



Instituto de  
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

DETECÇÃO E ESTUDO SOBRE O EFEITO DA  
METANFETAMINA E DO ECSTASY NO  
DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE TRÊS ESPÉCIES  
DE *CHRYSOMYA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE  
IMPORTÂNCIA FORENSE

**CAROLINA GONÇALVES PALANCH DE LIMA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada e Área de concentração em *Biologia de parasitas e microorganismos*.

*Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen (orientadora)*

**BOTUCATU – SP.**

**2009**



Instituto de  
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DETECÇÃO E ESTUDO SOBRE O EFEITO DA  
METANFETAMINA E DO ECSTASY NO  
DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE TRÊS ESPÉCIES  
DE *CHRYSOMYA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE  
IMPORTÂNCIA FORENSE

**CAROLINA GONÇALVES PALANCH DE LIMA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada e Área de concentração em *Biologia de parasitas e microorganismos*.

*Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen (orientadora)*

**BOTUCATU – SP.**

**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus**

Lima, Carolina Gonçalves Palanch de.

Detecção e estudo sobre o efeito da metanfetamina e do ecstasy no desenvolvimento de imaturos de três espécies de *Chrysomya* (Díptera: Calliphoridae) de importância forense / Carolina Gonçalves Palanch de Lima. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Patrícia Jacqueline Thyssen  
Assunto CAPES: 21303002

1. Entomologia forense - Ecologia 2. Inseto - Aspectos biológicos

CDD 595.74

Palavras chave: Biologia de necrófagos; Calliphoridae; Ecstasy; Entomologia Forense; Metanfetamina

“A busca mais importante para o ser humano é a tentativa de ter moral em nossas ações. Nosso equilíbrio interior e, até, nossa própria existência depende disso. Somente a moralidade em nossas ações pode trazer beleza e dignidade para nossa vida.”

Albert Einstein (1879-1955)

*“Who saw him die? I, said the fly  
With my little eye, I saw him die.”*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcio e Inês, por serem responsáveis pela minha formação ética e moral e por sempre apoiarem as decisões que tomei durante toda a minha vida.

Ao meu marido, Wagner, com amor, pelo incentivo nos momentos em que o cansaço apareceu e pela paciência nos momentos em que me ausentei.

À minha orientadora Dra. Patrícia J. Thyssen que muito além da orientação, me ofereceu sua amizade o que tornou esse trabalho muito mais fácil e prazeroso de ser realizado.

Aos professores Dr. Wesley A. C. Godoy e Dr. Arício Xavier Linhares por permitirem que meu trabalho fosse realizado em seus laboratórios na UNESP – Botucatu e UNICAMP, respectivamente.

Aos colegas de laboratório da UNESP por estarem sempre dispostos a me ajudar, em especial à Juliana Alves Neves que além de me ajudar na realização dos experimentos me acolheu de braços abertos em sua casa nos períodos em que fiquei em Botucatu; à Juliana Zibordi Gião pela solicitude e por providenciar o padrão de anfetamina necessário para a realização de parte dos meus experimentos e aos colegas Thiago de Carvalho Moretti, Carlos “Chito’s” Alexandre Alves e Helton “Borb’s” Otsuka por suas contribuições no campo da taxonomia de insetos.

Ao meu colega de profissão e mestrado, o perito criminal Edmilson Martins, por conseguir, legalmente, ecstasy para realização de parte dos meus experimentos, além de me proporcionar diversas dicas sobre atendimentos de locais de crime e lições de vida.

Aos meus colegas de laboratório da UNICAMP por, além de ajudar na realização dos experimentos, me proporcionarem momentos de diversão no meio de tanto trabalho: Marcos “Leguinho” José Alves Jr. por me ensinar a técnica de imunohistoquímica e me divertir com suas imitações; Maicon “Radical” Diego Grella por passar sua experiência com a criação das larvas e pelos docinhos deliciosos que trazia de Rio Claro; Carina “Rice” Mara de Souza por me ajudar com os experimentos fizesse sol ou chuva, fosse final de semana ou precisasse trabalhar até a madrugada; Bianca “Fadinha” Cardoso e Fabio “Frango” Rezende por serem solícitos todas as vezes que, desesperadamente, precisei de ajuda.

Aos professores Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante, Dra. Luciene Maura Mascarini Serra e Dra. Carolina Reigada por suas contribuições construtivas no exame de qualificação.

Às minhas colegas de profissão, perita criminal Eloísa Auler Bittencourt por me apresentar à minha orientadora e por disponibilizar um espaço no laboratório de biologia do Instituto de Criminalística de São Paulo caso fosse necessário; às peritas criminais Maria de Fátima Pedroso e Camila Delanesi Guedes por quantificarem o MDMA existente nos comprimidos de ecstasy usados no experimento.

Ao meu chefe e aos meus colegas peritos criminais da Equipe de Perícias Criminalísticas Norte da Cidade de São Paulo do Instituto de Criminalística pelas inúmeras trocas de plantão para que eu pudesse fazer as disciplinas e realizar meus experimentos.

À minha grande amiga Francine Vilalta Chilliato e sua família por me hospedarem com muito carinho em suas casas nos períodos que passei em Campinas.

## SUMÁRIO

	Resumo .....	01
	Abstract .....	02
<b>1</b>	<b>- Introdução e Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>03</b>
1.1	- Entomotoxicologia .....	08
1.2	- Aplicações da Entomotoxicologia .....	09
1.2.1	- Detecção de substâncias tóxicas em larvas de insetos necrófagos .....	10
1.2.2	- Acumulação biológica (bioacúmulo) .....	14
1.2.3	- Atratividade na colonização .....	16
1.2.4	- Efeito das drogas sobre o desenvolvimento larval .....	16
1.3	- Derivados anfetamínicos .....	28
1.3.1	- Toxicocinética .....	30
1.3.2	- Toxicodinâmica .....	30
1.3.3	- Dependência e tolerância .....	31
1.3.4	- Metanfetamina .....	31
1.3.5	- <i>Ecstasy</i> .....	33
1.4	- Espécies de interesse forense deste estudo .....	38
<b>2</b>	<b>- Objetivos Gerais .....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>- Detecção e estudo do efeito da metanfetamina no desenvolvimento de imaturos de duas espécies de <i>Chrysomya</i> (Diptera: Calliphoridae) de interesse forense .....</b>	<b>41</b>
3.1	- Introdução .....	41
3.2	- Material e Métodos .....	43
3.3	- Resultados e Discussão .....	45
<b>4</b>	<b>- Estudo do efeito do <i>ecstasy</i> no desenvolvimento de imaturos de três espécies de <i>Chrysomya</i> (Diptera: Calliphoridae) de interesse forense .....</b>	<b>51</b>
4.1	- Introdução .....	51
4.2	- Material e Métodos .....	52
4.3	- Resultados e Discussão .....	53
<b>5</b>	<b>- Conclusões Gerais .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>- Referências Bibliográficas .....</b>	<b>64</b>



## RESUMO

A Entomologia Forense utiliza dados de desenvolvimento e aspectos ecológicos de insetos que se alimentam de corpos em decomposição com o objetivo de auxiliar a resolução de casos na área forense. Uma das principais aplicações, entre outras, é a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) que pode ser baseada no ciclo biológico de uma dada espécie. Porém, a falta de informação ou conhecimento sobre as variáveis que interferem de forma direta ou indireta sobre a taxa de desenvolvimento de diferentes espécies pode gerar dados imprecisos em relação à idade do inseto e, conseqüentemente, ao IPM. Recentemente, devido ao aumento no número de óbitos relacionados ao abuso de drogas, análises toxicológicas têm sido direcionadas a insetos necrófagos, visando complementar informações acerca da causa da morte, assim como garantir maior acurácia ao cálculo do IPM, uma vez que certas substâncias ingeridas antes do óbito podem alterar a taxa de desenvolvimento de algumas espécies que se alimentam dos tecidos de cadáveres. Esse ramo mais recente da entomologia forense é conhecido como Entomotoxicologia. No presente estudo objetivou-se observar o efeito de diferentes concentrações de metanfetamina e ecstasy, derivados anfetamínicos que tiveram seu consumo aumentado nas últimas décadas no Brasil, na taxa de desenvolvimento de imaturos dos califorídeos *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann), quando acrescidos em dieta artificial apropriada. A anfetamina, metabólito da metanfetamina, não afetou de forma significativa o desenvolvimento larval de *C. megacephala*, no entanto, aumentou o tempo de desenvolvimento de imaturos de *C. putoria*, em especial a fase de pupa. O MDMA, principal componente do *ecstasy*, não alterou a taxa de desenvolvimento larval de *C. albiceps* e *C. putoria*, mas acelerou consideravelmente a de *C. megacephala*. Através do método de imunohistoquímica tentou-se fazer a detecção de anfetamina em larvas de *C. megacephala* e *C. putoria*, porém os resultados mostraram-se inconclusivos.

Palavras-chave: metanfetamina; *ecstasy*; Calliphoridae; biologia de necrófagos; IPM; Entomologia Forense; Entomotoxicologia.

## ABSTRACT

Forensic Entomology uses data about development and ecology of insects that feed on corpses aiming to assist to solve forensic cases. One of its main application, among others, is to estimate the post-mortem interval (PMI) that can be based on the life cycle of a specific species. However, the lack of information or knowledge about the variables that can change directly or indirectly the development rate of different species can lead to inaccurate data about the age of the insect and, consequently, the PMI. Recently, due to the increasing number of death related to drug abuse, toxicological analyses have been directed to necrophagous insects intending to provide complementary information about the cause of death, as well as to assure a more accurate estimate of PMI, once some substances ingested before death can modify the development rate of some species that feed on cadaver tissues. This new branch of Forensic Entomology is known as Entomotoxicology. The aim of the present study was to observe the effect of different concentrations of methamphetamine and ecstasy, two amphetamine-like drugs which abuse rose among Brazilians in the last decades, on the development rate of immature of Calliphoridae *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Chrysomya putoria* (Wiedemann), when added to artificial diet proper for them to complete their development. Amphetamine, methamphetamine's metabolite, did not affect significantly the larval development of *C. megacephala*, although it increased the time of development of *C. putoria* maggots, specially the pupa stage. MDMA, the main compound of ecstasy, did not alter the larval development rate of *C. albiceps* nor *C. putoria* but it accelerated, considerably, the development rate of *C. megacephala*. Through immunohistochemical analyses it was tried to detect amphetamine in larvae of *C. megacephala* and *C. putoria*, but the results were inconclusive.

Key words: methamphetamine; ecstasy; Calliphoridae; necrophagous biology; PMI; Forensic Entomology; Entomotoxicology.

## 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artrópodes constituem um grande grupo de animais dos quais o número de espécies descritas é três vezes maior do que a quantidade de espécies de todas as outras espécies animais (Barnes & Rupert, 1993). Dentro do filo Artrópoda, o subfilo Hexapoda compreende a classe Insecta e outros três grupos de animais sem asas, Collembola, Protura e Diplura, todos essencialmente terrestres, mas com a existência de grupos que invadiram secundariamente ambientes aquáticos (Brusca & Brusca, 2007).

O sucesso dos insetos é marcado pelo grande número de espécies e indivíduos e por possuírem a mais espetacular irradiação evolutiva dos Hexapoda, ou seja, habitam quase todos os habitats no meio terrestre e na água doce e, ainda, a superfície dos oceanos e regiões litorâneas marinhas (Barnes & Rupert, 1993; Brusca & Brusca, 2007).

Além disso, corpos de animais em decomposição atraem uma grande variedade de organismos, dos quais os artrópodes constituem fauna dominante, utilizando este micro habitat temporário para se alimentar, viver e procriar (Von Zuben, 2001).

A área de estudo que aplica o conhecimento sobre o desenvolvimento e aspectos ecológicos de insetos e outros artrópodes no auxílio de investigações, tanto criminais como cíveis, é denominada Entomologia Forense (Catts & Goff, 1992; Hall, 2001).

