

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS INTEGRAL

MATHEUS CONTE PEREIRA

**AÇÃO DE TOPIRAMATO SOBRE O DESENVOLVIMENTO
LARVAL DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (FABRICIUS)
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**



Rio Claro
2011

MATHEUS CONTE PEREIRA

**AÇÃO DE TOPIRAMATO SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE
CHRYSOMYA MEGACEPHALA (FABRICIUS) (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE)**

Orientador: CLAUDIO JOSÉ VON ZUBEN

CO-ORIENTADOR: GUILHERME GOMES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção dos graus de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

Rio Claro
2011

595.7
P436a

Pereira, Matheus Conte

Ação de topiramato sobre o desenvolvimento larval de *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS) (Diptera: Calliphoridae) / Matheus Conte
Pereira. - Rio Claro : [s.n.], 2011

25 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências
Biológicas Integral) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Bióciências de Rio Claro

Orientador: Claudio José Von Zuben

Co-Orientador: Guilherme Gomes

1. Inseto. 2. Entomologia. 3. Forense. 4. Entomotoxicologia. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

SUMÁRIO

1. Resumo	3
2. Introdução	4
3. Objetivos	7
4. Materiais e métodos	8
5. Resultados e discussão	11
6. Conclusões	20
7. Referências Bibliográficas	21

1. RESUMO

A Entomologia Forense é um ramo de investigação científica que aplica o estudo de insetos e outros artrópodes a procedimentos legais e está se desenvolvendo e chamando bastante atenção nos últimos anos. Diversos estudos vêm sendo realizados nesta área para que os profissionais responsáveis possuam o maior número de informações possível sobre os insetos utilizados para estes fins, permitindo-lhes assim fazer melhores análises nos casos litigiosos envolvendo a descoberta da causa até a estimativa de tempo do intervalo pós-morte (I.P.M.) em um cadáver humano. Dentro deste ramo de estudo, a ordem Diptera apresenta certo destaque por apresentar diversos insetos com hábitos necrófagos, como por exemplo a família Calliphoridae, que se destaca pela grande distribuição e número de registros da presença de seus representantes nos tecidos de corpos animais no início da decomposição. A espécie *Chrysomya megacephala* (Fabricius), pertencente a esta família, tendo sido introduzida acidentalmente aqui no Brasil alguns anos atrás, possui uma importância médico-sanitária como veiculadora de patógenos, eventual causadora de miíases e, pelo fato de colocar seus ovos sobre tecidos de animais em decomposição, é uma importante espécie utilizada em estudos forenses. Baseando-se em trabalhos já realizados, sabe-se que a presença de determinadas substâncias químicas no substrato alimentar das larvas destas moscas pode alterar seu desenvolvimento, e sabendo quais seriam as mudanças provocadas por uma dessas substâncias, a análise do cadáver se tornaria mais completa e confiável durante a estimativa do I.P.M. A área responsável pelo estudo da interação entre substâncias químicas e os seus efeitos nos insetos é chamada de Entomotoxicologia, que também permite detectar traços de drogas lícitas ou não no trato digestivo de insetos necrófagos. Esta área possui uma grande importância na área forense, e para que a mesma possa colaborar com outras, é importante que se monte um grande banco de dados com todas as informações obtidas nos estudos com as mais diversas substâncias, em diferentes concentrações, considerando diferentes espécies de insetos, e que este banco de dados seja divulgado entre os profissionais que forem utilizá-lo. Desta forma, este trabalho visa ampliar esse conjunto de informações estudando os efeitos causados pela presença da substância Topiramato (Amato[®]) no desenvolvimento larval de *C. megacephala*, tendo em vista que este é um medicamento relativamente novo, que está sendo bastante utilizado para tratamento de pessoas com epilepsia, dores de cabeça e convulsões, já tendo sido registradas algumas tentativas de suicídio com o consumo do mesmo, e um caso registrado de óbito por super-dosagem do medicamento. Para isso, será observado o

desenvolvimento larval em diferentes dosagens do medicamento (dose humana: 200mg, 400mg e uma super-dosagem de 4000mg) até o período de pupação dos insetos. Serão utilizadas no total 1200 larvas, com densidades de 300 larvas em cada pote das diferentes dosagens (controle, 200mg, 400mg e 4000mg), e estas serão pesadas em balança analítica a cada 6 horas, sendo selecionadas aleatoriamente 20 larvas de cada tratamento para cada uma das pesagens. Após a emergência dos adultos, também serão coletados dados de mortalidade, porcentagem de indivíduos de cada sexo e tamanho de asas em cada tratamento. Ao final da coleta de dados, os resultados serão apresentados em tabelas e gráficos, e comparados entre si para obtenção de informações úteis para a área de entomologia forense, sobre os efeitos desta substância no desenvolvimento das larvas de *C. megacephala*.

2. INTRODUÇÃO

A Entomologia Forense é um ramo de investigação científica muito abrangente, que leva em consideração o uso de insetos e outros artrópodes para, através de estudos e análises dos mesmos, obter informações relevantes e importantes para auxiliar nos procedimentos legais relacionados a um determinado caso litigioso (BENECKE, 2001). Geralmente, os casos abordados pela Entomologia Forense são relacionados a uma fauna de invertebrados associada a corpos em decomposição, encontrados em uma cena de crime (CATTS & GOFF, 1992; NELSON et al., 2009).

A fauna associada aos corpos em decomposição pode ser classificada dependendo da atuação dos animais naquele meio, sendo divididos em: Necrófagos (aqueles que se alimentam diretamente dos tecidos do cadáver), predadores e parasitóides (que atacam os necrófagos), onívoros (que se utilizam tanto dos tecidos do cadáver quanto dos outros necrófagos como alimento) e acidentais (aqueles que utilizam a carcaça como abrigo ou acidentalmente são encontrados junto ao corpo, mas não se alimentam do mesmo) (SMITH, 1986; OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2010).

Dentre os possíveis animais a serem utilizados para estes estudos forenses, o grupo dos insetos apresenta uma grande presença nestas situações, em especial diversas espécies da ordem Diptera merecem destaque, tendo em vista que várias delas são os primeiros seres vivos a encontrar e colonizar um corpo morto, podendo ser portanto apontados como os pioneiros neste

processo de decomposição. Diversas famílias deste grupo apresentam hábitos necrófagos, como, espécies de Muscidae, Sarcophagidae, e Calliphoridae, que apresentam receptores químicos muito apurados capazes de reconhecer o odor de uma carcaça a grandes distâncias (SOUZA & LINHARES, 1997).

