, tempo de pupariação e a emergência foram acompanhados até a morte total dos adultos.

A diferença no crescimento (peso) das larvas após sua exposição no fígado contendo droga foi altamente significativa ($F=264,9$ $Pr>0,0001$) em relação ao controle independentemente da droga utilizada. A espécie de mosca ($F=130,4$ $Pr>0,0001$), as drogas utilizadas ($F=128,6$ $Pr>0,0001$), o tempo de exposição ($F=1643,3$ $Pr>0,0001$), as interações espécie*droga ($F=86,13$ $Pr>0,0001$), espécie*tempo ($F=31,3$ $Pr>0,0001$) e droga*tempo ($F=36,8$ $Pr>0,0001$) influenciaram o peso larval. As espécies de moscas se comportaram de modo diferente, sendo que as larvas de *C. putoria* ($\bar{x}=99,3$) atingiram um peso maior que as de *C. albiceps* ($\bar{x}=74,6$) durante a exposição destas no fígado.

As drogas exerceram grande influencia no peso larval, independentemente para cada espécie de mosca, acelerando o crescimento e/ou o ganho de peso para todos os grupos de drogas em relação ao controle (anexos 7 e 8). As larvas que se alimentaram no

fígado contendo maconha ($\bar{x}=115,3$) tiveram um maior desenvolvimento quando comparadas com os experimentos com diazepam ($\bar{x}=111,5$), cocaína ($\bar{x}=83,1$), anfepramona ($\bar{x}=68,7$) e o controle ($\bar{x}=52,5$). O tempo de exposição das larvas no fígado obviamente foi importante para o crescimento, pois a tendência é as larvas ganharem peso e crescerem com o passar do tempo.

Durante a primeira hora de exposição não houve diferença alguma no crescimento das larvas, seja relacionada às espécies e drogas, uma vez que as médias não foram significativamente diferentes. Na 6ª hora de observação e pesagem, o controle teve um crescimento significativo em relação às demais drogas para *C. albiceps*; não ocorrendo o mesmo para *C. putoria*. As larvas de *C. putoria* expostas no fígado contendo diazepam apresentaram um desenvolvimento menor em relação ao controle, e, as larvas expostas em coca, maconha e anfepramona desenvolveram similarmente ao controle.

Tanto para 18 horas como 24 horas de exposição, verificou-se que as larvas de *C. albiceps* na maconha e no diazepam e *C. putoria* na maconha e na anfepramona pesaram mais que as demais.

Em 30 horas, as larvas de *C. albiceps* no fígado com diazepam tiveram maior peso que as para controle, maconha, cocaína e anfepramona; mas esse mesmo tempo de exposição foi altamente significativo para *C. putoria* quando exposta à maconha. O mesmo ocorrendo para 42 horas de exposição.

Quando foram atingidas 54 horas de exposição no fígado; para *C. albiceps*, as larvas se desenvolveram significativamente no diazepam, seguido respectivamente das larvas na cocaína, maconha, controle e anfepramona. Para *C. putoria*, as larvas na maconha, cocaína e no diazepam tiveram um crescimento mais significativo quando comparado às larvas na anfepramona e controle.

O tempo de pupariação também foi significativo, seja seu início ou fim (anexo 9). A diferença desse tempo foi significativa para quase toda variável analisada ($F=3,58$ $Pr>0,003$). Verificou-se que a espécie de mosca é significativa para o início ($F=10,05$ $Pr>0,003$) mas não significativa para o fim da pupariação ($F=1,03$ $Pr>0,31$) e que a droga ($F=17,53$ $Pr>0,0001$) e a interação espécie*droga ($F=8,46$ $Pr>0,0001$) podem influenciar o tempo de pupariação.

As larvas controle iniciaram e terminaram o processo de pupariação depois das outras larvas expostas às drogas. As larvas na cocaína, maconha e diazepam iniciaram a pupariação antes das larvas expostas para anfepramona e controle. Verificou-se que não houve diferença significativa do tempo de pupariação entre as espécies de moscas, contudo, observou-se uma diferença significativa entre as drogas em relação às espécies. As larvas de *Chrysomya putoria* iniciaram o processo de pupariação antes que *C. albiceps*, porém o término deste processo não foi significativo quanto ao tempo.

O tempo de emergência dos adultos também foi significativo, seja para as espécies ($F=17,4$ $Pr>0,0002$), drogas ($F=40,2$ $Pr>0,0001$) como para interação espécie*droga ($F=7,4$ $Pr>0,0008$). *Chrysomya putoria* emergiu antes que *C. albiceps* e a emergência ocorreu mais cedo para os adultos, as quais as larvas foram expostas no diazepam, cocaína e anfepramona respectivamente (anexo 10). Os adultos do grupo controle e da maconha emergiram depois.

Foi analisada ainda, se após a retirada das larvas do fígado e estas serem transferidas para uma dieta artificial para continuarem o desenvolvimento até o início da pupariação ocorreu uma mortalidade significativa (sobra), a mortalidade larval (morte 1), pupal (morte 2) e os adultos que não emergiram (morte 3) (anexos 11 e 12). Quando foram utilizadas as variáveis sopra, morte 1 e morte 3, apenas a droga foi significativa ($F=4,9$ $Pr>0,0065$); a espécie e a interação espécie*droga não representaram um fator que afetasse a mortalidade, no entanto, pôde-se observar uma mortalidade significativa em cada fase do desenvolvimento da mosca não relacionada a esses fatores. Na morte 2, nenhum fator estudado foi significativo para que ocorresse a mortalidade.

A mortalidade inicial e final da colônia na gaiola foi observada para cada espécie e réplica. O início ($F=8,33$ $Pr>0,0023$) da morte dos adultos na gaiola e o fim ($F=120,9$ $Pr>0,0001$) foram significativos. A espécie ($F=16,35$ $Pr>0,0006$) foi determinante para esses fatores, no entanto, a droga ($F=0,35$ $Pr>0,5816$) não foi significativa. A diferença entre o início e fim total dos adultos foi significativa ($F=20,04$ $Pr>0,0001$). As colônias de *C. albiceps* morreram antes que as de *C. putoria*. Apesar dos adultos de *C. putoria* terem emergido antes que *C. albiceps*, as colônias desta espécie morreram antes que as de *C. putoria*.