Um dos primeiros casos documentados sobre entomologia forense está relatado no livro *The washing away of wrongs*, de autoria de Sung Tsu, um advogado e investigador chinês do século 13, onde é descrito um caso de assassinato próximo a uma lavoura de arroz na China. Ao perceber que os ferimentos da vítima poderiam ter sido causados pela ferramenta de trabalho utilizada por agricultores na lavoura, policiais solicitaram que fossem colocadas suas foices no chão e notou-se assim que, em somente uma delas, havia presença de moscas varejeiras que teriam sido atraídas pela presença não visível de sangue. Quando confrontado, o dono da foice admitiu o crime (Benecke, 2001).

Em 1855, o médico francês Bergeret reportou o primeiro caso de entomologia forense na era moderna estimando o intervalo pós-morte (IPM) com base nas mudas de larvas e pupas de moscas varejeiras encontradas no local (Benecke, 2001; Greenberg, 1991). Mas o grande mérito na fundação desta ciência coube a Mégnin (1894) em sua obra denominada *La faune des cadavres: application de l'entomologie a la medecine*

*legale* descreve oito estágios de decomposição e a cada estágio associou uma onda de insetos que o colonizam e os quais ele deu o nome de trabalhadores da morte (*Travailleurs de la mort*).

A primeira onda é formada pelas moscas (Diptera), dando como exemplo os gêneros *Musca* e *Calliphora* que chegam à fase de decomposição denominada fresca (do francês *frais*) e permanecem até a fase seguinte. Com o início da liberação do odor (fase gasosa) surge a segunda onda que também é ocupada por moscas, pertencentes aos gêneros *Lucilia* e *Sarcophaga*. A terceira onda, cuja decomposição cadavérica é caracterizada pela formação de ácidos graxos (adipocera) e que ocorre cerca de três a seis meses (em países temperados) após a morte tem-se a chegada de espécies das famílias Coleoptera e Lepidoptera (Mégnin, 1894).

Na fase de fermentação dá-se início a quarta onda onde as moscas predominantes são dos gêneros *Piophilina* e *Anthomyia*. Na fase de decomposição denominada liquefação, inicia a quinta onda formada por dípteros acalitrados e coleópteros da família Silphidae. A sexta onda é composta por ácaros que irão absorver os líquidos remanescentes das demais fases. Quando os restos estão quase que todos secos (esqueletizados), tem-se a sétima onda que é composta por insetos da ordem Coleoptera. A oitava e última onda é composta por duas espécies, uma do gênero *Tenebrio* e uma do gênero *Plinus* que finalizarão a decomposição (Mégnin, 1894).

No caso do Brasil, essa sucessão pode ser um pouco diferente pelo fato de ser um país de região tropical e clima mais quente o que acelera o processo de decomposição. Wolff *et al.* (2001) realizaram um trabalho de sucessão ecológica em Medellín, na Colômbia, no qual identificaram cinco estágios de decomposição e fizeram considerações sobre as famílias que podem ser indicadores de períodos de decomposição sucessivos.

Para a fase de decomposição fresca os indicadores seriam adultos de Muscidae e Sarcophagidae; para a fase de inchaço ovos e larvas de Calliphoridae e adultos de Vespidae; para a fase denominada de ativa seriam larvas de Sarcophagidae; para o estágio avançado seriam as larvas de Piophilidae e para a fase seca seriam as larvas de Histeridae e Scarabaeidae (Wolff *et al.*, 2001).

Segundo Lord e Stevenson (1986) a Entomologia Forense está subdividida em três principais áreas:

- Entomologia urbana: estudos relacionados a problemas, tais como litígios e ações civis, envolvendo artrópodes em imóveis ou como pestes em casas ou jardins. Como exemplo podemos citar infestações de cupins (térmitas), baratas entre outros que podem depreciar o valor de mercado de imóveis ou causar danos que comprometam a segurança. Também estão inclusos nesta área processos legais relacionados com o mau uso de pesticidas;
- Entomologia de produtos armazenados/estocados: está relacionado com infestação ou contaminação de produtos comerciais em grande escala como, por exemplo, presença de insetos, ou parte deles, em barras de doce, moscas em ketchup ou aranhas em papel de banheiro. Geralmente esses casos também envolvem litígios;
- Entomologia médico-legal/médico-criminal: está relacionado com o envolvimento de artrópodes em eventos criminais, geralmente de cunho violento como assassinato, suicídio e estupro, porém também estão inclusas nesta área outras violações como abuso físico e tráfico/contrabando.

Dentre as razões para utilização de insetos nas investigações criminais podemos citar o fato dos insetos serem geralmente os primeiros a encontrar o corpo em decomposição; além do fato da fauna de artrópodes no corpo e ao redor dele mudar numa seqüência sucessional previsível conforme progride a decomposição, fato denominado sucessão ecológica; e porque atualmente, a fauna do cadáver é ignorada como vestígio do crime quando os investigadores processam o local da morte (Catts & Goff, 1992).

Na área da Entomologia Médico-legal, uma análise cuidadosa da comunidade de insetos encontrada num corpo em decomposição, associada ao conhecimento da biologia e ecologia do inseto e às condições ambientais do local, pode fornecer indicações forenses valiosas que incluem a estimativa do IPM, movimentação do cadáver após a morte, associação de suspeitos com a cena do crime, indicação de ferimentos prévios à morte e a presença de drogas ou toxinas no corpo em decomposição, o que até poderia ajudar na determinação da causa da morte (Catts & Goff, 1992; Goff & Lord, 2001).

Nuorteva (1974) mostra como os insetos puderam ser úteis na resolução de dois assassinatos em Helsinki, Finlândia. No quarto da casa onde havia ocorrido um dos crimes, havia quantidade considerável de sangue seco e diversas moscas, dentre elas *Muscina stabulans* (Diptera: Muscidae), espécie também encontrada em uma camiseta manchada de sangue contida dentro de um saco plástico em um lixo próximo ao local. As larvas coletadas da camiseta foram criadas em laboratório e foi notado que as de *M. stabulans* apresentaram duas ondas de emergência. Quando da coleta, assumiu-se que a oviposição tivesse ocorrido no dia em que a camiseta havia sido encontrada correspondendo, com base no tempo de desenvolvimento desta espécie, a segunda onda de emergência. Ao calcular a data da possível oviposição da primeira onda de emergência foi percebido que a data coincidia com o dia em que ocorreu o esfaqueamento, ligando a camiseta encontrada ao local do crime.

Existem ainda reportados estudos onde foi possível determinar negligência aos cuidados de pessoas incapacitadas, como crianças ou idosos, resultando em morte das vítimas. O auxílio entomológico, nesses casos, possibilitou imputar dolo aos responsáveis pelo cuidado de tais pessoas (Benecke & Lessig, 2001; Benecke *et al.*, 2003).

De qualquer forma, a estimativa do IPM é uma das aplicações mais amplamente acessadas dentro da entomologia médico-legal utilizando-se, principalmente, do conhecimento da biologia de moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae), por serem estas as primeiras a colonizarem os cadáveres (Amendt *et al.*, 2004).

Para a estimativa de um IPM mais preciso é necessário levar em consideração:

- a. A identificação correta dos exemplares de insetos, pois a estimativa é baseada no tempo de desenvolvimento da espécie e uma identificação errônea pode acarretar erros graves neste cálculo (Catts & Goff, 1992);
- b. A sucessão de insetos que colonizam cadáveres, uma vez que cada estágio da decomposição atrai diferentes espécies de insetos e é variável em relação à localização geográfica ou sazonalidade (Carvalho *et al.*, 2004);
- c. A dispersão larval pós-alimentar na qual deve se considerar pupas localizadas a distâncias variáveis do cadáver para não deixar de considerar as larvas mais velhas que o abandonaram (Von Zuben, 2001);

- d. A análise toxicológica (área de estudo denominada entomotoxicologia) que pode, em alguns casos, alterar a taxa de desenvolvimento larval e, novamente, levar a estimativas errôneas (Bourel *et al.*, 1999).

Os insetos mais freqüentemente envolvidos na estimativa de IPM são os dípteros sendo este, também, o táxon mais utilizado para análises toxicológicas. As espécies predominantes pertencem às famílias Calliphoridae (varejeiras), Sarcophagidae (moscas da carne) e Muscidae (moscas domésticas). As moscas pertencentes a estas famílias são altamente móveis, resistentes ao vôo e tipicamente os primeiros insetos a chegarem num corpo em decomposição. Calliphoridae e Sarcophagidae podem chegar minutos após a morte, principalmente em climas tropicais e estudos de comunidades de carcaças tem demonstrado que muscóides geralmente atrasam a colonização até o período final do estágio de decomposição fresco ou até o início do estágio inchado (Goff & Lord, 1994).

Quando uma fonte apropriada é localizada, as moscas adultas começam a ovipor ou a se alimentar da fonte protéica para mais tarde ovipor. Em cadáveres sem feridas, os sítios preferenciais de oviposição serão, geralmente, os orifícios naturais do corpo (olhos, orelhas, nariz, boca e quando expostos ânus e genitálias). Os ferimentos ou sangue poderão fornecer sítios preferenciais de oviposição, embora essa atração seja variável conforme espécies de moscas envolvidas e grau de ferimento (Goff & Lord, 1994).

Os ovos das moscas varejeiras são pequenos (2-3 mm), alongados e de cor branco-amarelada. São tipicamente depositados em grandes aglomerados, podendo preencher os orifícios naturais ou locais de ferimentos. O estágio de ovos para as moscas varejeiras dura entre um a três dias quando eclodem larvas alongadas que possui na extremidade anterior um par de ganchos orais que são usados para alimentação e locomoção. A parte posterior possui um par de espiráculos pelo qual as larvas respiram. Elas crescem rapidamente passando por três estádios ou instares antes de alcançar o tamanho máximo (Goff & Lord, 1994; Greenberg & Kunich, 2002).

O primeiro estágio dura cerca de um dia quando ocorre a muda para o segundo estágio que, por sua vez, pode durar um ou dois dias quando muda para o terceiro estágio que dura por cinco ou seis dias quando param de se alimentar e entram e fase de pré-pupa (Erzinçlioglu, 2003).

Os ovos colocados num corpo eclodirão sincronizadamente resultando em uma massa de larvas que se movimentam sobre o corpo e se alimentam como um grupo. Esse comportamento resulta na disseminação de bactérias e produção de enzimas digestivas que possibilitam às larvas consumir maior parte do tecido mole de maneira altamente eficiente. O tamanho máximo das larvas é atingido num período que varia de dias até semanas, dependendo da espécie envolvida, número de larvas presente e condições ambientais. Após atingirem o tamanho máximo, as larvas sofrem uma mudança dramática no comportamento, param a alimentação e começam a migrar para fora da fonte alimentar. Essa migração é, geralmente, para uma área seca onde as larvas se enterram no substrato e começam a pupariar (Goff & Lord, 1994; Erzinçlioglu, 2003).

A pupariação em moscas é um processo complexo e seqüencial que transforma a cutícula branca e mole da larva num pupário escuro e rígido. Nesse pupário, a larva sofre uma reorganização celular onde ocorre o encurtamento e expansão dela, retração irreversível dos três segmentos anteriores e contração e estabilização da cutícula. O período requerido para essa transformação varia conforme a espécie da mosca e as condições ambientais, principalmente temperatura. O pupário pode permanecer intacto por anos ao redor do corpo em decomposição podendo fornecer informações valiosas até muito tempo depois de o corpo ter sido totalmente decomposto (Greenberg, 1991; Goff & Lord, 1994).

O ciclo de vida dos sarcófagídeos é similar ao das moscas varejeiras exceto pelo fato de que eles não ovipositam, mas depositam larvas de primeiro estágio no substrato escolhido como fonte. Esse processo exige que a larva em desenvolvimento seja mantida por mais tempo no corpo da fêmea do que um ovo. No entanto, o número de descendentes produzidos por fêmea é menor para essa família do que para califorídeos e muscídeos (Goff & Lord, 1994).