Algumas espécies da família Calliphoridae, conhecidas popularmente como moscas-varejeiras, foram acidentalmente introduzidas aqui no Brasil em meados da década de 70 (SOUZA & LINHARES, 1997) e acabaram se distribuindo pelo país e se desenvolvendo muito bem no nosso clima. As espécies do gênero *Chrysomya*, principalmente *C. megacephala* (Fabricius), e *C. albiceps* (Wied), são bastante utilizadas para estudos de Entomologia Forense, devido à sua ampla distribuição (IMBIRIBA et al., 1977; GUIMARÃES et al., 1979), e pela relativa facilidade em encontrá-las em carcaças e corpos humanos em decomposição pelo fato de apresentarem hábitos necrófagos e colocarem seus ovos sobre tecidos em decomposição (WELLS & GREENBERG, 1992; VON ZUBEN et al., 1996; GOMES et al., 2003; GOMES et al., 2009). Além disso, possuem grande importância médico-sanitária como veiculadoras de patógenos e eventuais causadoras de míases (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES et al., 1983; FURLANETTO et al. 1984).

A Entomologia Forense pode ser utilizada para diversos fins como, por exemplo, estimar o intervalo pós-morte (I.P.M.) de um cadáver humano (tanto por uma seqüência conhecida de sucessão na colonização de um cadáver, como pela idade das larvas mais velhas ali encontradas), desvendar a *causa-mortis* (o motivo que levou à morte do indivíduo em questão), encontrar relações entre possíveis suspeitos e a cena do crime e até mesmo realizar análises de compostos químicos presentes no corpo (SMITH, 1986; NELSON et al., 2009;).

Nos últimos tempos, o uso de diversas substâncias (lícitas ou não) vem aumentando muito, e por consequência, sua presença em cadáveres também. Isso tem dificultado o trabalho dos especialistas forenses na hora de recolher os dados e fazer a perícia. Em muitos casos, por exemplo, uma overdose pode ser a causa da morte, mas dependendo do estágio de decomposição do corpo, pode não ser mais possível recolher material em condições de se encontrar tais substâncias, e por conta disso a perícia poderia ser comprometida. Para auxiliar nestes casos, descobriu-se que os insetos e alguns artrópodes encontrados na cena do crime podem ser usados para se detectar a presença de tais substâncias, quando a situação do corpo não permite tal

verificação pela falta de material tecidual, tendo em vista que estes animais teriam se alimentado destes tecidos e retido tais substâncias em seus corpos (BOUREL et al., 1999, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

A área responsável por estas análises é conhecida como Entomotoxicologia, que visa à utilização dos insetos e artrópodes encontrados em cenas de crime, para se obter tanto informações quantitativas como qualitativas, principalmente nos casos em que estas informações não estão disponíveis em amostras teciduais do corpo (GAGLIANO-CANDELA & AVENTAGGIATO, 2001; INTRONA et al., 2001). Esta área é relativamente nova no meio forense, tendo surgido por volta da década de 70, quando foram encontrados acúmulos de determinados metais pesados nos tecidos de moscas adultas, e posteriormente sendo encontradas diversas substâncias como mercúrio, pesticidas e até remédios (SOHAL & LAMB, 1977, 1979).

Atualmente, sabe-se que tais substâncias encontradas nestas moscas foram obtidas através da alimentação de suas larvas em tecidos contaminados pelas mesmas, e que por consequência algumas destas podem alterar o desenvolvimento das larvas (fato que dificulta os peritos na hora de estimar o I.P.M., tendo em vista que o desenvolvimento delas pode não ter demorado o tempo imaginado e, portanto, a estimativa pode estar incorreta) (BOUREL et al., 1999, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

Um exemplo de substância que vem sendo muito utilizada é o Topiramato (Amato[®]), um medicamento de uso recente que vem sendo aplicado em diversos tratamentos, como por exemplo contra cefaléia, alcoolismo, epilepsia, esquizofrenia, transtornos bi-polares, entre outros, dependendo da dosagem prescrita pelo médico, que pode variar de 25mg até 1600mg por dia; em geral, todo tratamento se inicia com uma dosagem pequena e vai aumentando com o decorrer do tempo para que o paciente se adapte ao novo tratamento, até chegar na dosagem que o médico julgar necessária para cada caso (AMATO – EUROFARMA, 2009). Existem também alguns casos relatados de pessoas que tentaram suicídio com a ingestão de dosagens maiores que as indicadas desta substância e até mesmo um caso de óbito envolvendo altas dosagens do mesmo (possivelmente causado não pela ação isolada do Topiramato, mas pela interação deste medicamento com outro que a pessoa também ingeriu ao mesmo tempo) (SMITH et al., 2001; FAKHOURY et al., 2002; BEER et al., 2010).

Como é um medicamento novo, e com uma grande gama de aplicações, é importante saber se existiria alguma ação do mesmo no desenvolvimento dos insetos e artrópodes utilizados na área de Entomologia Forense, a fim de evitar possíveis erros nos casos em que tal substância seja encontrada e não sejam levados em conta seus efeitos, induzindo a erros nas estimativas de I.P.M. Com estas informações, as análises forenses podem ser mais exatas, sem correr risco de estarem equivocadas ou negligenciadas pela falta de dados sobre esta substância e sua influência nos insetos analisados.

3. OBJETIVOS

Baseando-se na necessidade de se compilar o maior número possível de informações para que os profissionais das áreas forenses possam utilizar a Entomologia como técnica confiável e precisa em suas investigações (por exemplo, na determinação da *causa mortis*, em estimativas do IPM e diversas outras funções durante as autópsias), este trabalho visa observar os efeitos da substância Topiramato (Amato[®]) no desenvolvimento larval de *C. megacephala*, a fim de complementar os bancos de dados relacionados à Entomologia Forense, permitindo assim uma melhor estimativa do IPM pelos profissionais da área.

Este estudo poderá ter grande contribuição para a área da Entomologia forense (principalmente na área da Entomotoxicologia) pelo fato de:

- Considerar a espécie *C. megacephala*, que é muito importante para a Entomologia Forense devido a seu hábito necrófago e grande presença em corpos de animais e pessoas em decomposição aqui no Brasil (mesmo sendo uma espécie introduzida);

- Pelo crescente uso humano da substância Topiramato para combater problemas neurológicos como epilepsia, convulsões, dores de cabeça, transtornos bipolares, entre outros;

Portanto, são necessários mais estudos da ação desta substância em insetos utilizados para fins forenses, a fim de melhorar a precisão na estimativa de IPM e evitar possíveis erros por desconhecimento de seus efeitos no desenvolvimento dos insetos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foram coletados adultos da espécie *C. megacephala*, atraídos por iscas de carne em decomposição expostas ao ar livre, capturados com um puçá, dentro do campus da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro, os quais foram colocados e mantidos em gaiolas teladas (Figuras 1a e 1b), com açúcar e água *ad libitum*, em uma sala climatizada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 horas.



1a



1b

Fig 1a: Detalhe da gaiola telada onde são mantidos os indivíduos adultos na sala climatizada. Fig 1b: Parte da sala de criação climatizada com as gaiolas teladas para moscas.