Através dos resultados obtidos da pesagem de larvas com intervalos de tempo, podemos dizer que a droga influencia o peso e crescimento das larvas independentemente da espécie, ocorrendo uma variação, dependendo do tempo de contato com o fígado contendo a droga. Esse crescimento provavelmente deve-se ao fato da droga estimular a atividade larval e, conseqüentemente esta passa a se alimentar e crescer mais. O fígado foi escolhido como substrato para as larvas pois concentra muitas substâncias e seus metabólitos. Quando as larvas se alimentam de um órgão/tecido contendo droga, pode ocorrer uma bioacumulação, biotransformação ou a excreção da droga e seus metabólitos. Há divergências entre os autores a respeito desse processo (GOFF *et alii*, 1992; SADLER *et alii*, 1997), entretanto, todas as amostras de tecidos dos coelhos e de larvas do experimento com diazepam, do preliminar com cocaína e algumas amostras de tecidos do experimento com anfepramona foram positivas, demonstrando a presença da droga, a possível bioacumulação desta na larva e que a cromatografia gasosa pode ser indicada para a análise toxicológica de insetos.

Dependendo da droga utilizada, o crescimento das larvas foi alterado em relação ao tempo (em horas) de exposição no fígado, mas é importante ressaltar que a maconha e o diazepam foram às drogas que mais influenciaram o crescimento, desenvolvimento, pupariação, emergência e longevidade das moscas, quando comparadas com as demais drogas. Das drogas utilizadas, a anfepramona foi a que menos influenciou o ciclo biológico das moscas estudadas.

O tempo de pupariação e emergência foi alterado em relação ao controle. Se adotarmos que a atividade larval aumentou em conseqüência das drogas utilizadas, podemos concluir que as larvas expostas às drogas se desenvolveram e cresceram mais rapidamente e, por isso, também empuparam e emergiram antes do controle.

A droga também foi o principal fator que influenciou a taxa de mortalidade. Embora muitas vezes a espécie tenha sido significativa para os fatores estudados, a droga exerceu maior influencia no padrão de desenvolvimento. É importante ressaltar que cada espécie tem um ciclo de vida específico e se comporta de maneira diferente. Ainda, os dípteros não foram expostos a nenhum tratamento e/ou fator como temperatura, restrição de alimento (água, açúcar, dieta), espaço físico, etc.

Esses dados mostram relevância para a entomologia forense, haja vista, a alteração dos processos de desenvolvimento e crescimento das moscas quando expostas às diferentes concentrações e drogas, principalmente no que diz respeito à estimativa do intervalo de tempo de morte (IPM), que pode ser errada, no caso de somente ser feito o estudo das condições climáticas do local de encontro do cadáver, do modo de morte, localização geográfica, condições do cadáver, entre outros. Com isso, podemos observar que há fatores intrínsecos e extrínsecos que interagem no processo de desenvolvimento da fauna cadavérica e que a análise toxicológica deve ser feita tanto do material cadavérico, como das amostras de larvas e pupários de insetos.

Embora esses dados sejam apenas para duas espécies de moscas (Diptera: Calliphoridae), podemos assumir que variações semelhantes também existam para outras espécies que se alimentem em tecidos contendo as drogas utilizadas. No trabalho em que GOFF *et alii* (1989) realizou com cocaína e larvas de *Boettcherisca peregrina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae), também uma espécie de varejeira, foi concluído que a droga acelerou o crescimento e tempo de pupariação, o mesmo ocorrendo quando utilizou heroína (GOFF *et alii*, 1991) e metanfeparamona (GOFF *et alii*, 1992).

Através de experimentos realizados, podemos concluir que não é comum ocorrer uma correlação entre a quantidade de droga administrada e a obtida nas amostras de insetos, ocorrendo também uma variação na concentração dos órgãos e líquidos do organismo dependendo da solubilidade da droga (anexos 13, 14, 15 e 16). Este fator é mais facilmente observado nos casos reais de investigação criminal: há diferenças na concentração de substâncias encontradas em biofluidos de um indivíduo na hora da morte e nas amostras de larvas coletadas dias ou meses após a morte. Isto ocorre por vários fatores entre eles a redistribuição da droga no corpo após a morte, a estabilidade da droga nos restos humanos principalmente na superfície do corpo, da farmacocinética de cada droga nas espécies de artrópodes e de seus estágios de desenvolvimento e também nos casos onde ocorre uso concomitante de drogas.

Através destes estudos podemos afirmar que em alguns casos, a amostra de tecido humano apresenta-se negativa para a droga, seja pelo avançado estágio de decomposição ou outro motivo, enquanto a amostra de larva que se alimentou do tecido

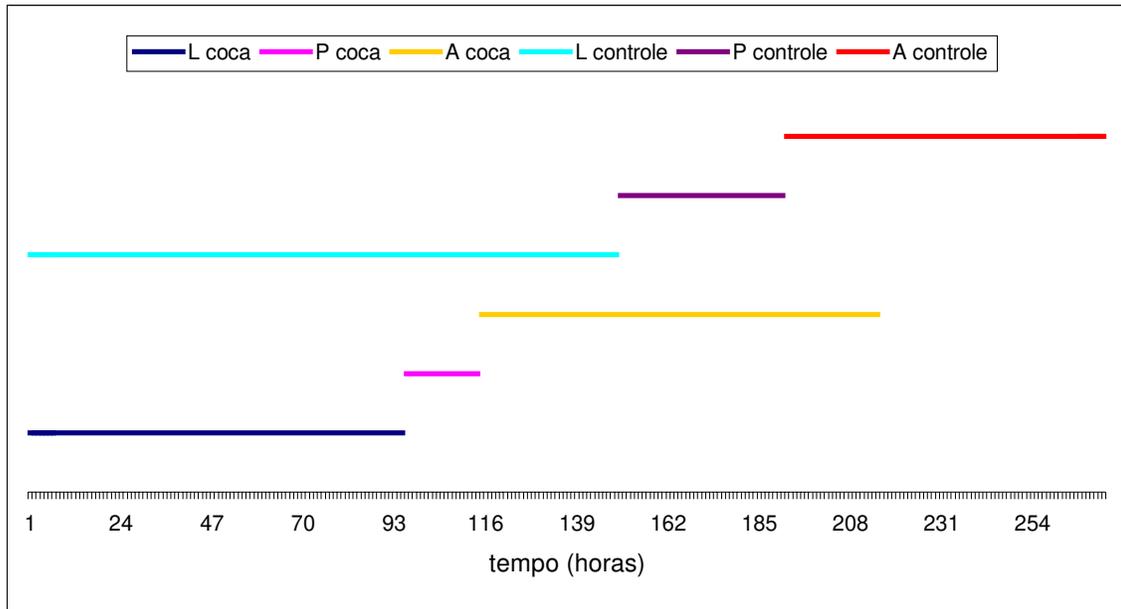
apresenta-se positiva. Este fato mostra a importância da utilização dos insetos nas análises toxicológicas para evitar um resultado falso negativo.