## **1.1 – Entomotoxicologia**

A Entomotoxicologia é um campo relativamente recente dentro da Entomologia Forense e que consiste na detecção e análise da interferência de substâncias tóxicas sobre a biologia de insetos que se alimentam de carcaças para auxiliar na identificação de



drogas e toxinas presentes em tecidos de corpos que tenham vindo a óbito por overdose (Goff & Lord, 1994; Introna *et al.*, 2001). Isto é especialmente útil quando não é possível coletar amostras de tecidos, sangue ou urina de cadáveres por estarem esqueletizados ou em estado avançado de putrefação, servindo os insetos como alternativa segura para tais análises (Pien *et al.*, 2004).

As larvas são relativamente fáceis de serem coletadas e mantidas em laboratório e também podem apresentar menos contaminantes que alguns tecidos comumente usados para análise toxicológica (Carvalho *et al.*, 2001; Gangliano-Candela & Aventaggiato, 2001).

No entanto, a utilização de insetos para análise toxicológica quantitativa pode não ser uma ferramenta confiável, pois existe uma série de fatores que influenciam na concentração da substância tais como, a redistribuição pós-morte das drogas no corpo humano, a estabilidade das drogas nos restos humanos, especialmente de onde as larvas são retiradas e a farmacocinética de cada substância a ser considerada nos imaturos (Campobasso *et al.*, 2004; Tracqui *et al.*, 2004). Por outro lado, a não detecção de uma substância em larvas que se alimentam da carcaça não implica, necessariamente, na ausência da mesma na fonte alimentar (Campobasso *et al.*, 2004).

Muitos estudos recentes têm detectado toxinas e substâncias controladas tanto no inseto como nos restos quitinizados recolhidos de vítimas em estágio avançado de decomposição (Goff & Lord, 2001). Nesses casos, os insetos têm sido homogeneizados e processados de maneira similar à realizada nos tecidos ou fluidos mais tradicionalmente analisados por diversos métodos, tais como imuno-radio ensaio (RIA), cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS), cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta performance associada à espectrometria de massa (HPLC/MS) e imunohistoquímica (IHQ) (Bourel *et al.*, 2001; Goff & Lord, 2001; Introna *et al.*, 2001).

## **1.2 - Aplicações da Entomotoxicologia**

### 1.2.1 - Detecção de Substâncias Tóxicas em Larvas de insetos necrófagos

O uso abusivo de fármacos prescritos para tratamento médico é de constante interesse no âmbito forense, pois pode determinar a tipificação da morte a esclarecer, ou seja, diferenciar se é um caso de homicídio ou suicídio.

Beyer *et al.* em 1980 sugeriram o emprego de insetos como fonte alternativa para detecção de drogas quando tiveram um caso no qual o corpo de uma mulher, de 22 anos, foi encontrado 14 dias após seu desaparecimento e o seu estado de decomposição era de quase completa esqueletização não havendo tecido humano suficiente para o exame toxicológico. No local havia um frasco vazio com capacidade para 100 comprimidos conforme indicado no rótulo que informava se tratar de fenobarbital (uma substância da classe dos barbitúricos utilizada terapeuticamente como anticonvulsivante) e cuja fabricação datava de dois dias antes da data do desaparecimento. Além disso, essa moça já apresentava histórico de doença mental e de diversas tentativas de suicídio. No local foram coletadas larvas da mosca *Cochliomyia macelaria* (F.) (Diptera: Calliphoridae) que foram utilizadas com sucesso como amostra para detecção de fenobarbital por cromatografia gasosa e confirmação por cromatografia de camada delgada.

Num caso de um homem de 49 anos, morto há 67 dias, em estado de completa putrefação, Kintz *et al.* (1990a), visando verificar a validade do emprego de insetos como fonte alternativa para exames toxicológicos, conseguiram detectar, por cromatografia líquida de alta pressão, nos tecidos do cadáver e em larvas de califórídeos coletados do cadáver a presença de cinco drogas: triazolam e oxazepam (pertencentes à classe dos benzodiazepínicos que estão entre os fármacos mais prescritos e têm ação anti-ansiolítica, anticonvulsivante, relaxante muscular e hipnótico), fenobarbital (um barbitúrico prescrito para tratamento de ataques de convulsão), alimemazine (um fármaco derivado das fenotiazinas com ação anti-prurido além de ação sedativa e anti-náuseas) e clomipramine (uma droga classificada como psicoativa de ação antidepressiva e anti-ansiolítica). Também observaram que os picos endógenos nos cromatogramas obtidos da extração dos imaturos eram menores que aqueles dos tecidos humanos.

Kintz *et al.* (1990b), num outro estudo de caso no qual um homem de 65 anos, desaparecido por seis meses foi encontrado morto e dele foram coletados insetos sarcosaprófagos da espécie *Piophilidae casei* (Piophilidae), detectaram, por HPLC,

bromazepam (um diazepínico) e levomepromazina (uma fenotiazina de poder sedativo). Neste caso não conseguiram estabelecer relação entre a concentração da droga presente no tecido humano e a existente nas larvas.

Em 1993, Goff *et al.* realizaram pesquisas experimentais com *Parasarcophaga ruficornis*, um sarcófago muito freqüente em corpos em decomposição no Havaí, criando-os em tecidos de coelhos nos quais havia sido previamente injetados amitriptilina e nortriptilina, fármacos com fins antidepressivos e que estão entre os mais utilizados em casos de suicídio na região de estudo considerada. A detecção feita por HPLC mostrou que o fármaco pode ser recuperado de forma eficiente ao se examinar amostras de todos os grupos tratados, confirmando que insetos são fontes alternativas confiáveis para a realização de exames toxicológicos.

Sadler *et al.* (1995) em estudos com larvas de *Calliphora vicina* criadas em tecidos humanos provenientes de três casos de suicídio por overdose de medicamentos prescritos conseguiram detectar, por HPLC, trazodone (um componente psicoativo de propriedades sedativa, ansiolítica e antidepressiva), trimipramine e amitriptilina (pertencentes à classe dos antidepressivos tricíclicos de propriedades sedativas e ansiolíticas) e temazepam (um benzodiazepínico) nas larvas em concentrações menores das existentes nos tecidos e observou que a concentração das drogas nas larvas diminuiu após oito dias, período associado à pupariação. Os níveis de drogas medidos devem indicar absorção nos tecidos larvais, pois uma droga será detectada na larva, quando sua taxa de absorção for maior do que a de excreção, e a droga atinge um nível na larva acima do limite de detecção do método analítico. Também constataram que larvas de *Calliphora vicina* têm uma capacidade de eliminar essas drogas, fato observado quando foram transferidas para uma dieta livre de drogas e após um curto período de tempo as drogas já tinham sido eliminadas.

Outra preocupação é o aumento do consumo de drogas de abuso, ou seja, aquelas que não são utilizadas com fins terapêuticos, mas sim como forma de entretenimento como a cocaína, a heroína, a maconha, o ecstasy, a metanfetamina entre outros.

Nolte e colaboradores, em 1992, ao coletarem larvas mortas de *Calliphora vicina* de um cadáver pertencente a um usuário de cocaína, de 29 anos, esqueletizado, conseguiram detectar nestes espécimes, por RIA e confirmado por GC/MS, a presença de

cocaína o que ajudou na determinação da causa da morte, uma vez que nem no local nem durante a necropsia foram encontrados vestígios que pudessem indicar alguma forma de morte violenta.

Goff *et al.* (1989; 1991) também observaram, através do método de imuno-rádio ensaio, presença de cocaína (uma droga alcalóide estimulante) e heroína (um derivado opióide com ação estimulante e analgésica), duas drogas com alta taxa de abuso nos EUA, em experimentos nos quais administraram essas drogas em coelhos e os tecidos destes foram servidos de substrato para desenvolvimento de larvas de *Boettcherisca peregrina*.

Introna *et al.* (1990) coletaram 40 fígados de corpos cujo exame toxicológico era positivo para opiáceos, ou seja, derivados do ópio com ação analgésica, e criaram, nestes tecidos, larvas de *Calliphora vicina*. As larvas de 3º estágio foram coletadas e analisadas por RIA e constataram que a concentração detectada nas larvas correspondia às concentrações de cada fígado no qual haviam sido criadas. Pien *et al.* (2004) também relataram relação proporcional de concentração de nordiazepam e/ou seu metabólito oxazepam (benzodiazepínico de efeito sedativo e relaxante), detectado por LC-MS/MS, em larvas de *Calliphora vicina* com a concentração da droga presente no substrato de alimentação, ou seja, conforme aumentou a concentração da droga na dieta, aumentou a concentração nas larvas.

No entanto, Gunn *et al.* (2006) ao detectarem morfina (um opióide usado no tratamento sintomático da dor e muitas vezes usado como droga de abuso), por HPLC, em larvas de *Calliphora stygia*, não constataram correlação entre as concentrações obtidas nos tecidos e a nas larvas, porém notaram que as concentrações de morfina obtidas nas larvas aumentavam conforme aumentava a concentração da droga no substrato do qual se alimentavam. Por sua vez, Tracqui *et al.* (2004) ao detectarem benzodiazepínicos, barbitúricos, antidepressivos, fenotiazinas, opiáceos entre outras em larvas coletadas de cadáveres e nos tecidos necropsiados, observaram que as concentrações de todas as larvas foram sempre menores que as dos tecidos, mas não conseguiram estabelecer correlação entre as concentrações nas larvas e nos tecidos humanos.

Goff *et al.* (1997), além de detectarem em imaturos da mosca sarcófagide, *Parasarcophaga ruficornis* (F.), por LC/MS, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), popularmente conhecido como ecstasy (uma droga alucinógena e estimulante que teve seu uso e produção aumentados nas últimas décadas), reportaram uma concentração maior nos pupários do que a detectada nos tecidos dos quais as larvas se alimentaram. O fato da deposição das toxinas na cutícula dos insetos como um método de excreção sugere outro mecanismo potencial para o acúmulo de material ingerido em tecidos mortos de insetos. No entanto, Goff e colaboradores (1992) não obtiveram um resultado positivo quando tentaram detectar metanfetamina e seu metabólito anfetamina por RIA em larvas do sarcófagídeo *Parasarcophaga ruficornis*, obtendo uma reação fraca uniforme em todos os grupos, o que pode ser resultado de uma reação inespecífica para outra substância que não a metanfetamina ou seu metabólito. Por isso concluíram que RIA não seria um bom método para detecção de metanfetamina quando for utilizada díptera como fonte alternativa para evitar resultados falso-positivos.

Bourel *et al.* (2001a) conseguiram detectar morfina, pelo método da imunohistoquímica, em larvas de *Calliphora vomitoria* na qual cada espécime positivo mostrou coloração específica da hemolinfa sob o tegumento enquanto os controles e as amostras negativas não apresentaram reação de coloração. A imunorreação mostrou-se mais forte no limite entre a exocutícula e a endocutícula, pois houve retenção da morfina devido à natureza hidrofóbica da epicutícula. Eles observaram que nas larvas de *C. vomitoria* morfina da hemolinfa é excretada por células epidermais e depositada próxima aos poros dos canais na matriz cuticular. Dessa maneira a cutícula atua como uma forma de depósito, quando a cutícula larval do terceiro estágio é esclerotizada para formar o pupário, a morfina depositada próximo aos poros dos canais é incorporada ao pupário.

Em 2001b, Bourel *et al.* também detectaram, por RIA, morfina em pupário e adultos de *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) e em pupas ressecadas de *Dermestes frischii* Kugelmann (Coleoptera: Dermestidae). As concentrações obtidas foram maiores nos 2º e 3º estágio enquanto quase nenhuma morfina foi detectada nos estágios de pré-pupa ou em pupariação. Ainda, a concentração detectada nos pupários foram maiores que nos adultos. Esses resultados confirmam que as larvas excretam a

droga no período pós-alimentação. No entanto, parece que enquanto a droga é excretada em órgãos larvais, uma quantidade de morfina é incluída na cutícula do pupário.