A alimentação oferecida aos adultos, além de açúcar e água, foi também de fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Para induzir o comportamento de ovipostura, carne bovina moída foi usada como substrato para oviposição das fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F₁. Posteriormente, todo este processo foi repetido até a obtenção de ovos de geração F₂. Utilizou-se somente a geração F₂ nos experimentos, por ser progênie de uma que teve todo o seu desenvolvimento sob condições experimentais.

No total, foram realizadas duas repetições do experimento, em tempos diferentes e seguindo-se a mesma metodologia, nas quais cada uma delas continha quatro potes de tratamentos diferentes (Figura 2). Todos os potes continham uma dieta preparada segundo Leal et al. (1982) para um bom desenvolvimento das moscas, composta por Agar, Nipagim, leite em pó, cevada, caseína e água. Todos os potes receberam a mesma quantidade de dieta (125g). O pote

controle [C] possuía apenas a dieta, enquanto os outros potes com a substância testada continham dosagens diferentes dissolvidas juntamente com a dieta, sendo estas correspondentes às doses humanas de 200 mg ($2,857 \cdot 10^{-3}$ mg/g) [D1], 400 mg [D2] e de 4000 mg [D3] (respectivamente 0,36 mg; 0,71 mg e 7,14 mg da substância misturados na dieta). Em cada uma das repetições foi utilizado um total de 1200 larvas, sendo 300 separadas para cada pote de tratamento e colocadas nos mesmos, pouco tempo após sua eclosão.

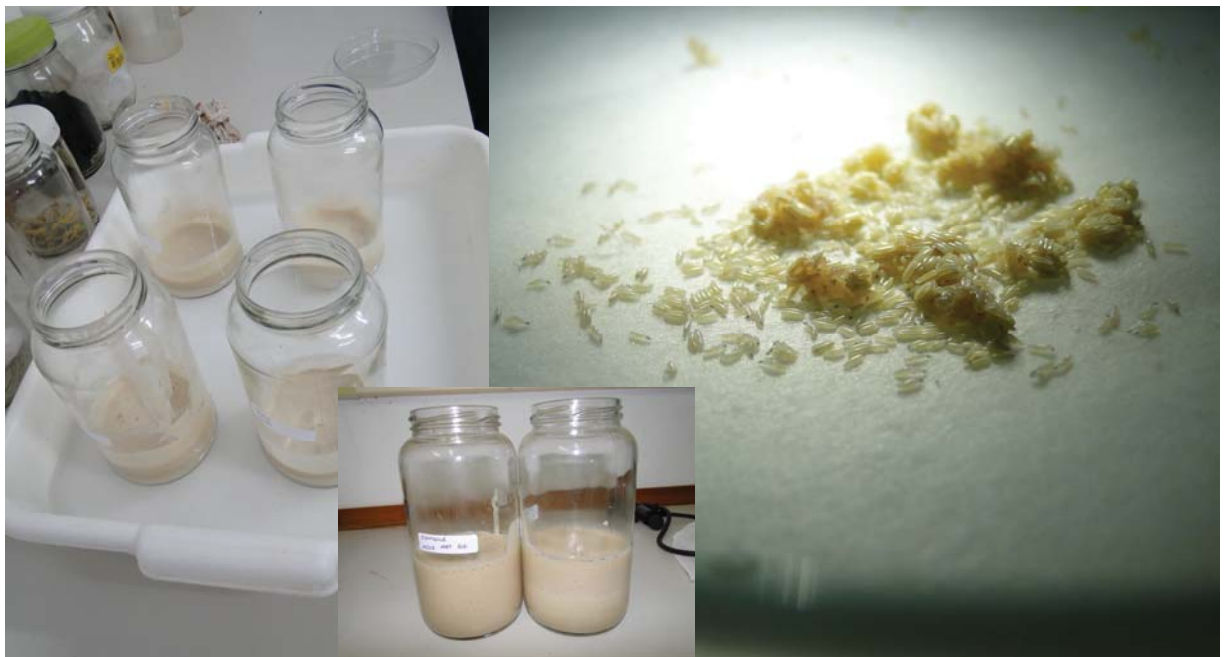


Fig 2: Potes com dieta utilizados no experimento à esquerda e em detalhe. Ovos e larvas recém-eclodidas de *C. megacephala*.

Depois de preparados os potes com as larvas, estes foram colocados em uma B.O.D. (Figura 3a), com temperatura controlada de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e, em intervalos de 6 horas, 20 larvas de cada pote eram coletadas aleatoriamente e em seguida pesadas individualmente em balança analítica (Figura 3b). Após a pesagem, as mesmas eram devolvidas aos seus respectivos potes de tratamento para que se mantivesse um número constante na densidade populacional do pote e não alterasse o desenvolvimento das mesmas, como observado por Von Zuben (1995) e Ireland & Turner (2006).



3a



3b

Fig 3a: Potes contendo dieta, Topiramato e larvas dentro de uma B.O.D. Fig3b: Equipamentos utilizados para a pesagem das larvas e dietas.

Após todas as pesagens feitas e atingido o tempo de pupação, o pote com as larvas foi colocado dentro de outro pote maior contendo serragem e fechado com organza, para que as larvas pudessem empurar até a emergência dos adultos (Figuras 4a, 4b, 4c). Após a emergência dos mesmos, também foram coletados dados acerca da proporção de indivíduos machos e fêmeas emergidos e a proporção de indivíduos que sobreviveram até o estágio adulto. Para esta etapa, os indivíduos adultos foram mortos e conservados em álcool 70%, e após isso foram contados. Com o objetivo de se comparar os dados entre todos os tratamentos, as análises dos dados obtidos foram realizadas através de modelos estatísticos (SAS[®] proc glm, one way ANOVA).



4a



4b



4c

Fig 4a: Indivíduo macho de *C. megacephala*, Fig 4b: Potes contendo serragem e o pote com as larvas prestes a entrarem no momento de empupação. Fig 4c: Indivíduo fêmea de *C. megacephala*.

A análise estatística de todos os dados coletados no desenvolvimento larval desta espécie foi feita no programa SAS[®]. Análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Duncan foram utilizados comparando as médias de massa dos indivíduos nos diferentes tratamentos realizados, utilizando-se nível global de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variável dependente “massa” foi utilizada nas comparações entre os tratamentos. A partir destes dados, foi possível realizar uma análise sobre a ação da substância Topiramato no crescimento das larvas da espécie *C. megacephala*.