5.1 Referência Bibliográfica

- 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** (1989): 91-93.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A.; HEWADIKARAM, K.A. & OMORI, A.I., Effect of heroin in decaying tissues on the development of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. **JFSCA**, **36** (1991): 537-542.
- GOFF, M.L.; BROWN, W.A. & OMORI, A.I., Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decaying tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. **JFSCA**, **37** (1992): 867-872.
- SADLER, D.W.; PATL, M.R.; ROBERTSON, L.; BROWN, G.; FUKU, E. & POUNDER, D.I., Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci**, **42**(1997):481-485.

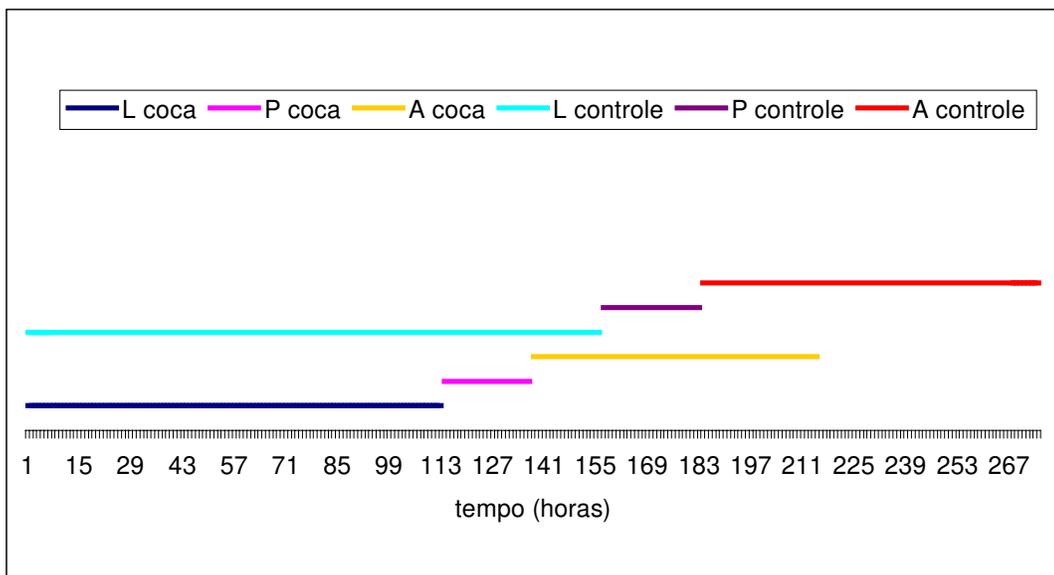
ANEXOS

Figura A - 1. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya albiceps* criadas em tecidos contendo cocaína



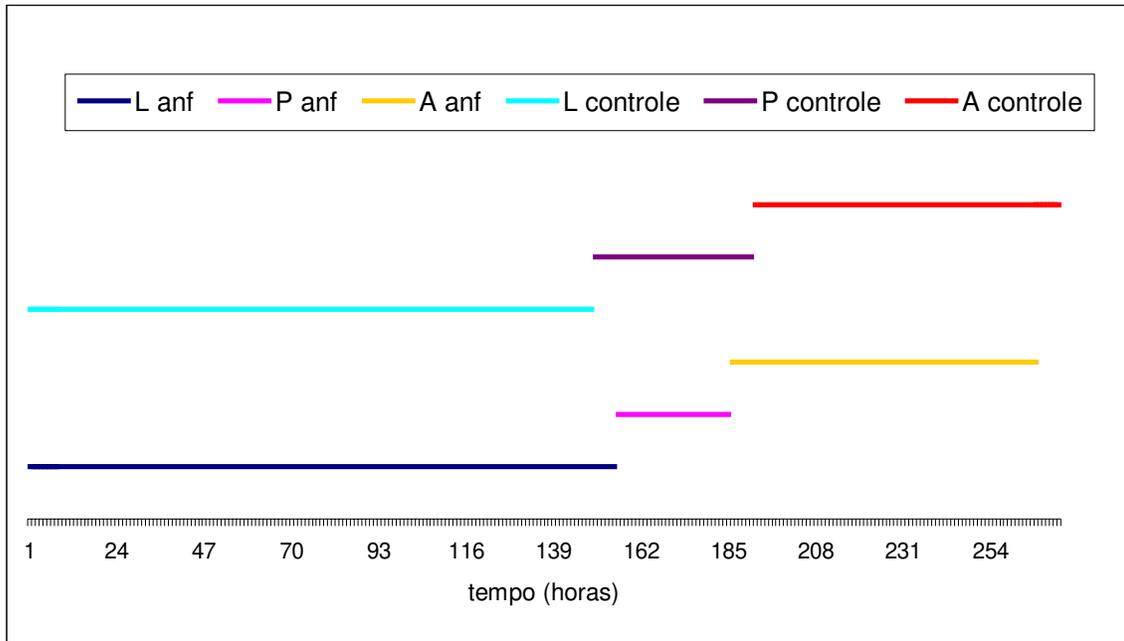
L = larva P = pupa A = adulto

Figura A – 2. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya putoria* criadas em tecidos contendo cocaína



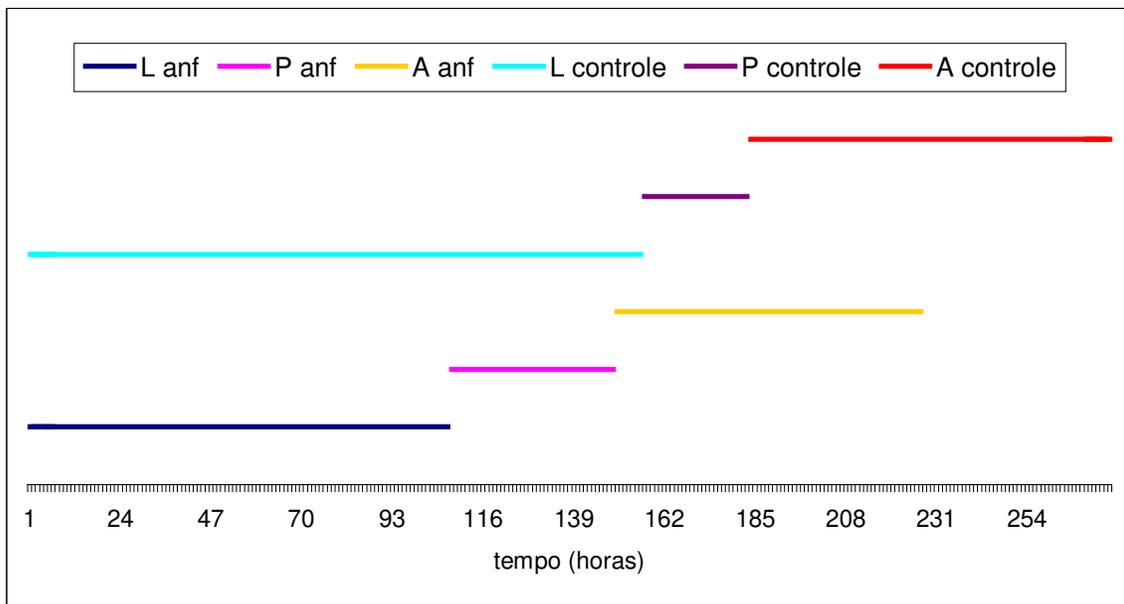
L = larva P = pupa A = adulto

Figura A -3. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya albiceps* criadas em tecidos contendo anfepramona