Campobasso *et al.* (2004) usaram tecidos obtidos de 18 corpos necropsiados relacionados com abuso de drogas. Nos tecidos e nas larvas foram detectados os agentes narcóticos mais comuns como opiáceos e cocaína, geralmente, associados com antidepressivos (cloripramine, amitriptilina, nortriptilina, levomepromazine e tioridazine) e benzodiazepínicos. Todas as drogas detectadas nos tecidos humanos foram detectadas nos imaturos de *Lucilia sericata*. Opiáceos foram detectados em 14 e em oito deles também foi detectada cocaína. Somente em um caso foi detectado fenobarbital associado aos opiáceos e à cocaína.

Neste trabalho, as concentrações de opiáceos no tecido hepático foram maiores às observadas nas larvas que também foi inferior das obtidas no sangue o que é consistente com a metabolização e eliminação das drogas durante o desenvolvimento larval. Em quatro casos, as larvas que ainda estavam se alimentando dos tecidos apresentaram concentrações maiores do que as observadas no sangue, provavelmente devido ao armazenamento de alimento no papo que se expande muito durante o período de alimentação e esvazia rapidamente após essa fase e o conteúdo estomacal é rapidamente digerido. Exceto pelos antidepressivos, todos os níveis de drogas detectados nas larvas pós-alimentação foram menores que nas larvas em fase de alimentação (Campobasso *et al.*, 2004).

### **1.2.2 - Acumulação biológica (Bioacúmulo)**

A acumulação biológica é a concentração progressiva de uma substância ao longo de uma cadeia alimentar, de forma a apresentar níveis mais elevados nos tecidos de organismos de níveis tróficos mais altos (ACIESP, 1997). O bioacúmulo de uma substância ocorre no organismo quando a absorção de tal substância é mais rápida do que sua excreção/eliminação.

Dentre as aplicações forenses podemos citar, além de crime ambiental, detecção de envenenamento por substância capaz de bioacumular e também a determinação de área geográfica de origem da vítima como no caso apresentado por Nuorteva (1977) onde moscas adultas coletadas de um corpo em decomposição de uma mulher não identificada

encontrada numa área rural de Inkoo, na Finlândia e analisadas para conteúdo de mercúrio foram usadas para determinar a região geográfica de origem da vítima. A baixa concentração de mercúrio nas moscas adultas indicou que aquela mulher era de uma área relativamente livre de poluição por mercúrio. Quando a vítima foi identificada, provou-se que ela era uma estudante de Turku, na Finlândia, uma cidade relativamente livre de poluição por mercúrio comprovando os achados entomológicos.

Nuorteva & Nuorteva (1982) também recuperaram mercúrio de larvas de várias espécies de moscas varejeiras (Calliphoridae) criadas em tecidos de peixes contendo concentrações conhecidas do metal pesado mostrou 'bioacúmulo' nas larvas em desenvolvimento conforme se alimentavam do tecido contaminado e este acúmulo parecia estar relacionado à presença do mercúrio na forma metilada. O mercúrio ingerido foi retido até o estágio de pupa e detectável nos adultos emergentes. Não foram observados efeitos adversos do bioacúmulo nem no adulto nem nas larvas, exceto por algumas vezes dificuldade em pupariação.

Como extensão a este estudo, adultos de besouros estafilínídeos, *Creophilus maxillosus* (Linnaeus) foram alimentados com larvas criadas em meio contendo mercúrio, e pôde-se observar acúmulo secundário nestes insetos sem efeitos adversos diferentemente do que ocorreu com besouros tenebrionídeos, *Tenebrio molitor* (L.) que apresentaram irregularidades no controle motor quando alimentados de larvas contaminadas por mercúrio. Além disso, observaram que larvas criadas em peixes coletados de uma região da Iugoslávia tinham um coeficiente de bioacúmulo menor do que as criadas em peixes coletados na Finlândia, pois a porcentagem da forma metilada do mercúrio é menor na Iugoslávia do que na Finlândia (Nuorteva & Nuorteva, 1982).

Sohal & Lamb (1977; 1979) também demonstraram o acúmulo de vários metais (entre eles cobre, ferro e zinco) e cálcio em tecidos de adultos de mosca doméstica, *Musca domestica* (L.) e nenhum efeito negativo foi associado ao bioacúmulo desses metais.

No entanto, Sadler *et al.* (1997) não conseguiram observar bioacúmulo de barbitúricos em larvas de moscas varejeiras, *Calliphora vicina*, criadas em dieta artificial. Além disso, observaram que até compostos quimicamente semelhantes pareceram ser processados diferentemente pelas larvas. Também preveniram quanto à interpretação

quantitativa dos achados entomotoxicológicos dado ao conhecimento limitado da maneira como drogas e toxinas são absorvidas pelos insetos imaturos.

### **1.2.3 - Atratividade na colonização**

A atratividade de colonização é um fator importante a ser considerado na Entomologia Forense principalmente nos casos envolvendo morte relacionada a envenenamento, pois este fator pode levar a conclusões errôneas quando estimado o IPM baseado no desenvolvimento larval.

Gunatilake & Goff (1989), por exemplo, detectaram o inseticida organofosforado Malathion em larvas de moscas de duas espécies de Calliphoridae, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *C. rufifacies* (Macquart) coletadas dos restos de um cadáver. É significativo que as larvas das duas espécies de *Chrysomya* indicavam um intervalo pós-morte de cinco dias enquanto a vítima tinha sido vista viva pela última vez oito dias antes de ser encontrado o corpo, o que pode indicar que a presença de Malathion teria atrasado a oviposição por um período de dias. Além disso, é esperada uma fauna maior de moscas varejeiras e besouros predadores nesse espaço de tempo (entre cinco e oito dias) numa área aberta no Havaí, o que sustenta a noção de que a ingestão de Malathion teve uma influência negativa na colonização do cadáver por insetos.

Diferentemente do observado com o malathion, Borges & Melo (1999), ao trabalhar com carcaças de ratos injetados com ivermectina antes de serem sacrificados e colocados em campo, observaram que não havia diferença significativa na atratividade das carcaças entre o grupo controle e o experimental, que se apresentaram semelhantes tanto quantitativamente quanto qualitativamente.

### **1.2.4 - Efeito das drogas sobre o desenvolvimento larval**

Ao fornecer uma estimativa de IPM, especialmente entre as primeiras duas e quatro semanas de decomposição, assume-se que o inseto desenvolverá em taxas previsíveis, dadas certas condições ambientais, sendo necessário considerar o efeito das drogas no desenvolvimento destes insetos (Goff & Lord, 2001).

Estudos sobre a influência das drogas no desenvolvimento dos insetos podem ser feitos através de dietas artificiais, acrescentando concentrações conhecidas de droga ou



toxina ou, ainda, serem administradas oralmente ou por infusão num modelo animal vivo, sendo os tecidos de tal vertebrado utilizados como fonte de alimento para as larvas de insetos, permitindo que tais drogas ou toxinas sejam metabolizadas pelo vertebrado antes da ingestão pelo inseto (Goff & Lord, 2001).

Goff *et al.* (1989) em seus estudos sobre o efeito da cocaína no desenvolvimento de larvas do sarcófago *Boettcherisca peregrina* (Rodineau-Desvoidy) em fígados de coelhos previamente tratados com doses conhecidas da droga, observaram dois padrões de desenvolvimento: as colônias controle e dose subletal (1/2xDL) tiveram aproximadamente a mesma taxa de desenvolvimento enquanto as colônias de dose letal (1xDL) e duas vezes a dose letal (2xDL) desenvolveram-se mais rápido, ocorrendo pupariação primeiro nestes dois grupos.

Carvalho (2004) também estudou o efeito da cocaína no desenvolvimento larval de *Chrysomya albiceps* e *C. putoria*, duas espécies de interesse forense no Brasil, onde observou que na 6<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> hora de observação e pesagem, as larvas controle de *C. albiceps* se desenvolveram mais rápido que as expostas à droga e o inverso ocorreu com as larvas de *C. putoria*. Às 24 horas de experimento, o desenvolvimento de *C. albiceps* do grupo controle foi maior do que as expostas à cocaína, e nenhuma diferença significativa foi observada para *C. putoria*. 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. Também foi constatado que 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 h. As diferenças entre o tempo de emergência dos adultos foram significativas para ambas as espécies expostas à droga, sendo de aproximadamente 60 h em relação ao controle.

Um caso interessante relacionado ao efeito da cocaína no desenvolvimento de imaturos é relatado por Lord (1990) onde o corpo de uma mulher branca, de aproximadamente 20 anos, foi descoberto próximo a uma região de pinheiros em Spokane, Washington – EUA. O cadáver estava em fase inicial do estágio inchado e apresentava uma grande população de larvas localizadas no rosto e parte superior do tronco. As larvas foram coletadas, criadas até adultos, identificadas e classificadas em

três classes, de acordo com o tamanho: entre seis e nove mm de comprimento que seria correspondente a um IPM de cerca de sete dias; menores que seis mm que poderia indicar que moscas teriam oviposto em diferentes tempos na carcaça e uma única larva de 17,7 mm recuperada da região naso-faríngea o que indicaria um período de IPM de aproximadamente três semanas o que não era possível conforme outros dados existentes sobre o caso. Foi suposto que a larva poderia ter migrado de outro cadáver, porém não foi encontrado nenhum outro corpo na região. Uma explicação alternativa foi a de que o crescimento da larva foi aumentado, pois estava localizado numa região nasal que continha alguma concentração de cocaína. Uma investigação subsequente revelou que a vítima era usuária de cocaína e tinha sido vista utilizando a droga antes de morrer.

Goff *et al.* (1991), trabalhando com *Boettcherisca peregrina*, investigaram o efeito da heroína, um opióide de uso recreativo muito freqüente nos EUA, no seu desenvolvimento larval e os resultados apontaram para um desenvolvimento mais rápido dos grupos experimentais do que os grupos controles além da produção de larvas maiores em todos os grupos tratados. O tempo de pupa durou mais para todas as colônias experimentais e pareceu ser proporcional à quantidade de droga administrada. O estudo demonstrou que um erro de até 29 h ocorre quando a estimativa de IPM é baseada no desenvolvimento larval cujo substrato contenha heroína e entre 18 e 38 h se baseado na duração do estágio de pupa.

Do mesmo modo, Karbouche *et al.* (2008), usando fígados de porcos tratados com solução contendo concentrações conhecidas de codeína, verificaram que larvas de *Lucilia sericata* desenvolviam mais rápido nos grupos tratados do que no controle e que diferença significativa no peso corporal larval também foi verificada entre os grupos experimentais (mais pesados) e o grupo controle. Em termos quantitativos não foi encontrada relação entre as concentrações existentes nos fígados e as obtidas nas larvas.

Diferentemente do observado por Bourel *et al.* (1999) que utilizaram coelhos infundidos com hidrocloreto de morfina, um derivado opióide de poder analgésico, em três concentrações diferentes e observaram diferença no comprimento das larvas de *Lucilia sericata* criadas em tecidos experimentais em relação ao controle nos tempos de 41 h e 69 h e, depois, nos tempos de 91, 116 e 140 h, no entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos controle e de 25 mg/kg no tempo de 69 h, nem entre as larvas

dos grupos 12,5 mg/kg e 50 mg/kg nos tempos 69, 116 e 140 h. O início do estágio de pré-pupa ocorreu mais tardiamente no grupo 12,5 mg/kg. Quanto ao peso houve um aumento até o estágio pré-pupa quando iniciou decréscimo até estabilizar na fase de pupa. Observaram ainda que a taxa de desenvolvimento do grupo experimental de maior concentração foi mais devagar que a dos demais grupos.

No entanto, Grella & Thyssen (2008), em trabalho com larvas do califorídeo *Chrysomya megacephala*, criadas em dieta artificial acrescidas de Cloridrato de oxycodone, um opióide analgésico semi-sintético similar à morfina, muito prescrito para tratamento de dores moderadas a dores intensas, não observaram diferenças significativas no desenvolvimento entre os grupos controle e os grupos experimentais, sugerindo a não metabolização dessas drogas pelas larvas nem seu bioacúmulo. Além disso, a não influência da droga se confirmou com uma alta taxa de viabilidade de adultos para todos os grupos.