De acordo com a análise estatística, houve uma diferença significativa entre os tratamentos analisados ($F=32,05$, $p<0,0001$, $n=2640$), nos indicando que existe um efeito do remédio em alguma das três dosagens que faz as larvas se diferenciarem das de outro tratamento, mostrando que a presença da substância Topiramato pode influenciar no desenvolvimento das larvas de *C. megacephala* (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

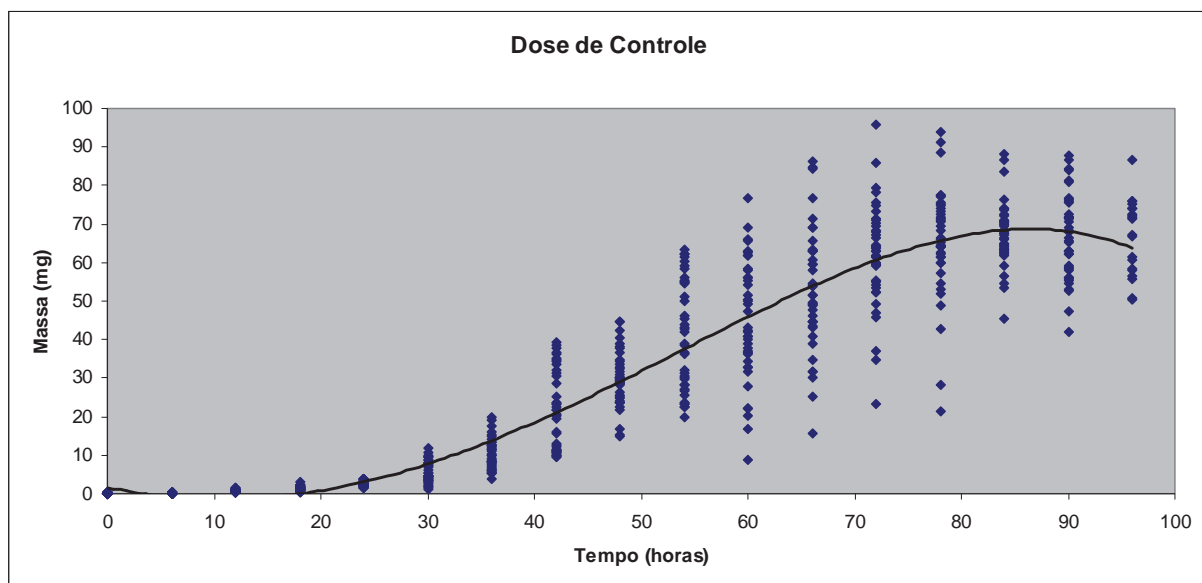


Fig 5: Curva de crescimento larval do grupo Controle, relacionando a massa corpórea (mg) com o tempo de desenvolvimento (horas). Cada ponto indica o peso anotado de uma larva, e o traço indica a progressão da média de massas neste intervalo.

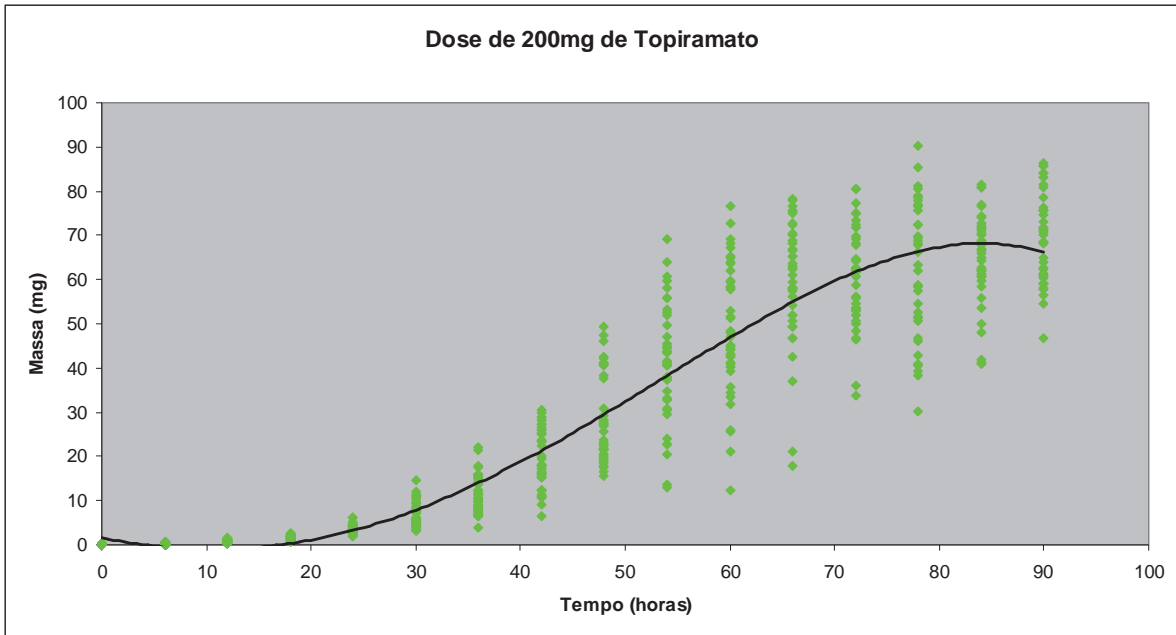


Fig 6: Curva de crescimento larval do grupo com 200mg de Topiramato, relacionando a massa corpórea (mg) com o tempo de desenvolvimento (horas). Cada ponto indica o peso anotado de uma larva, e o traço indica a progressão da média de massas neste intervalo.

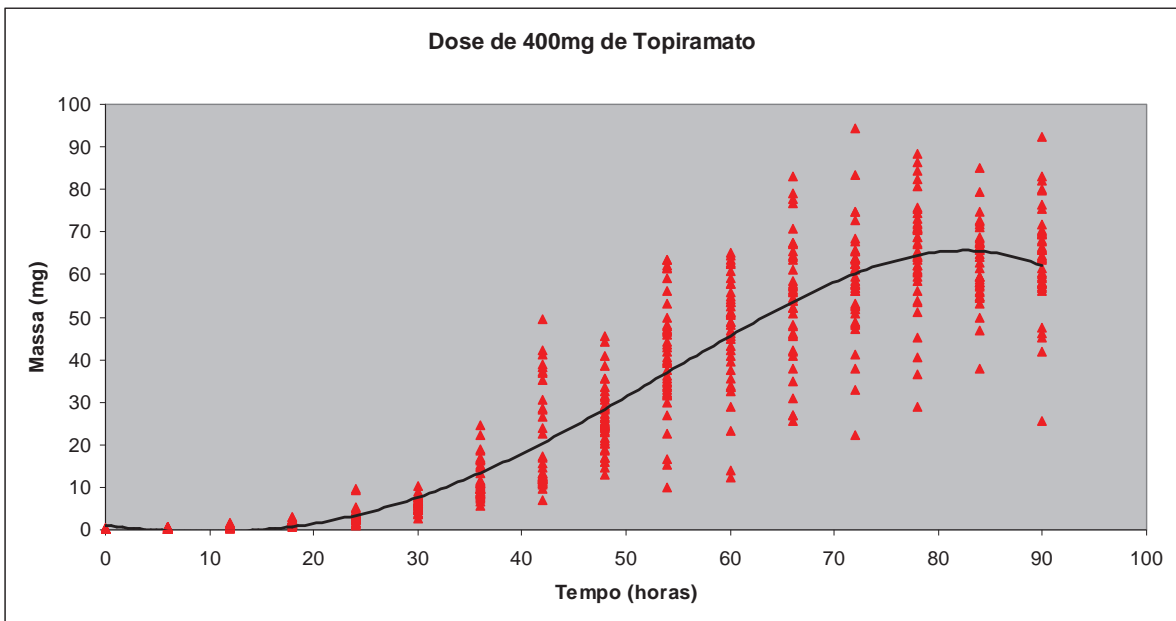


Fig 7: Curva de crescimento larval do grupo com 400mg de Topiramato, relacionando a massa corpórea (mg) com o tempo de desenvolvimento (horas). Cada ponto indica o peso anotado de uma larva, e o traço indica a progressão da média de massas neste intervalo.