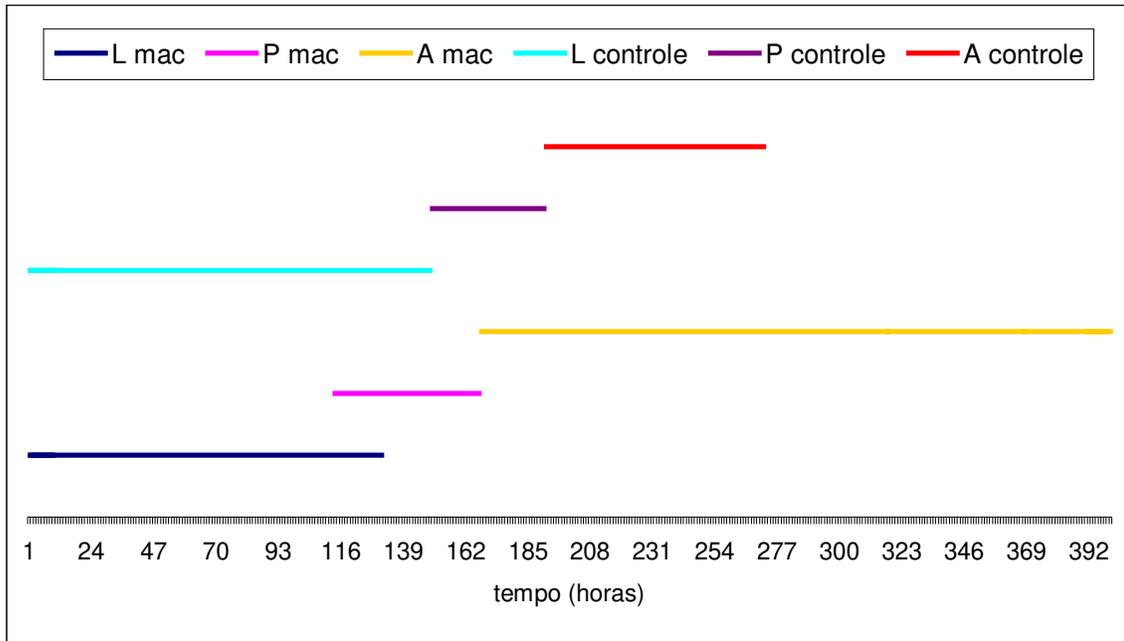
L = larva P = pupa A = adulto

Figura A - 4. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya putoria* criadas em tecidos contendo anfepramona



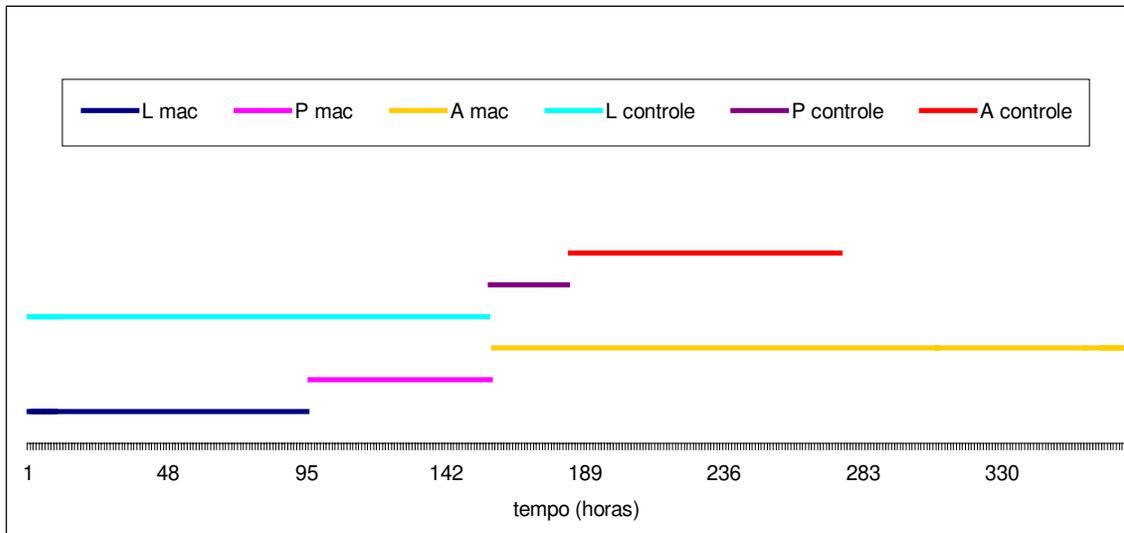
L = larva P = pupa A = adulto

Figura A - 5. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya albiceps* criadas em tecidos contendo maconha



L = larva P = pupa A = adulto

Figura A - 6. Taxa de desenvolvimento (duração) do estágio larval, pupal e emergência de *Chrysomya putoria* criadas em tecidos contendo maconha



L = larva P = pupa A = adulto

Figura A - 7. Peso das larvas de *Chrysomya albiceps* relacionado ao tempo (em horas) de exposição nos fígados de coelhos contendo as drogas utilizadas no experimento ($\bar{x} \pm dp$)