Goff *et al.* (1993), testaram o antidepressivo amitriptilina em *P. ruficornis* e não observaram diferença significativa na taxa de desenvolvimento em relação às concentrações administradas. A duração do período pós-alimentação foi maior nos grupos tratados assim como a mortalidade larval. O período de estágio de pupa também foi maior nos grupos tratados com concentrações maiores que uma dose letal.

Goff e colaboradores (1994) pesquisaram o efeito da fenciclidina, uma droga de abuso comum nos EUA (denominada PCP) e também utilizada como tranqüilizante veterinário, no desenvolvimento de imaturos do sarcófagídeo *P. ruficornis* e não observaram diferenças significativas na taxa de desenvolvimento total dos insetos, porém observaram uma diferença na duração do período pós-alimentar quando as larvas dos grupos experimentais desenvolveram mais rapidamente que as do controle resultando num intervalo entre três e 17 h menor para os tratados.

Em estudos com metanfetamina (um derivado anfetamínico utilizado como agente aneroxígeno ou também como droga recreativa na forma de cristais denominada *ice*) realizados por Goff *et al.* (1992) houve aumento da taxa de desenvolvimento do sarcófagídeo *Parasarcophaga ruficornis* para as colônias alimentadas com tecidos contendo uma dose letal (1xDL) e duas vezes a dose letal (2xDL) quando comparadas aos

grupos com meia dose letal (1/2xDL) e controle, que desenvolveram na mesma taxa. A mortalidade de pupas foi maior nas colônias 1/2xDL e 1xDL.

Carvalho (2004) estudou o efeito de outro derivado anfetamínico muito utilizado como inibidor de apetite no Brasil, a anfepramona, em larvas de *Chrysomya albiceps* e *C. putoria* onde verificou que esta droga não exerce efeitos significativos no desenvolvimento de imaturo de *C. albiceps*. No entanto, 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. Também verificou que para *C. putoria*, as diferenças no tempo de pupariação foram significativas, com as larvas dos grupos experimentais empupando mais rapidamente que as controle. Foi observado que o tempo de emergência dos adultos das duas espécies cujas larvas 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.

Goff *et al.* (1997), em trabalho sobre o efeito de outro derivado anfetamínico, o MDMA (principal componente do ecstasy), sobre o desenvolvimento de imaturos de *Parasarcophaga ruficornis* também observaram que entre as horas 24 e 114 de desenvolvimento, os grupos controle e 2xDL desenvolveram mais rápido que os demais grupos e que a mortalidade larval e de pupa foi maior nas colônias controle e 1/2xDL de MDMA e menor nas colônias 2xDL. E quando considerado o tempo de desenvolvimento total (larva-adulto) o do grupo 2xDL foi menor.

Num trabalho com ivermectina, Borges & Melo (1999) observaram que o desenvolvimento das larvas foi retardado e um número menor de larvas conseguiu completar o desenvolvimento na carcaça tratada com o fármaco.

Em trabalho usando como animais modelo o coelho, Carvalho *et al.* (2001), estudou o efeito do diazepam (um benzodiazepínico muito prescrito por médicos) no desenvolvimento de larvas de *Chrysomya albiceps* e *C. putoria*, e constatou que larvas do grupo controle se desenvolveram mais devagar que os grupos experimentais, além das larvas dos grupos experimentais pesarem mais que as do controle. Pien *et al.* (2004) também constataram que as larvas de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) dos

grupos experimentais eram mais pesadas que o dos grupos controle quando realizaram experimentos utilizando três concentrações de nordiazepam (um benzodiazepínico de efeito sedativo e relaxante e o principal metabólito do diazepam) em larvas e pupários de *Calliphora vicina*. Observações diárias de larvas em estágio pós-alimentar, e a detecção do metabólito do nordiazepam, o oxazepam, após o segundo dia de experimento, sugerem que houve metabolização e acúmulo do fármaco estudado. Porém, no geral, todos os grupos (experimentais e controle) desenvolveram na mesma taxa.

Musvasva *et al.* (2001) num trabalho com larvas de *Sarcophaga tibialis* (Diptera: Sarcophagidae) criadas em substrato contendo sódio-metohexital (barbitúrico e depressor metabólico) ou hidrocortisona (esteróide comumente usado para tratamento de inflamações e estimulante metabólico) em diferentes concentrações perceberam que a presença de sódio-metohexital ou seus metabólitos retardou significativamente o desenvolvimento larval de *S. tibialis*, principalmente quando em pequenas doses bem como a hidrocortisona e seus produtos de quebra, onde também foi observado atraso significativo no desenvolvimento larval. Nos dois casos o estágio de pupa pareceu ter uma tendência oposta ao do estágio larval.

O'Brien & Turner (2004) verificaram que larvas de *Calliphora vicina* criadas em substrato contendo paracetamol acelera suavemente o desenvolvimento larval durante os dias dois e quatro, o que pode resultar numa diferença de, aproximadamente, 12 h na estimativa do IPM neste intervalo. Porém, de forma geral, nenhuma diferença significativa foi observada no desenvolvimento larval entre os grupos experimentais e o grupo controle.

Ferrari *et al.* (2008) verificaram, ao trabalhar com larvas de *Chrysomya albiceps* criadas em dieta artificial acrescida do hormônio testosterona, que as larvas do grupo experimental apresentaram média do peso corporal cinco vezes maior do que a média de peso corporal das larvas do grupo controle (6,0 mg e 1,2 mg por larva, respectivamente) e que a diferença verificada no tamanho era bastante nítida.

Grella *et al.* (2007) trabalharam com dietas artificiais acrescidas de escopolamina, uma droga muito usada como analgésico (princípio ativo do Buscopam), onde criaram imaturos de *Chrysomya putoria*, e puderam observar que os grupos controle e tratamento 0,25xDL, tinham peso corporal maior do que os demais grupos experimentais e que o

grupo 1xDL teve seu tempo de desenvolvimento larval aumentado em relação aos demais grupos. Além disso, o grupo tratado com 2xDL teve 100% de mortalidade no 2º estágio larval, ou seja, não completou seu desenvolvimento. A sobrevivência observada mostrou-se menor conforme o aumento de concentração da droga na dieta.

Similarmente, Oliveira *et al.* (2009) trabalharam com buscopam, cujo princípio ativo é o brometo de butilescopolamina, acrescido em dieta artificial que foi usado como fonte de alimento para imaturos de *C. megacephala*, onde observaram uma diferença significativa no tempo de desenvolvimento larval na diferentes concentrações formando um gradiente de diminuição de peso conforme aumentava a concentração da droga na dieta. O tamanho larval também foi diferente sendo que quanto maior a concentração da droga menor era a larva. Também observaram que quanto maior a concentração da droga maior era a mortalidade principalmente nos estágios larvais. Além disso, a concentração de uma dose letal de rato no substrato utilizado como fonte de alimento para as larvas ocasionou um atraso de 54 h no desenvolvimento larval, o que poderia alterar a estimativa de IPM num caso envolvendo o uso dessa droga prévio à morte.

Um resumo dos trabalhos relacionados à entomotoxicologia pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resumo dos trabalhos sobre entomotoxicologia

Classe do Agente Tóxico estudado	Agente tóxico	Espécie	Método de detecção	Efeitos observados	Autores do Trabalho
Barbitúricos	Fenobarbital	<i>Cochliomyia macelaria</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC/MS e TLC		Beyer <i>et al.</i> , 1980
		Calliphoridae (Diptera)	HPLC	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos	Kintz <i>et al.</i> , 1990a
		Calliphoridae (Diptera)	GC/MS ou LC/MS	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos e nenhuma relação entre concentrações nas larvas com a nos tecidos	Tracqui <i>et al.</i> , 2004
	Amobarbital, Fenobarbital, Tiopental, Barbital	<i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae)	HPLC	Não observou bioacúmulo	Sadler <i>et al.</i> , 1997
	Sódio-metohexital	<i>Sarcophaga tibialis</i> (Diptera: Sarcophagidae)		Retardo significativo do desenvolvimento larval	Musvasva <i>et al.</i> , 2001
Benzodiazepínicos	triazolam e oxazepam	Calliphoridae (Diptera)	HPLC	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos	Kintz <i>et al.</i> , 1990a
	bromazepam	<i>Piophilidae casei</i> (Piophilidae)		Nenhuma relação entre concentrações nas larvas com a nos tecidos	Kintz <i>et al.</i> , 1990b
	temazepam	<i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae)		Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos	Sadler <i>et al.</i> , 1995
	Nordiazepam	<i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae)	LC-MS/MS	Relação proporcional entre concentração nas larvas e nos tecidos humanos; larvas mais pesadas que as do controle	Pien <i>et al.</i> , 2004
		Calliphoridae (Diptera)	GC/MS ou LC/MS	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos e nenhuma relação entre concentrações nas larvas e nos tecidos	Tracqui <i>et al.</i> , 2004
		<i>Lucilia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC/MS	Níveis de drogas detectados nas larvas pós-alimentação menores que nas em alimentação	Campobasso <i>et al.</i> , 2004
	Diazepam	<i>Chrysomya albiceps</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC/MS	Aceleração do desenvolvimento larval; larvas mais pesadas que as do controle	Carvalho <i>et al.</i> , 2001
<i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae)					

Tabela 1. Continuação

Classe do Agente Tóxico estudado	Agente tóxico	Espécie	Método de detecção	Efeitos observados	Autores do Trabalho
Fenotiazina	Alimemazine	Calliphoridae (Diptera)	HPLC	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos	Kintz <i>et al.</i> , 1990a
	levomepromazina	<i>Piophilidae casei</i> (Diptera: Piophilidae)		Nenhuma relação entre concentrações nas larvas e nos tecidos	Kintz <i>et al.</i> , 1990b
		Calliphoridae (Diptera)	GC/MS ou LC/MS	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos e nenhuma relação entre concentrações nas larvas e nos tecidos	Tracqui <i>et al.</i> , 2004
	levomepromazine e tioridazine	<i>Lucilia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC/MS	Níveis de drogas detectados nas larvas pós-alimentação menores que nas em alimentação	Campobasso <i>et al.</i> , 2004
Antidepressivo	clomipramine	Calliphoridae (Diptera)	HPLC	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos	Kintz <i>et al.</i> , 1990a
	amitriptilina e nortriptilina	<i>Parasarcophaga ruficornis</i> (Diptera: Sarcophagidae)		Nenhuma diferença significativa foi observada na taxa de desenvolvimento; a duração do período pós-alimentação e pupa maior assim como a mortalidade larval	Goff <i>et al.</i> , 1993
	trazodone, trimipramine e amitriptilina	<i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae)		Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos	Sadler <i>et al.</i> , 1995
		Calliphoridae (Diptera)	GC/MS ou LC/MS	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos e nenhuma relação entre concentrações nas larvas e nos tecidos	Tracqui <i>et al.</i> , 2004
	Cloripramine, amitriptilina, nortriptilina	<i>Lucilia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC/MS	Níveis de drogas detectados nas larvas pós-alimentação menores que nas em alimentação	Campobasso <i>et al.</i> , 2004



Tabela 1. Continuação

Classe do Agente Tóxico estudado	Agente tóxico	Espécie	Método de detecção	Efeitos observados	Autores do Trabalho
Analgésico	Paracetamol	<i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae)		Aceleração do desenvolvimento larval durante os dias 2 – 4 resultando em diferença de, aproximadamente, 12 h	O'Brien & Turner, 2004
	Escopolamina	<i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae)		Retardo do desenvolvimento de grupos com maior concentração.	Grella <i>et al.</i> , 2007
	Buscopam	<i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae)		Retardo do desenvolvimento de grupos com maior concentração.	Oliveira <i>et al.</i> , 2009
Hormônio	Hidrocortisona	<i>Sarcophaga tibialis</i> (Diptera: Sarcophagidae)		Retardo significativamente o desenvolvimento larval	Musvasva <i>et al.</i> , 2001
	Testosterona	<i>Chrysomya albiceps</i> (Diptera: Calliphoridae)		Média do peso corporal cinco vezes maior do que a do grupo controle	Ferrari <i>et al.</i> , 2008
Estimulante	Cocaína	<i>Boettcherisca peregrine</i>	RIA	Aceleração do desenvolvimento larval quando em alta concentração	Goff <i>et al.</i> , 1989
		<i>Chrysomya albiceps</i> (Diptera: Calliphoridae)		Aceleração do período de pupariação resultando em diferença de, aproximadamente, 13 h	Carvalho, 2004
		<i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae)			