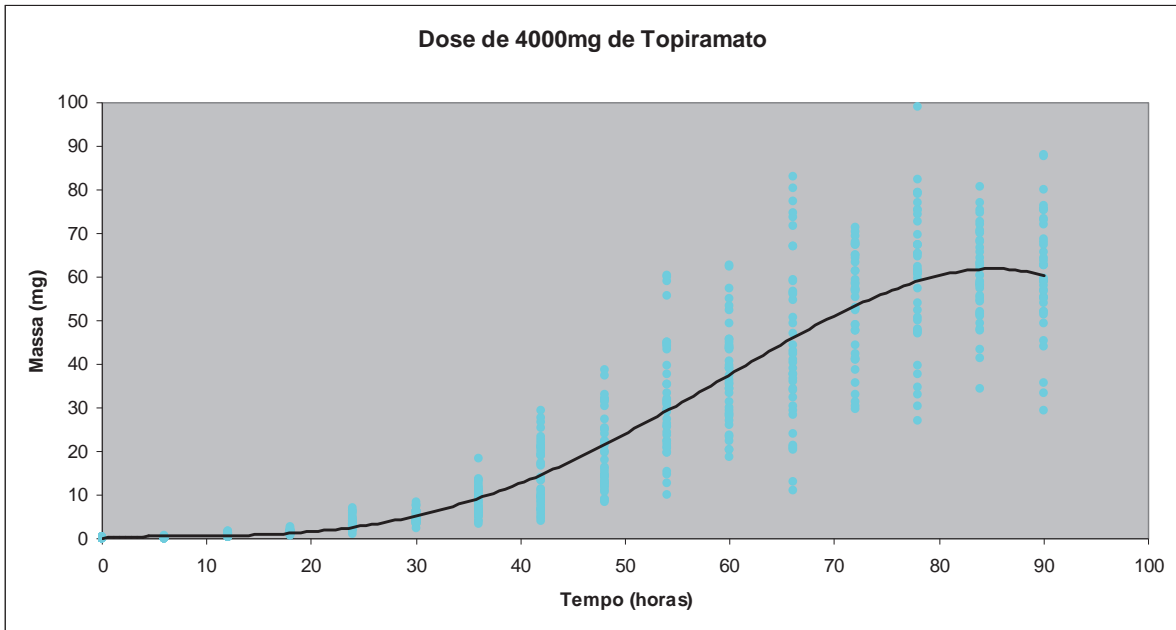


Fig 8: Curva de crescimento larval do grupo com 4000mg de Topiramato, relacionando a massa corpórea (mg) com o tempo de desenvolvimento (horas). Cada ponto indica o peso anotado de uma larva, e o traço indica a progressão da média de massas neste intervalo.

Analisando os valores de massa medidos no experimento (Figuras 5, 6, 7 e 8) pode-se perceber que não houve diferenças tão abruptas nas massas obtidas nas pesagens entre os tratamentos no decorrer do tempo, sendo que todos eles apresentaram um crescimento de padrão sigmóide, comum para o desenvolvimento larval em moscas-varejeiras, que se inicia com um crescimento baixo, seguido de um período abrupto de aumento de massa e depois por um período em que os valores de massa param de aumentar e tendem a “estabilizar” até os indivíduos empuparem. Em relação aos valores dos pesos médios finais, os tratamentos de 200mg (31,0438), 400mg (29,9833) e Controle (30,6624) não foram classificados como estatisticamente diferentes, devido à proximidade de seus valores, enquanto que o tratamento de 4000mg (26,3859) foi considerado significativamente diferente dos outros tratamentos (com uma média menor que a de todos os outros tratamentos realizados) sendo este classificado em um grupo a parte (*agrupamento do teste a posteriori de Duncan - Controle [A], 200mg [A], 400mg [A] e 4000mg [B]*).

Pelo fato de o tratamento controle, que representa o crescimento normal das larvas desta espécie, ser classificado como estatisticamente semelhante aos grupos de 200mg e 400mg, não se pode afirmar se houve efeito da substância Topiramato no crescimento e no ganho de massa das larvas com estas concentrações; em compensação no caso do tratamento de 4000mg, houve diferença estatística significante, revelando então que esta alta concentração apresenta um efeito causado pelo medicamento sobre o desenvolvimento larval de *C. megacephala*.

A análise da interação tratamento*hora também foi significativa ($F=2,21$, $p<0,0001$, $n=2640$), ou seja, quando se analisa os diferentes tratamentos comparando-os entre as horas observadas, pode-se perceber que pelo menos um dos tratamentos apresentou variações significativas em comparação aos outros durante as horas analisadas, se diferenciando dos demais, indicando efeito do medicamento no crescimento das larvas não só na média de massa final, mas também diferenciando no ganho de massa no decorrer das horas analisadas durante seu desenvolvimento (Tabela 1).

Analisando-se os dados referentes às médias de massa por horário, dentro de cada tratamento, é possível ver que todos apresentam um período de maior ganho de massa e também coincidente com um maior crescimento das larvas (LEVOT, G. W.; BROWN, K. R.; SHIPP, E., 1979). Em geral os tratamentos apresentaram este período em horários similares ao longo de seu desenvolvimento. Os grupos Controle, 200mg e 400mg de Topiramato (estatisticamente semelhantes) expressaram um grande crescimento no peso das larvas no período entre 30-36 horas até por volta de 66-72 horas de desenvolvimento, enquanto que o grupo de 4000mg da substância apresentou esse período de crescimento um pouco depois, entre 36-42 horas até por volta de 72-78 horas, mostrando um atraso no ganho de massa em relação aos outros grupos (Tabela 1 e Figura 9).

Tabela 1: Valores das médias de massa de 40 indivíduos (20 de cada réplica) a cada 6 horas em todos os tratamentos, seguido do agrupamento de Duncan para as horas dentro de cada tratamento e do desvio padrão. Nestes agrupamentos, os horários que foram colocados em grupos isolados representam aqueles onde o ganho de massa pelas larvas foi maior, fazendo as médias diferirem bastante em relação à anterior.