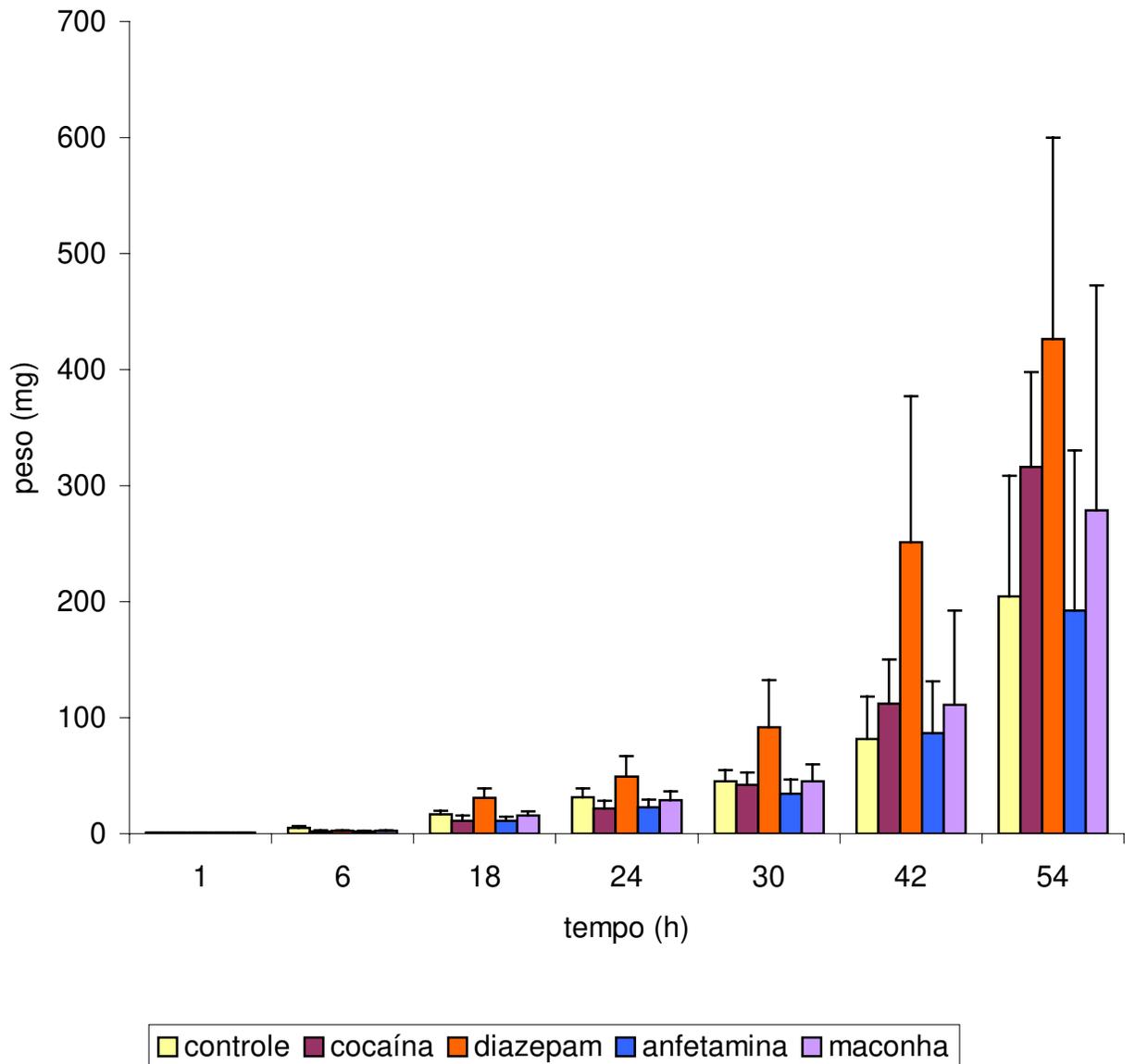


Figura A - 8. Peso das larvas de *C. putoria* relacionado ao tempo (em horas) de exposição nos fígados de coelhos contendo as drogas utilizadas no experimento ($\bar{x} \pm dp$)

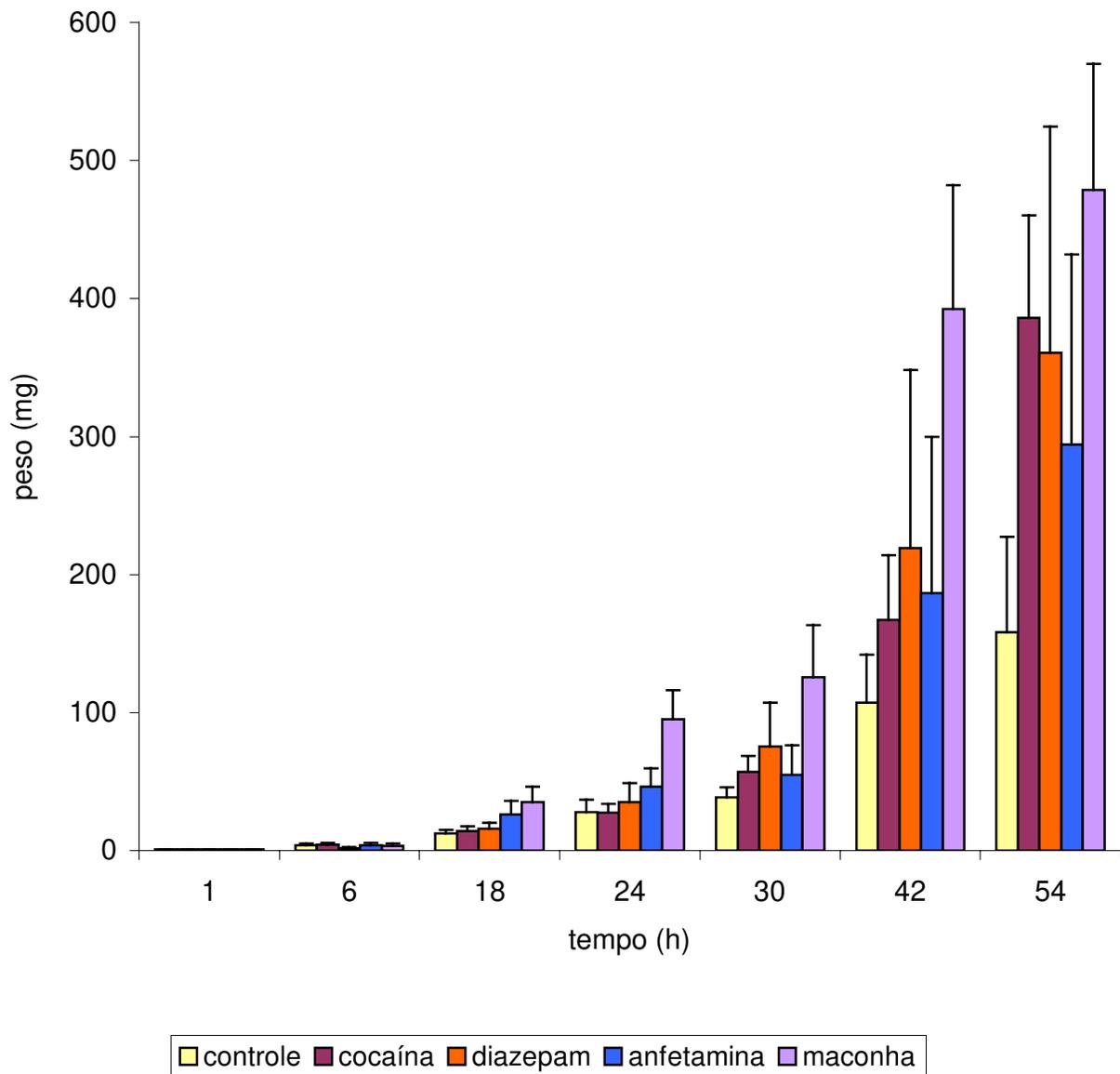


Figura A - 9. Tempo de pupariação (início e fim) de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* em relação às drogas utilizadas nos 4 experimentos