Classe do Agente Tóxico estudado	Agente tóxico	Espécie	Método de detecção	Efeitos observados	Autores do Trabalho
Opióide	Heroína	<i>Boettcherisca peregrina</i>	RIA	Aceleração do desenvolvimento e larvas maiores que a do grupo controle	Goff <i>et al.</i> , 1991
		<i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae)	RIA	Concentração nas larvas correspondente à concentração nos tecidos	Introna <i>et al.</i> , 1990
		Calliphoridae (Diptera)	GC/MS ou LC/MS	Concentração da droga nas larvas menor do que a dos tecidos e nenhuma relação entre concentrações nas larvas e nos tecidos	Tracqui <i>et al.</i> , 2004
		<i>Lucilia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC/MS	Concentrações no tecido maiores que a das larvas	Campobasso <i>et al.</i> , 2004
	Morfina	<i>Calliphora stygia</i> (Diptera: Calliphoridae)	HPLC	Relação de proporcionalidade entre a concentração das larvas com a dos tecidos	Gunn <i>et al.</i> , 2006
		<i>Calliphora vomitoria</i> (Diptera: Calliphoridae)	IHQ	Deposição da droga na cutícula	Bourel <i>et al.</i> , 2001a
		<i>Lucilia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)	RIA	Deposição da droga na cutícula, retardo na taxa de desenvolvimento larval do grupo experimental de maior concentração	Bourel <i>et al.</i> , 1999
		<i>Dermestes frischi</i> (Coleoptera: Dermestidae)		Deposição da droga na cutícula	Bourel <i>et al.</i> , 2001b
	Codeína	<i>Lucilia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)		Aceleração do desenvolvimento e larvas maiores que a do grupo controle	Karbouche <i>et al.</i> , 2008
	Cloridrato de oxycodone	<i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae)		Nenhuma diferença significativa foi observada quanto à taxa de desenvolvimento larval	Grella & Thyssen, 2008

Tabela 1. Continuação

Classe do Agente Tóxico estudado	Agente tóxico	Espécie	Método de detecção	Efeitos observados	Autores do Trabalho
Alucinógenos	MDMA (ecstasy)	<i>Parasarcophaga ruficornis</i> (Diptera: Sarcophagidae)	LC/MS	Concentração maior detectada em pupários; Aceleração do desenvolvimento no grupo com maior concentração	Goff <i>et al.</i> , 1997
	Metanfetamina (ice)		RIA	Aceleração do desenvolvimento larval; RIA ineficiente para detecção desta droga em larvas	Goff <i>et al.</i> , 1992
	Fenciclidina (PCP)		GC/MS	Aceleração de 3-17 h na fase pós-alimentar	Goff <i>et al.</i> , 1994
Derivado anfetamínico	Anfepramona	<i>Chrysomya albiceps</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC/MS	Não houve diferença significativa	Carvalho, 2004
		<i>Chrysomya putoria</i> (Diptera: Calliphoridae)		Aceleração do desenvolvimento, de aproximadamente, 48 h	
Inseticidas	Malathion	<i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae)	GC	Influência negativa na colonização do cadáver por insetos	Gunatilake e Goff, 1989
		<i>Chrysomya rufifacies</i> (Diptera: Calliphoridae)			
Vermífugo	Ivermectina	Artrópodes sarcosaprófagos		Sem efeito na colonização do cadáver por insetos; Retardo do desenvolvimento das larvas e menos larvas completaram o desenvolvimento	Borges & Melo, 1999
Metais pesados	Mercúrio	Calliphoridae (Diptera)		Bioacúmulo nas larvas relacionado à presença do mercúrio na forma metilada; sem efeitos adversos	Nuorteva & Nuorteva, 1982
		<i>Creophilus maxillosus</i> (Coleoptera: Staphilinidae)		Bioacúmulo secundário e sem efeitos adversos	
		<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)		Bioacúmulo secundário; apresentaram irregularidades no controle motor	
	cobre, ferro e zinco	<i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae)		Bioacúmulo e sem efeitos adversos	Sohal & Lamb, 1977; 1979

### 1.3 - Derivados Anfetamínicos

O termo “anfetamínicos” refere-se às substâncias compostas pela anfetamina e seus derivados que, quimicamente, apresentam o esqueleto básico da  $\beta$ -fenetilamina e atuam como aminas simpatomiméticas. As drogas derivadas da anfetamina foram criadas por laboratórios a partir de diversas substituições na estrutura básica da anfetamina conforme mostra a Figura 1 (Chasin & Salvadori, 1996; Passagli & Carvalho, 2007).

A primeira anfetamina foi sintetizada em 1887, sendo usada com fins terapêuticos a partir da década de 1920 quando foram descobertas suas propriedades estimulantes centrais e supressoras de apetite sendo assim utilizadas para o tratamento de obesidade, narcolepsia, hipotensão e síndrome da hiperatividade. Já na Segunda Guerra Mundial foram usadas pelos militares com o intuito de retardar o aparecimento de fadiga nos soldados. Atualmente, estudantes e motoristas de caminhão utilizam, o popularmente denominado como “rebite”, como recurso para se manter acordados e alertas por maiores períodos de tempo e como forma de aumentar a capacidade de concentração e raciocínio (Chasin & Salvadori, 1996; Passagli & Carvalho, 2007).

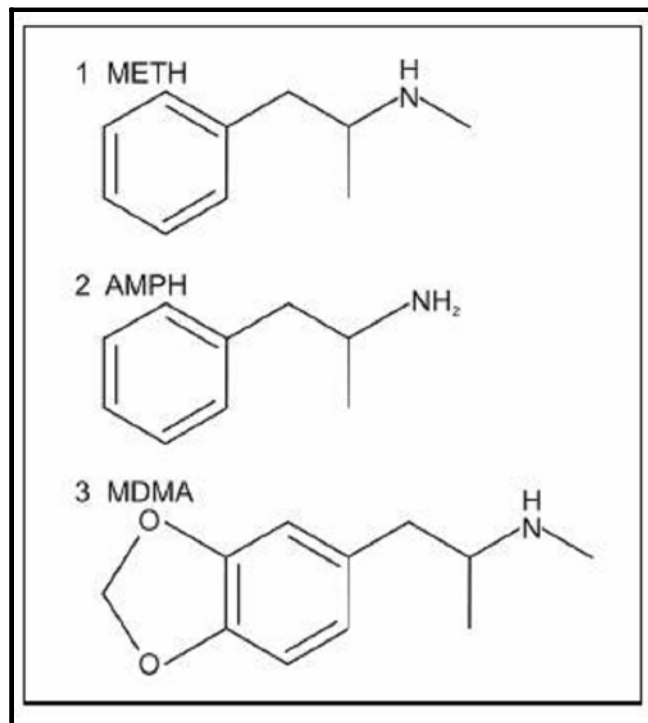
Dentre os estimulantes, o abuso de anfetamínicos constitui um sério problema na escala mundial uma vez que por pertencerem a uma classe de compostos não catecolamínicos que produz uma acentuada ação estimulante no sistema nervoso central (SNC), mais persistente do que a cocaína, os tornam mais atrativos como fármacos de abuso. Por aumentar o estado de alerta físico e mental, os anfetamínicos são muito populares entre os indivíduos que necessitam de prolongada vigília (Chasin & Salvadori, 1996).

No Brasil, a anfetamina e seus derivados, utilizados como anorexígenos ou nos distúrbios de hiperatividade em crianças, têm sua comercialização sujeita às exigências das portarias 27 e 28 de 1986 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos (DIMED), enquanto os utilizados em formulações como descongestionantes nasais como a nazafolina, efedrina e fenilefrina são de venda livre. Os anfetamínicos com propriedades alucinógenas são de uso proscrito em nosso país (Chasin & Salvadori, 1996). Segundo relatórios do *International Narcotic Control Board* (INCB), o Brasil está entre os quatro países com maior consumo de inibidores de

apetite do mundo. Parte desse uso pode ser explicada pelo grande apelo social à utilização desses fármacos para o controle da obesidade.

Silva & Yonamine (2004) fizeram um levantamento no Brasil onde constataram que usuários de anfetamina foram encontrados nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste e que 50% das amostras de urina coletadas eram de companhias de transportes rodoviários o que poderia explicar os resultados positivos encontrados neste estudo devido ao uso do femporex para manter o estado de alerta por mais tempo.

Devido às propriedades estimulantes da atividade motora, os anfetamínicos eram muito utilizados em competições esportivas, como agentes de dopagem, visando melhorar o desempenho em questões de minutos e, por isso, muito utilizados nas décadas de 60 e 70. Atualmente, devido às metodologias mais sensíveis para detecção dessas substâncias no controle da dopagem houve uma substancial diminuição no abuso desses agentes nos esportes (Chasin & Salvadori, 1996).



**Figura 1.** Estruturas de compostos análogos à anfetamina: METH = metanfetamina, AMPH = d-anfetamina e MDMA = ecstasy (Barr *et al.*, 2006).

Os anfetamínicos disponíveis no mercado ilícito, freqüentemente, são comercializados em pequenas cápsulas de gelatinas ou comprimidos. Em alguns países esses derivados encontram-se como bases livres em veículo oleoso. Praticamente todas as misturas ilícitas contêm os anfetamínicos na forma de cloridrato, sulfato ou fosfato e se encontram como pós, comprimidos ou cápsulas (Chasin & Salvadori, 1996). Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas de 2008 (*World Drug Report – WDR*), a apreensão de derivados anfetamínicos em 2006 voltou a crescer sendo similar ao pico de apreensões realizadas em 2000, sendo que a apreensão de metanfetamina correspondeu a 33,1% do total e ecstasy a 9,4%.

### **1.3.1 - Toxicocinética**

A anfetamina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal. Após administração de 10 a 15 mg, o pico de concentração plasmática ocorre entre uma e 2 horas, e a absorção geralmente se completa entre quatro e 6 horas. Os anfetamínicos são amplamente distribuídos e as altas concentrações cerebrais parecem estar relacionadas a transportes especiais de penetração na barreira hematencefálica, que ocorrem concomitantemente à difusão passiva, o que explica a rápida velocidade de penetração da anfetamina no cérebro (Chasin & Salvadori, 1996).

Os compostos anfetamínicos são biotransformados, primordialmente no fígado, tendo como vias principais a hidroxilação aromática, a  $\beta$ -hidroxilação na cadeia lateral, desaminação oxidativa e N-desalquilação (Chasin & Salvadori, 1996). Os derivados inativos são excretados pela urina, pequena parte é convertida em norefedrina e outra parte (cerca de 30%) é excretada pelos rins sem alterações em 24 horas (Chasin & Salvadori, 1996; Passagli & Carvalho, 2007).

### **1.3.2 - Toxicodinâmica**

Muitos autores creditam as ações dos anfetamínicos à similaridade estrutural com a dopamina e norepinefrina podendo, assim, funcionar como falsos neurotransmissores. O mecanismo de ação mais provável é a liberação direta dos neurotransmissores das vesículas sinápticas, bem como a inibição da recaptação dos mesmos, com conseqüente aumento na concentração sináptica, além de serem

inibidores da MAO, enzima responsável pela oxidação da norepinefrina e serotonina (Chasin & Salvadori, 1996).

### **1.3.3 - Dependência e Tolerância**

Os anfetamínicos, em particular a anfetamina e a metanfetamina, apresentam um alto potencial de abuso e conseqüentemente propiciam o desenvolvimento de farmacodependência (Chasin & Salvadori, 1996).