Horas	Tratamentos											
	Controle			200mg			400mg			4000mg		
	Média	Desv pad		Média	Desv pad		Média	Desv pad		Média	Desv pad	
0	0,10 [I]	0,08		0,13 [K]	0,10		0,13 [J]	0,10		0,13 [I]	0,10	
6	0,11 [I]	0,12		0,18 [K]	0,20		0,20 [J]	0,21		0,21 [I]	0,22	
12	0,68 [I]	0,33		0,85 [K]	0,38		0,83 [J]	0,31		0,92 [I]	0,35	
18	1,31 [H,I]	0,55		1,59 [K]	0,48		1,87 [I,J]	0,48		1,47 [I]	0,42	
24	2,54 [H,I]	0,71		3,51 [J,K]	0,99		3,43 [I,J]	1,68		3,48 [I]	1,35	
30	5,61 [H]	2,81		6,64 [J]	2,85		6,14 [I]	1,57		4,89 [H]	1,38	
36	10,20 [G]	3,96		11,41 [I]	4,19		11,79 [H]	4,32		8,50 [H]	3,27	
42	21,66 [F]	10,28		19,35 [H]	6,59		20,05 [G]	11,62		14,55 [G]	7,23	
48	29,91 [E]	7,20		28,23 [G]	9,74		26,55 [F]	7,69		20,18 [F]	8,76	
54	41,05 [D]	14,02		41,01 [F]	13,29		41,02 [E]	13,16		32,02 [E]	12,88	
60	44,95 [D]	15,68		48,88 [E]	14,90		46,56 [D]	13,02		37,77 [D]	11,61	
66	53,10 [C]	16,05		59,55 [D]	13,83		54,15 [C]	14,39		45,07 [C]	19,27	
72	61,97 [B]	13,54		61,11 [C,D]	11,20		58,63 [B]	12,88		53,40 [B]	12,10	
78	65,48 [A,B]	14,15		62,44 [B,C,D]	15,45		65,05 [A]	12,80		60,16 [A]	15,82	
84	67,32 [A]	8,18		64,73 [B]	10,31		62,73 [A,B]	8,88		60,19 [A]	10,34	
90	66,56 [A]	11,03		69,52 [A]	10,03		63,86 [A]	12,27		61,05 [A]	13,23	

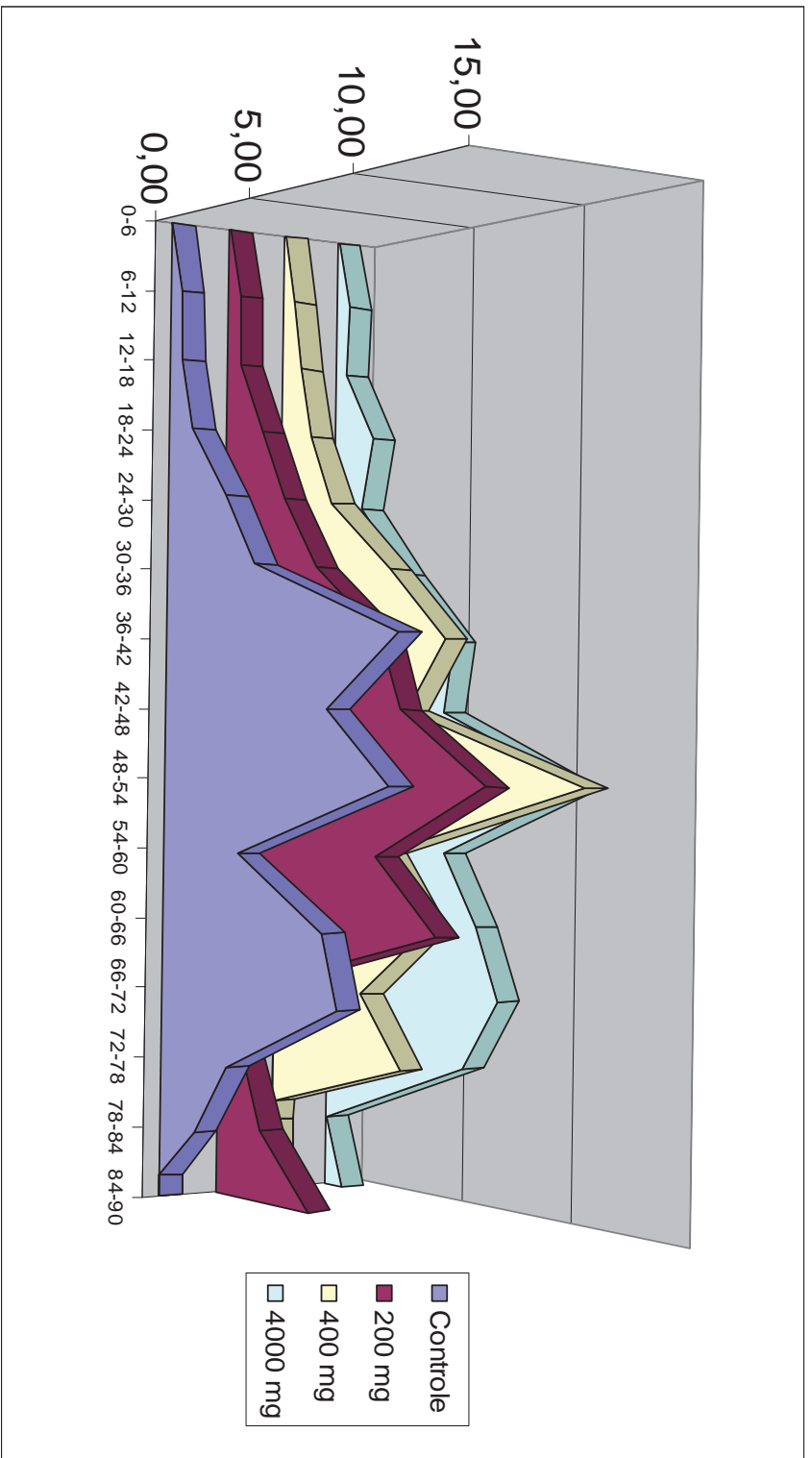


Fig. 9. Diferença no crescimento das larvas entre um intervalo de passagem e outro. Quando o gráfico possui uma elevação, significa que a média da passagem do intervalo posterior foi maior que a do período anterior neste intervalo de