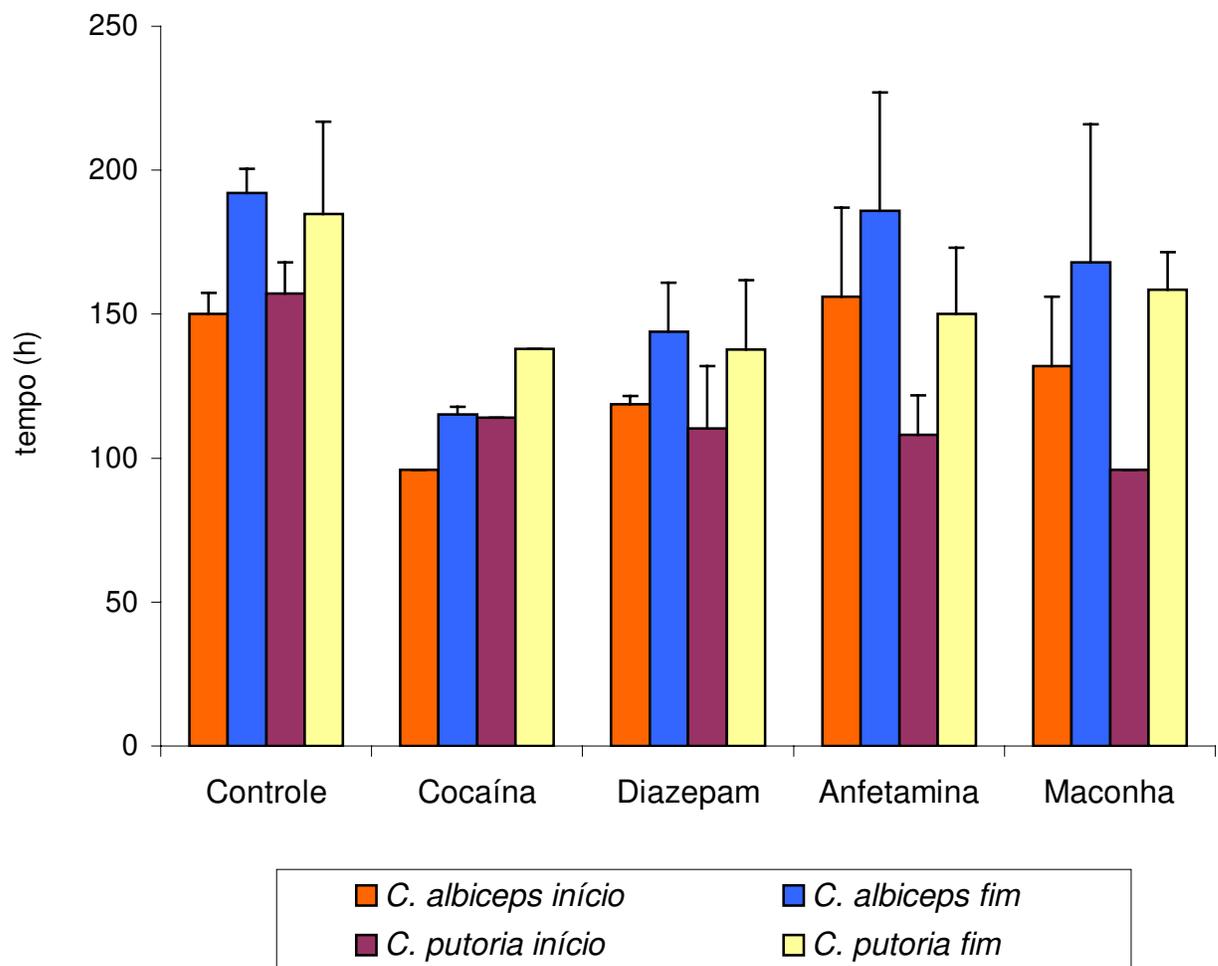


Figura A – 10. Tempo de emergência dos adultos de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria* para cada droga utilizada

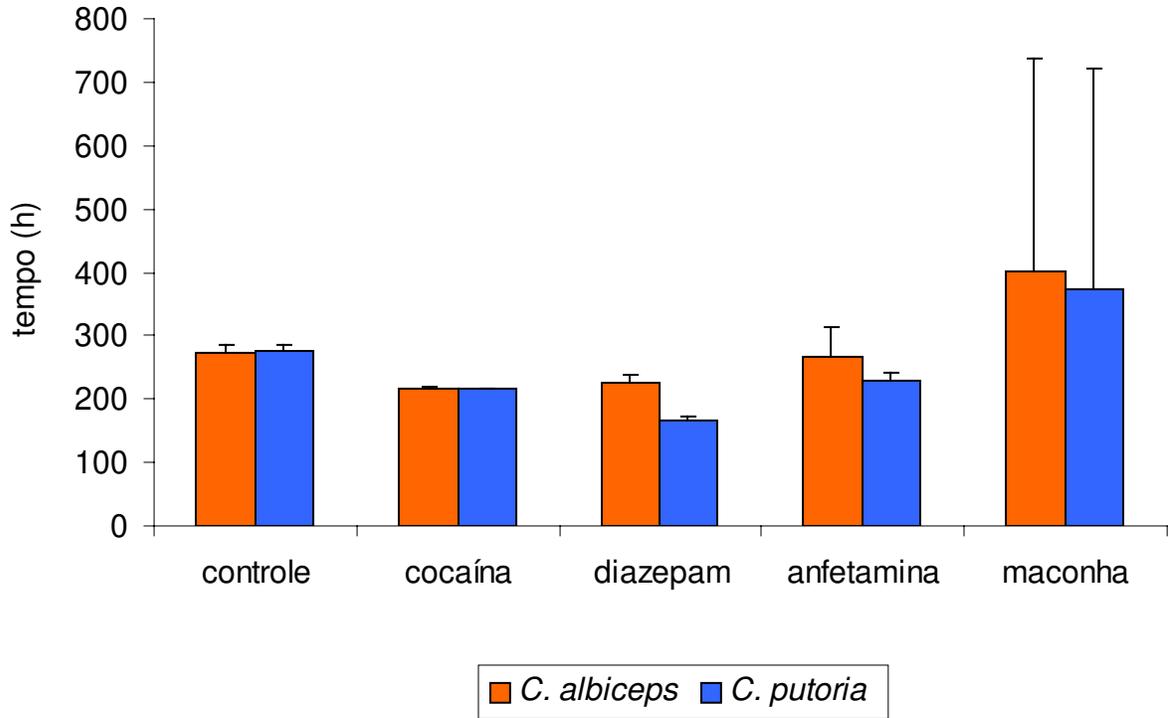


Figura A - 11. Mortalidade larval, pupal e adultos não emergidos para *Chrysomya albiceps* relacionados às drogas utilizadas ($\bar{x} \pm dp$)