Assim como ocorre com a cocaína, os mecanismos envolvidos nas propriedades de reforço dos anfetamínicos parecem se relacionar com o aumento extracelular de dopamina no núcleo acumens (área límbica) e núcleo caudado (área subcortical motora) (Chasin & Salvadori, 1996).

Embora esteja comprovada a dependência dos anfetamínicos, há controvérsias quanto ao desenvolvimento ou não da neuroadaptação. A síndrome que ocorre após a retirada do fármaco, após uso crônico, é caracterizada por fadiga, hiperfagia, apatia, letargia, ansiedade, distúrbios do sono e depressão, que pode ser profunda e de longa duração (Chasin & Salvadori, 1996).

A tolerância aos efeitos subjetivos e anorexígenos dos anfetamínicos é rápida e há taquifilaxia. Doses normalmente utilizadas, seja nas prescrições médicas ou na auto-administração, estão entre 20-40 mg, via oral, diariamente e é freqüentemente aumentada a valores situados entre 50-150 mg por essa via (Chasin & Salvadori, 1996).

Com a intenção de obter ou prolongar as sensações prazerosas, obtidas após a injeção de fármacos de abuso, usuários crônicos utilizam doses repetidas de anfetamina ou metanfetamina que atingem 1 g por episódio ou 5-15 g por dia, sendo que a DL50 da anfetamina é de 20-25 mg/kg e estudos com animais sugerem que doses de 5 mg/kg podem causar a morte, sendo que a menor dose letal relatada é de 1,5 mg/kg (Chasin & Salvadori, 1996).

### **1.3.4 - Metanfetamina**

A metanfetamina é um fármaco mais potente que a *d*-anfetamina e é facilmente sintetizada em laboratórios clandestinos através de reagentes químicos facilmente obtidos. Como droga de abuso, a metanfetamina também é conhecida pelos nomes de

*speed, cristal, crank, meth, go* e *ice* (Figura 2). O cloridrato de metanfetamina é usado por via oral, por injeção intravenosa e por via intranasal (Yonamine, 2004). A metanfetamina, utilizada com fins recreacionais e com alto potencial de abuso, é motivo de preocupação devido ao seu consumo via respiratória na sua forma básica, denominada popularmente como *ice*, apresentar maior ação e ter os efeitos mais prolongados (Chasin & Salvadori, 1996; Passagli & Carvalho, 2007).



**Figura 2.** Diversas formas de metanfetamina: em comprimidos (rebite) para serem ingeridos oralmente, em cristais (*crystal, ice*) e em pasta para serem usados por via respiratória.

Muitos indivíduos abusam simultaneamente do emprego de barbitúricos, ansiolíticos e álcool, além dos próprios estimulantes, tanto para combater a insônia como a agitação que experimentam. Os barbitúricos, de modo particular, são utilizados em combinação com os anfetamínicos para aumentar os efeitos subjetivos dos estimulantes (Chasin & Salvadori, 1996).

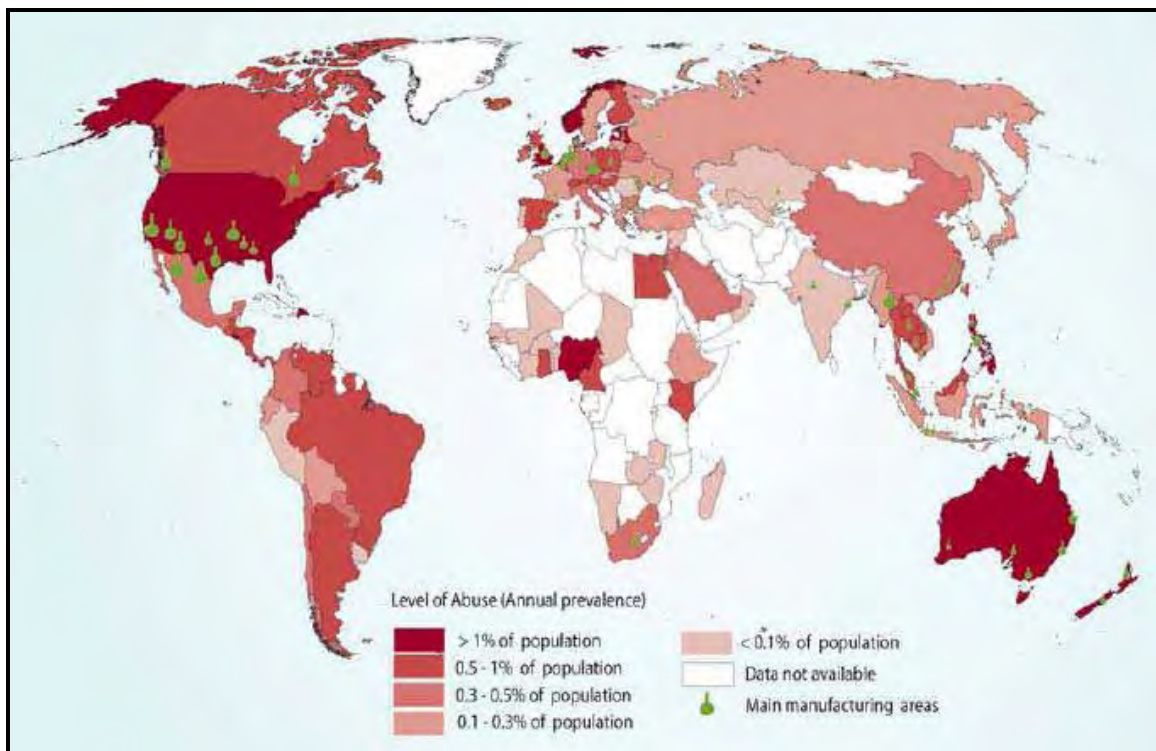
Segundo dados do *Drug Enforcement Administration* (DEA), na década de 1960, nos EUA, os produtos farmacêuticos de metanfetamina estavam disponíveis e eram altamente abusados. Com a mudança na década de 1970 para o quadro de substâncias controladas houve uma redução no abuso dessa droga. Porém nos anos 1980 o abuso da metanfetamina ressurgiu e hoje é considerada uma droga de alto potencial de abuso, ficando atrás somente de álcool e maconha nos estados do oeste e meio-oeste.

De acordo com o Levantamento Nacional sobre Droga e Saúde (*National Survey on Drug Use and Health*) de 2004, aproximadamente 11,7 milhões de americanos maiores de 12 anos já tinham experimentado metanfetamina pelo menos uma vez na vida, o que representa 4,9% da população dessa faixa etária. Aproximadamente 1,4



milhões (0,6%) reportaram usar metanfetamina no último ano prévio à pesquisa e 583.000 (0,2%) reportaram uso no último mês prévio à pesquisa. A UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*) acredita que no mundo existam entre 15 e 16 milhões de usuários de metanfetamina e o Brasil está enquadrado como o país com a maior taxa de abuso na América do Sul segundo o *WDR 2008* (Figura 3), que também reportou que na América do Sul houve um aumento no número de usuários de anfetamínicos que entram nos países, em sua maior parte, de forma legal como substância prescrita.

Em 2006, segundo o *WDR 2008*, a quantidade de metanfetamina apreendida no mundo diminuiu em relação a 2000, porém um número maior de países reportou tal apreensão (de 15 países em 2000 para 30 em 2006), indicando uma expansão em termos geográficos.



**Figura 3.** Padrão de usuários de anfetaminas no mundo (*WDR, 2008*).

### 1.3.5 - Ecstasy

O MDMA foi sintetizado e patenteado pelo laboratório Merck, na Alemanha, em 1912, sem uma definição de sua finalidade terapêutica (Almeida & Silva, 2003).

Nos últimos 20 anos, anfetaminas modificadas têm sido sintetizadas em laboratórios clandestinos para serem utilizadas com fins não-médicos, com o objetivo de intensificar as experiências sociais. Dentre elas, a mais conhecida no Brasil é o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, ecstasy), que é uma anfetamina modificada com potentes efeitos estimulantes do sistema nervoso central e tem seu uso associado aos *clubbers* e suas festas denominadas *raves* (Ribeiro & Marques, 2002; Moro *et al*, 2006; Quinton & Yamamoto, 2006), sendo, por esse motivo, conhecida como *Club drug* (Almeida & Silva, 2003; Moro *et al*, 2006).

O ecstasy é habitualmente comercializado e consumido em comprimidos, de diversas cores e tamanhos, contendo cerca de 120 mg de MDMA e seus efeitos duram entre quatro e 8 horas (Ribeiro & Marques, 2002; Almeida & Silva, 2003) (Figura 4).



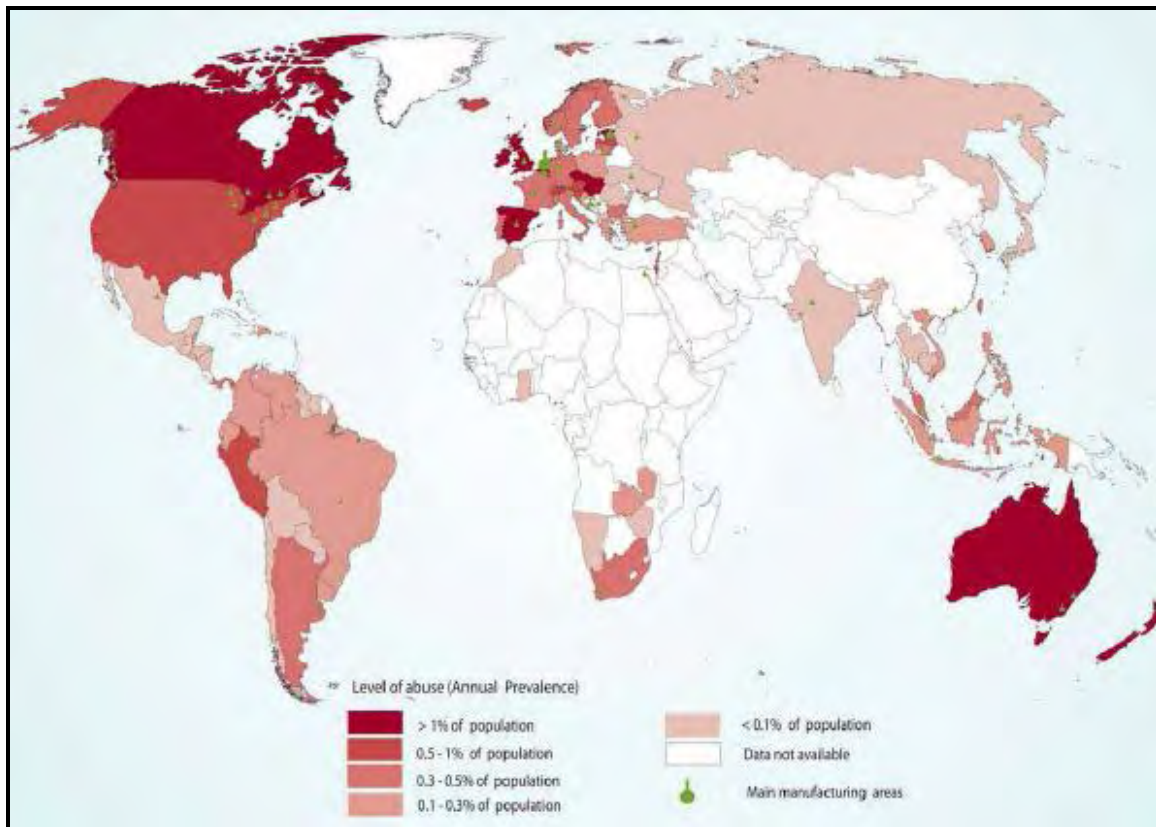
**Figura 4.** Comprimidos de Ecstasy de diversas formas, cores e símbolos.