Curvas de crescimento nos diferentes tratamentos

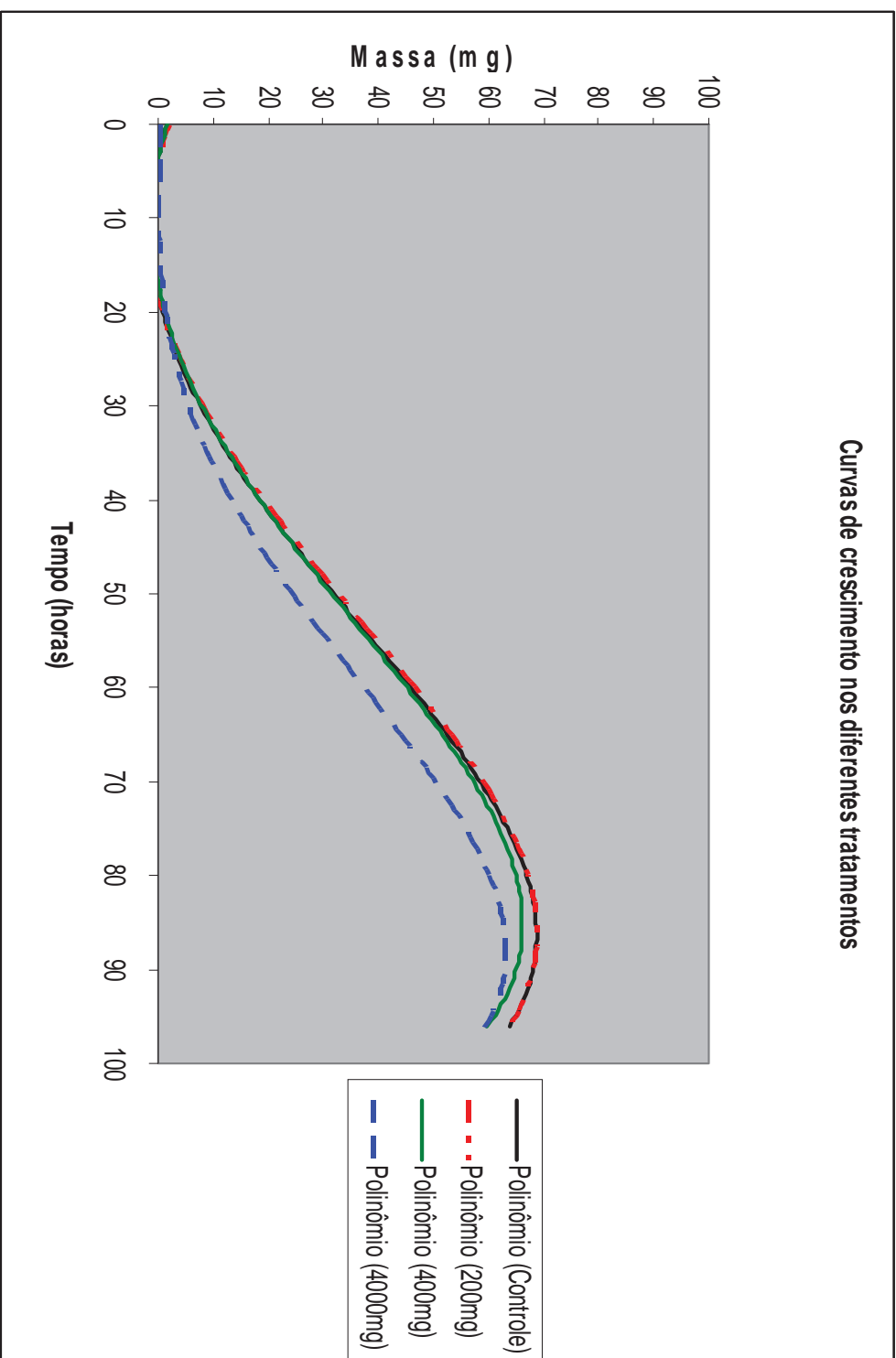


Fig 10 Curvas de tendência de crescimento das larvas nos quatro tratamentos testados: Controle, 200mg, 400mg, 4000mg. Quanto mais à esquerda está a curva, mais rápido as larvas do respectivo tratamento ganharam massa e cresceram, quanto mais à direita, mais tempo se passou até que as larvas desse tratamento conseguissem adquirir esta massa e crescer. Levando em conta que a curva do controle representa o desenvolvimento normal desta espécie, as curvas de tratamento podem estar deslocadas à esquerda desta, o que significa que neste caso as larvas se desenvolveram mais rápido que em condições normais; ou deslocadas à direita, significando que neste caso as larvas demoraram mais que o normal para se desenvolverem.

Os tratamentos Controle, 200mg e 400mg apresentaram suas curvas de tendência de crescimento muito próximas (inclusive coincidentes em alguns pontos) e acima da curva do tratamento de 4000mg (Figura 10), iniciando o aumento na massa anteriormente a este outro grupo no decorrer das horas. Portanto, o tratamento de maior concentração do remédio permaneceu abaixo das demais, indicando que os indivíduos neste caso apresentaram um crescimento retardado em relação aos outros tratamentos (e em relação à uma situação normal) na análise temporal.

Efeito similar na espécie *C. megacephala* já foi observado, por exemplo quando em contato com a substância Diazepam, mostrado por Gomes (2006), onde as larvas também apresentaram um retardo em seu desenvolvimento em comparação ao grupo controle. Algumas substâncias por outro lado podem ter efeito contrário ao apresentado por estas substâncias, como é o caso da cocaína (GOFF et al., 1989) e da heroína (GOFF et al., 1991) em Sarcophagidae, que causam uma aceleração no crescimento das larvas em relação ao controle, fazendo com que as mesmas atinjam massas maiores e entrem no estágio de pupa mais cedo.

Os dados de proporção de indivíduos adultos de cada sexo estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Número de indivíduos adultos contados em cada tratamento e a porcentagem de indivíduos de cada sexo.

Proporção de indivíduos em cada sexo			
Tratamento	Machos	Fêmeas	Porcentagem Machos x Fêmeas
Controle	46	51	47,42% X 52,58%
200mg	42	46	47,73% X 52,27%
400mg	10	28	26,32% X 73,68%
4000mg	22	24	47,83% X 52,17%

Enquanto no estágio de larva, não é possível se ter noção de qual sexo de mosca ela se desenvolverá (inclusive esta divisão só ocorre algum tempo depois e já com algumas horas de desenvolvimento), portanto em cada uma delas espera-se teoricamente que haja 50% de chance de desenvolver um sexo ou outro. Em teoria, no final haveria o mesmo número de fêmeas e de machos adultos em todos os tratamentos, caso nenhum deles influencia-se neste ponto.

No referente à proporção de indivíduos de cada sexo, não foi observada nenhuma grande alteração em relação à proporção esperada de 50% para cada sexo (em geral 47% de machos e 53% de fêmeas), com exceção do tratamento de 400mg, que apresentou uma porcentagem deslocada favorável às fêmeas (26% de machos contra 74% de fêmeas). Como neste caso específico, o tamanho amostral foi bem pequeno, pode-se sugerir que no presente trabalho a substância testada não tem efeito diferencial sobre o desenvolvimento de nenhum dos dois sexos.

Os dados sobre a taxa de sobrevivência estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3: Número de indivíduos e porcentagem de sobreviventes contabilizados após a eclosão.