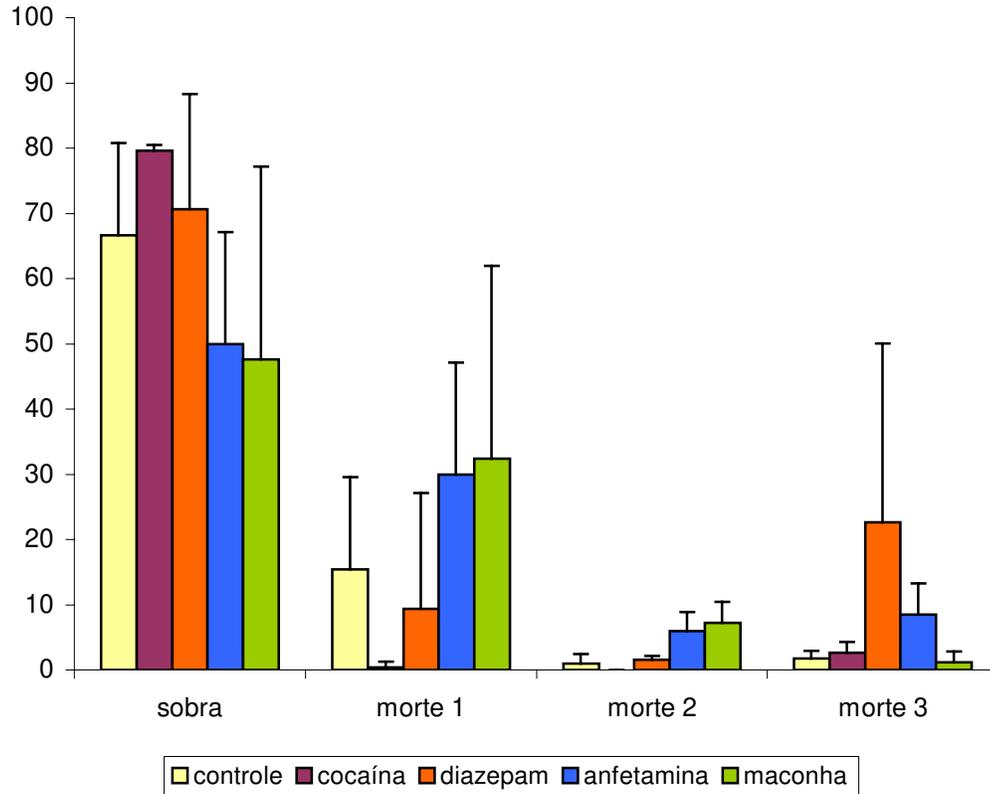


Figura A – 12. Mortalidade larval, pupal e adultos não emergidos para *Chrysomya putoria* relacionados às drogas utilizadas ($\bar{x} \pm dp$)

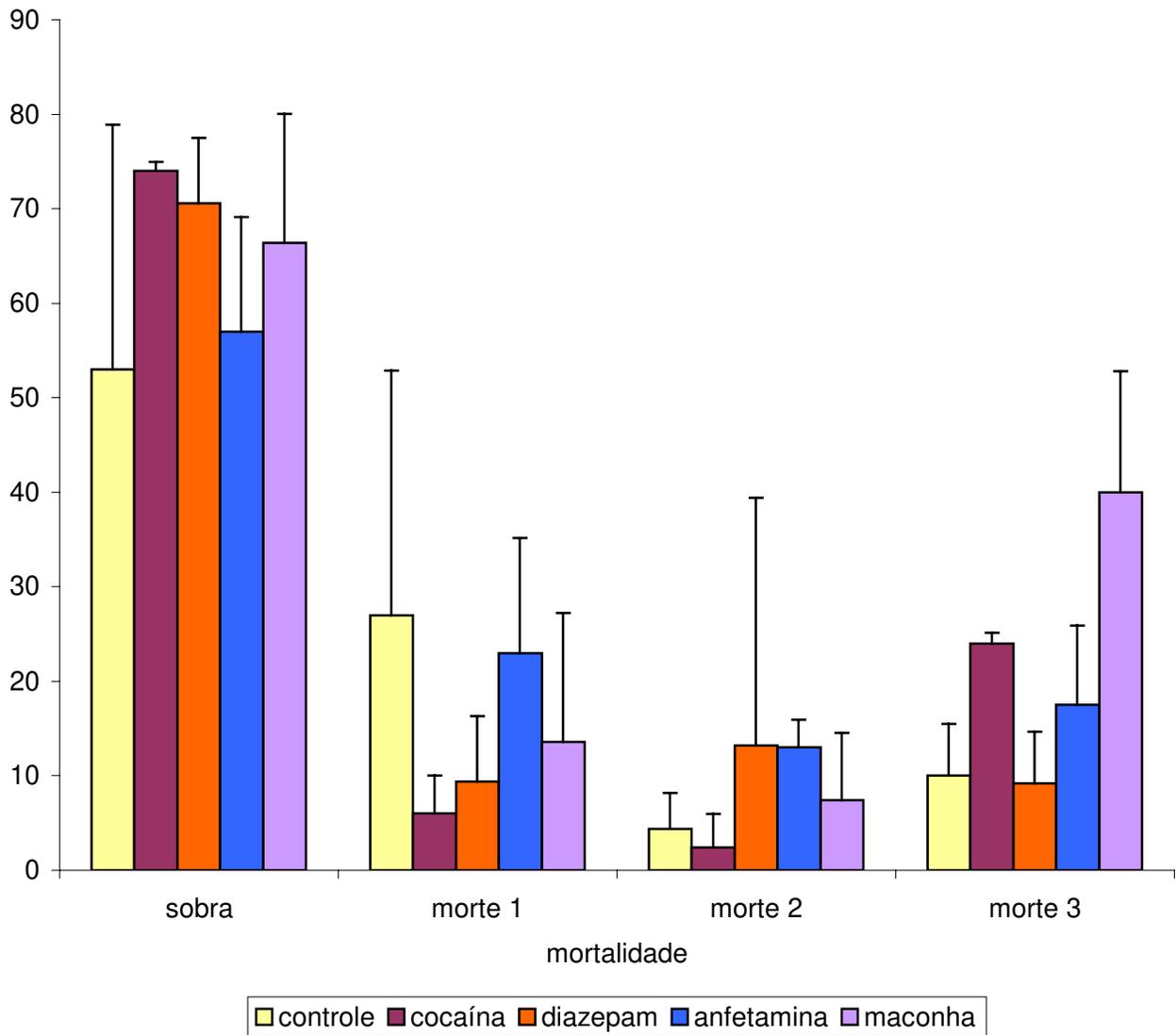


Figura A - 13. Concentração ($\mu\text{g/ml}$) de anfepramona nas amostras de coelhos analisadas em GC-MS