Tratamento	Total inicial de indivíduos no pote	Total de indivíduos sobreviventes	Porcentagem de sobreviventes
Controle	300	97	32,33%
200mg	300	88	29,33%
400mg	300	38	12,67%
4000mg	300	46	15,33%

Com estes dados, pode-se notar que houve uma alta mortalidade de larvas durante o período de desenvolvimento (mesmo em condições experimentais sem predadores e com comida disponível todo o tempo), em que o próprio grupo controle só apresenta aproximadamente um terço do número de indivíduos do pote sobreviventes até a fase adulta, em relação à densidade inicial de 300 larvas (Tabela 3). Isto pode ter ocorrido pela pouca agregação das larvas durante o processo de alimentação, em uma quantidade grande de alimento (125g) (GOODBROD & GOFF, 1990). Todos os tratamentos apresentaram mortalidade maior que o grupo controle, e o tratamento de 400mg que, além de apresentar uma tendência a favor das fêmeas, apresentou a menor taxa de sobrevivência de todos os tratamentos realizados, porém não podemos afirmar que isto tenha sido causado por um efeito da substância.

6. CONCLUSÕES

Analisando os resultados de testes estatísticos realizados, é possível concluir que realmente existe um efeito causado pela substância Topiramato (Amato[®]) no crescimento das larvas da espécie *C. megacephala*, pelo menos em uma alta dosagem, sendo que o tratamento com a maior concentração de medicamento (4000mg) resultou na diminuição do peso médio dos indivíduos em comparação ao tratamento Controle. O tratamento com concentração de 200mg da substância apresentou a maior massa média final de todos os tratamentos realizados neste estudo, mas pelo fato de esta média não ser significativamente diferente dos tratamentos controle e de 400mg não se pode afirmar que este aumento tenha sido efeito do Topiramato.

Também é possível concluir que existe uma variação do efeito causado pela substância nas larvas, relacionado à diferença de concentração no substrato alimentar, sendo que as baixas dosagens testadas não deram resultados significativamente divergentes do controle, mas uma alta concentração já apresentou um efeito de retardamento de crescimento, sendo necessários mais estudos a fim de se conseguir definir qual a concentração mínima para que a substância afete o desenvolvimento das larvas de *C. megacephala*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO® (TOPIRAMATO) – Bula do laboratório Eurofarma 2009

BEER, B.; LIBISELLER, K.; OBERACHER, H.; PAVLIC, M. **A fatal intoxication case involving topiramate.** Forensic Science International 202: e9-e11, 2010.

BENECKE, M. **A brief history of forensic entomology.** Forensic Science International 120:2-14, 2001.

BOUREL, B.; HE´DOUIN, V.; MARTIN-BOUYER, L.; BE´CART, A.; TOURNEL, G.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D. **Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae).** J. Forensic Sci. 44: 354-358, 1999.

BOUREL, B.; TOURNEL, G.; HE´DOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOFF, M. L.; GOSSET, D. **Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication.** Forensic Sci. Int. 120: 127-131, 2001.

FAKHOURY, T.; MURRAY, L.; SEGER, D.; McLEAN, M.; ABOU-KHALIL, B. **Topiramate Overdose: Clinical and Laboratory Features.** Epilepsy & Behavior 3: 185-189, 2002.

FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C.; HÁRSI, C. M.; BURALLI, G. M.; ISHIHATA, G.K. **Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil.** Revta. Microbiol., 15(3): 170-174, 1984.

GAGLIANO-CANDELA, R.; AVENTAGGIATO, L. **The detection of toxic substances in entomological specimens.** Int. J. Legal Med. 114: 197-203, 2001.

GOFF, M. L.; OMORI, A. I.; GOODBROD, I. R. **Effect of cocaine in tissue on the development rate of *Boetcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae).** Journal of Medical Entomology, 26(2), p. 91-93, 1989.

GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; HEWDIKARAM, K. A.; OMORI, A. I. **Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boetcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications to the estimation of postmortem intervals using arthropod developmental patterns.** Journal of Forensic Science. 36(2), p. 537-542, 1991.

GOMES, G. **Processos Auto-organizados: Efeitos de substâncias químicas que agem no sistema nervoso sobre o desenvolvimento e padrão de dispersão larval pós-alimentar de dípteros (Calliphoridae e Muscidae)**. 2006. 202f. Dissertação Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campus Rio Claro. 2006.

GOMES, L.; GOMES, G.; DESUÓ, I. C. **A Preliminary study of insect fauna on pig carcasses located in sugarcane in winter in southeastern Brazil**. Medical and Veterinary Entomology, v. 23, p. 155-159, 2009.

GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J.; SANCHES, M. R. **Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae)**. Revta. Bras. Ent., 47: 229- 234, 2003.

GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. & PRADO, A. P. **As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia)**. Revta. Bras. Zool., 1 (4): 239-416, 1983.

GUIMARÃES, J.H.; PRADO, A. P.; BURALLI, G.M. **Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae)**. Revta. Bras. Ent., 23 (4): 245-255, 1979.

IMBIRIBA, A. S.; IZUTANI, D.T.; MILHORETO, I.T.; LUZ, E. **Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae)**. Arq. Biol Tecnol., 20: 35-39, 1977.

INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L. **Entomotoxicology**. Forensic Science International 120: 42-47, 2001.

IRELAND, S. & TURNER, T. **The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria***. Forensic Sci. Int., Volume 159, Issue 2 , Pages 175-181, 2 June 2006.

LEVOT, G. W.; BROWN, K. R.; SHIPP, E. **Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera**. Bull. Entomol. Res., 69: 469-475, 1979.

NELSON, L. A.; DOWTON, M.; WALLMAN, J. F. **Thermal attributes of *Chrysomya* species**. Entomologia Experimentalis et Applicata 133: 260-275, 2009.

OLIVEIRA, H. G.; GOMES, G.; MORLIN, J. J. Jr.; ZUBEN, C.J.V.; LINHARES, A. X. **The effect of Buscopan® on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae).** J. Forensic Sci. 54: 202-206, 2009.

OLIVEIRA, T. C.; VASCONCELOS, S. D. **Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicina in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology.** Forensic Science International 198: 97-102, 2010.

SMITH, A. G.; BRAUER, H. R.; CATALANO, G.; CATALANO, M. C. **Topiramate Overdose: A case Report and Literature Review.** Epilepsy & Behavior 2: 603-607, 2001.

SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology.** Cornell University Press, New York, 1986.

SOHAL R. S.; LAMB R. E. **Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*.** J Insect Physiol 23: 1349–1354, 1977.

SOHAL R. S.; LAMB R. E. **Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*.** J Insect Physiol 25: 119–124, 1979.

SOUZA, A. M.; LINHARES, A. X. **Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality.** Med. Vet. Entomol. 11: 8-12, 1997.

SOUZA, C. M.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. **Effect of Nandrolone Decanoate on the Development of Three Species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), Flies of Forensic Importance in Brazil.** Journal of Medical Entomology, 48(1): 111-117, 2011.

VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae).** Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.

VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. **Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal.** J. Applied Entomol., 120 (3): 379-382, 1996.

WELLS, J. D. & B. GREENBERG. **Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion.** **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.

ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the Old World.** London: Butterworths, 267 p, 1965.