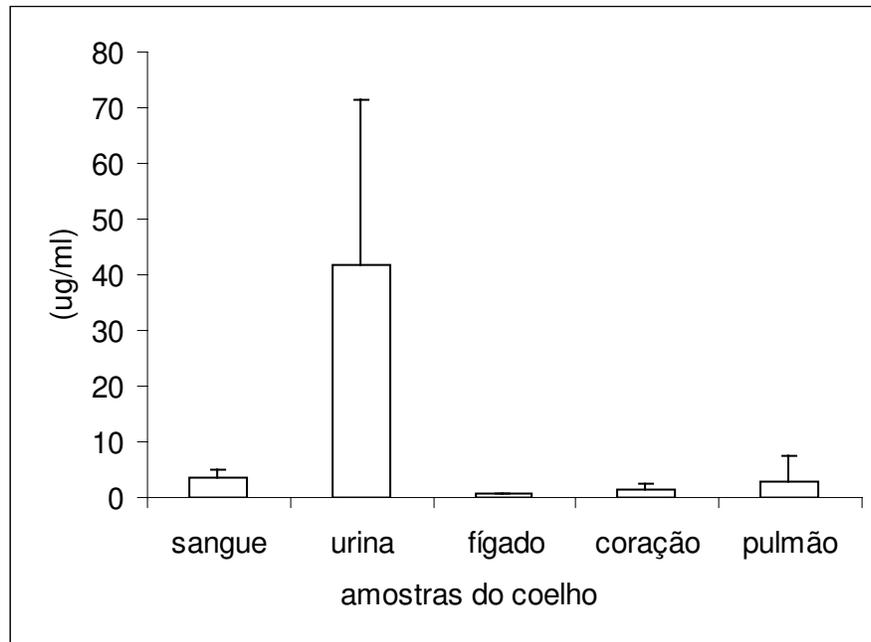


Figura A - 14. Concentração ($\mu\text{g/ml}$) de anfepramona em amostras de dípteros analisadas no GC-MS

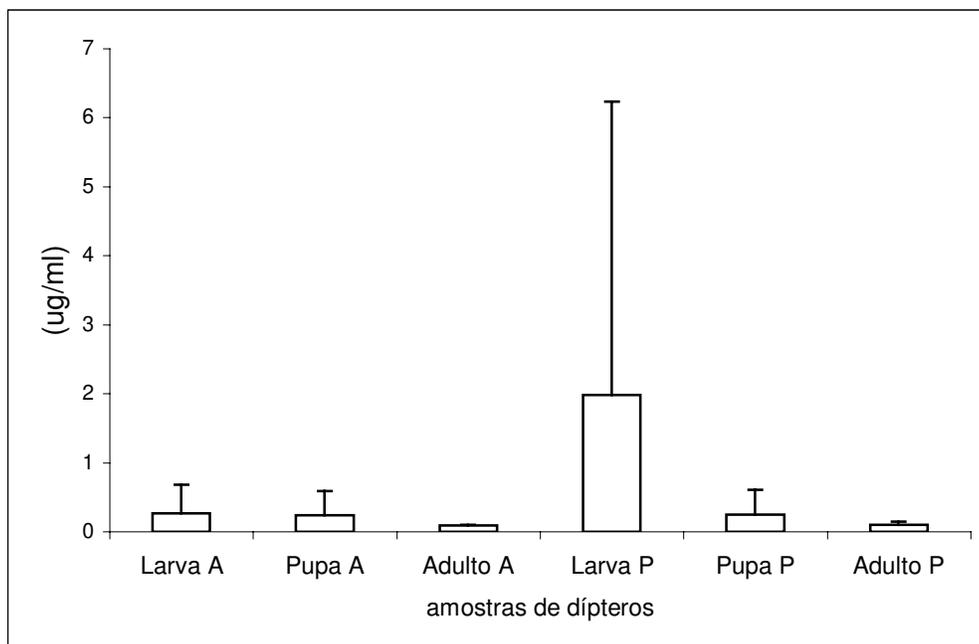


Figura A -15. Área obtida de *Cannabis sativa* em amostras de coelhos analisadas no GC-MS

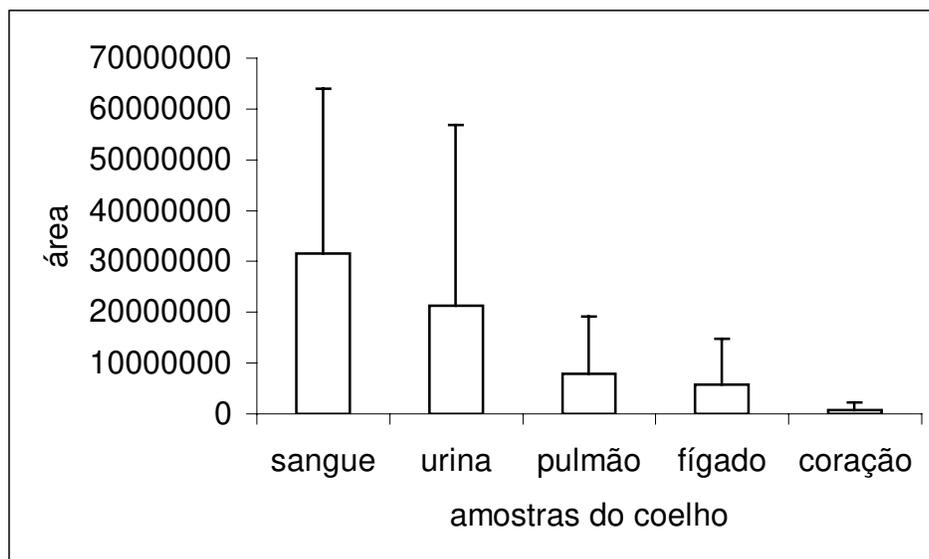


Figura A - 16. Área obtida de *Cannabis sativa* em amostras de dípteros analisadas no GC-MS