De forma aguda, o MDMA tem diversos efeitos, periférico e central, levando à ativação psicomotora, euforia, diminuição do apetite e hipertermia (Ribeiro & Marques, 2002; Quinton & Yamamoto, 2006). Devido às suas fortes propriedades eufóricas, o MDMA tem uma taxa de abuso alta e o uso crônico pode levar a comportamentos psicóticos e violentos (Quinton & Yamamoto, 2006).

O abuso dessas drogas é um problema crescente nos EUA onde, de acordo com a Pesquisa Nacional sobre Uso de droga e Saúde de 2003 (NSDUH), 2,1 milhões de americanos maiores de 12 anos já experimentaram ecstasy. Além disso, a Administração e Serviços sobre Substância de abuso e Doença mental (SAMSHA)

reportou um aumento de 54%, entre 1995 e 2002, nos atendimentos relacionados ao uso de anfetaminas dos prontos socorros (Quinton & Yamamoto, 2006).

No Brasil, segundo um levantamento nacional sobre o uso de agentes psicoativos, aproximadamente 0,6% dos entrevistados, maiores de 12 anos, relataram ter consumido ecstasy ou outros agentes alucinógenos pelo menos uma vez durante a vida (Moro *et al.*, 2006). Evidências como uma maior visibilidade na imprensa brasileira, aumento no número de apreensões de comprimidos e a descoberta do primeiro laboratório clandestino de produção em São Paulo podem ser indicativo de que o número de usuários de ecstasy aumenta a cada ano (Almeida & Silva, 2003). O padrão de usuários de *ecstasy* no mundo pode ser observado na Figura 5.



Embora MDMA seja considerada uma droga segura, ou seja, que não representa um perigo físico, existe relatos de reações adversas e mortes relacionadas ao seu consumo (Almeida & Silva, 2003). Muitas variáveis, incluindo dose, via de

administração e regime, determinam a extensão pela qual o efeito tóxico e neuromodulatório serão observados. Além disso, diferenças na sensibilidade têm sido observadas entre diferentes linhagens de uma espécie e entre gêneros, indicando que indivíduos mais susceptíveis mostrarão sinais de toxicidade com doses menores que indivíduos menos susceptíveis (Aerts, 1997).

Também se deve levar em consideração que existe uma alta frequência de uso do ecstasy em associação com outras drogas psicoativas o que aumenta o risco de reações tóxicas (Almeida & Silva, 2003). Na Finlândia, Vuori *et al.* (2002) reportaram quatro casos de morte relacionada ao uso de MDMA associado à moclobemide, um inibidor da MAO.

Estudos pré-clínicos revelaram que o MDMA produz um dano, a longo prazo, nos terminais dopaminérgicos e serotoninérgicos em múltiplas áreas do cérebro (Quinton & Yamamoto, 2006), pois estimulam a liberação de neurotransmissores monoamínicos como serotonina, noradrenalina e em menor extensão dopamina (Inman & Greene, 2003).

Reações severas, por vezes com resultados fatais, têm ocorrido após a ingestão de doses normais, o que parece indicar que em humanos este efeito não seja dose-relacionado. As principais complicações que podem ser fatais na overdose por anfetaminas são a hipertermia (que pode ser fulminante), a hipertensão, ataques convulsivos, colapso cardiovascular, traumas e falência renal aguda (Aerts, 1997; Ribeiro & Marques, 2002).

Alguns autores atribuem a hipertermia (temperatura corporal de até 42° C) à liberação de grande quantidade de serotonina a partir de terminais serotoninérgicos induzida pelo MDMA (Moro *et al.*, 2006). Essa resposta hipertérmica tem mostrado ter um papel importante no desenvolvimento de toxicidade dos terminais 5-HT e DA a um longo prazo (Quinton & Yamamoto, 2006), uma vez que depois de repetidas injeções com alta dose de MDMA pode refletir em perda de terminais nervosos de serotonina (Aerts, 1997). Por isso, o controle da temperatura corpórea é o meio mais importante na prevenção de reações severas ao MDMA, o que é indicado ser feito com isotônico ao invés de água pura (Aerts, 1997).

Os casos de convulsão geralmente têm sua causa atribuída à hiponatremia e ao edema encefálico por provável intoxicação hídrica resultante da ingestão abusiva de água em indivíduos com sudorese intensa provocada pela elevação da temperatura corporal induzida pelo MDMA e agravada pela intensa atividade física durante as festas (Moro *et al.*, 2006).

Arritmia cardíaca é, geralmente, notada em pronto-socorros e é, provavelmente, outra maneira de levar à morte, especialmente naqueles que tem predisposição para ter anormalidades cardíacas. O aumento da pressão cardíaca e aumento da taxa cardíaca causada pelo MDMA podem ser deletérios em pessoas com problemas cardíacos (Aerts, 1997).

MDMA pode causar danos no fígado, resultando em hepatite aguda, provavelmente devido ao acúmulo de algum metabólito tóxico do MDMA. Os mecanismos ainda não são claros, pois há poucos estudos sobre o assunto, mas acredita-se que se o MDMA seja a causa da toxicidade hepática, sendo este fenômeno então idiossincrático e indicando que pessoas com problemas hepáticos possam ser mais sensíveis à uma possível resposta tóxica (Aerts, 1997).

Em experimentos com animais, a letalidade só é observada quando injetados com doses muito altas de MDMA. Segundo estudos sobre toxicidade aguda do MDMA, realizados pela Universidade do Michigan entre 1953 e 1954, foi observado que a DL50 (dose na qual 50% dos animais morre) no primata *Macaca mulatta* era de 22 mg/kg i.v., o que seria equivalente à aproximadamente 11 vezes a dose recreacional humana. Para fazer uma predição dos efeitos que possam ocorrer em humanos, os dados animais podem ser modificados pela aplicação de fatores de extrapolação para a dose que o específico efeito ocorreu no animal. Fatores de extrapolação de animais para humanos são, baseados em considerações farmacocinéticas, relacionadas ao peso corpóreo, o que dá para o macaco um fator de extrapolação dois, o que indica que o efeito no humano ocorre a doses, aproximadamente, duas vezes menor (Aerts, 1997).

#### **1.4 - Espécies de Interesse Forense deste Estudo**

Até pouco antes de 1980, o gênero *Chrysomya* estava restrito aos trópicos do Velho Mundo onde são as moscas varejeiras mais abundantes e economicamente

importantes. No final da década de 1970, quatro espécies se estabeleceram nas Américas conforme Figura 6 (Baumgartner & Greenberg, 1984).

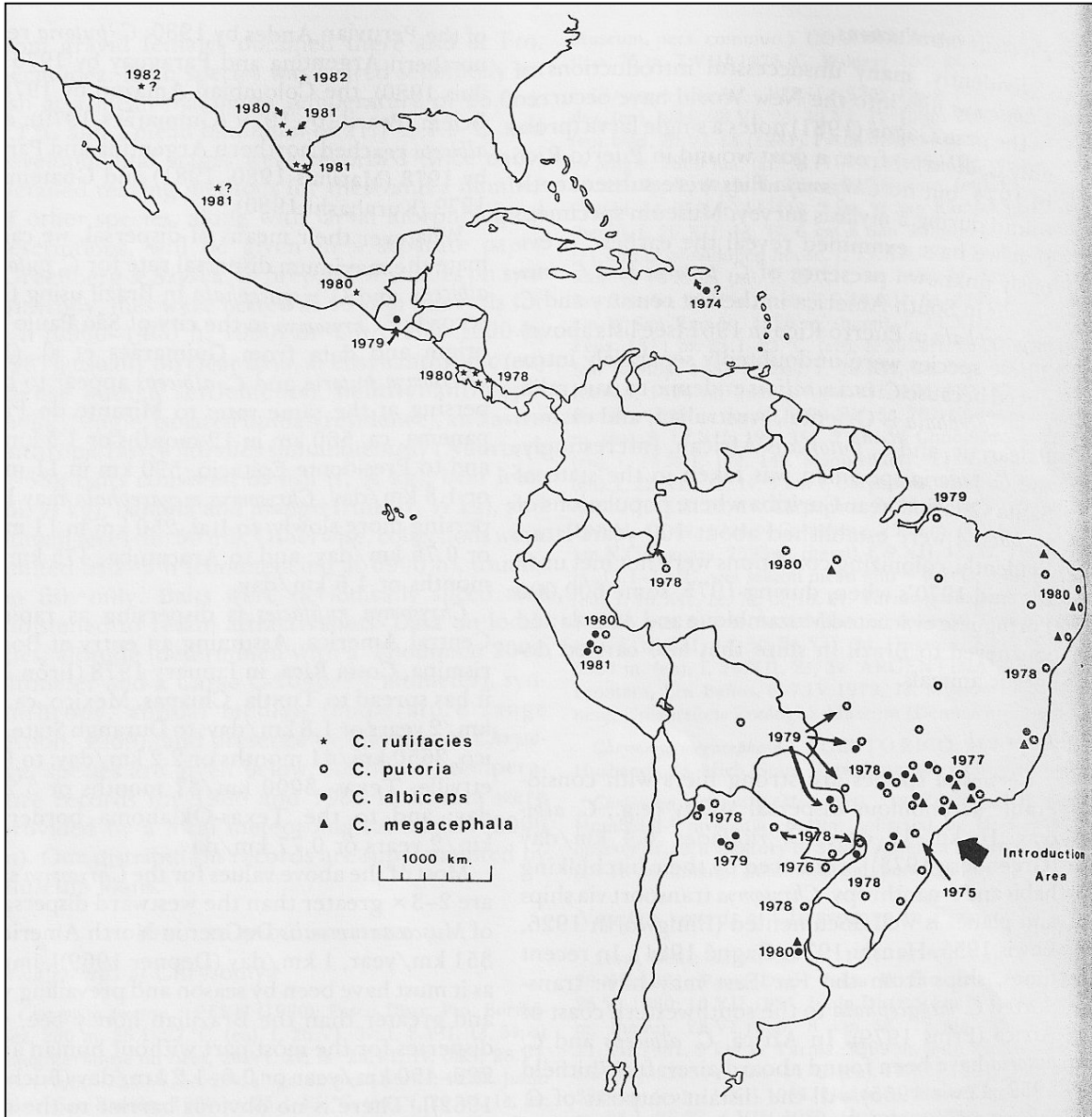
Em 1975, grande número de *Chrysomya putoria* foi encontrado em Curitiba, sul do Brasil há cerca de 110 km da costa (Imbiriba *et al.*, 1977). Um pouco mais tarde, Guimarães e colaboradores (1978) reportaram *C. putoria*, *C. albiceps* e *C. megacephala* em Campinas e Santos, no estado de São Paulo. Essas três espécies foram provavelmente introduzidas no Brasil por volta de 1975 com o influxo de portugueses refugiados da África e se espalharam rapidamente no Brasil (Guimarães *et al.*, 1979; Laurence, 1981).

Espécies de *Chrysomya* são voadores resistentes com habilidade de dispersão consideravelmente autônoma, aumentada pelo hábito de “pegar carona” e o fato de serem sinantrópicas. *C. albiceps* é considerada hemisinantrópica enquanto *C. putoria* é eussinantrópica (Baumgartner & Greenberg, 1984).

O estabelecimento das espécies de *Chrysomya* no “Mundo Novo” pode afetar elementos da fauna nativa de moscas varejeiras através do deslocamento de nicho. Hanski (1977) sugeriu que a extinção de *Phaenicia caesar* nas Ilhas Canárias foi devido à exclusão competitiva por *C. albiceps*. Guimarães *et al.* (1979) notaram que *C. putoria* substituiu quase que completamente *Cochliomyia macellaria* no Brasil. No Peru, *Co. macellaria* também foi substituída por *C. putoria* e *C. albiceps*, uma vez que num levantamento realizado em 1977 não haviam sido coletados exemplares de *Chrysomya* enquanto num levantamento em 1981 esse gênero era praticamente o dominante na mesma região (Baumgartner & Greenberg, 1984).

Num estudo realizado em Campinas, entre 1993 e 1998, as três espécies de *Chrysomya* (*C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*) mostraram-se entre as mais frequentes tanto nos casos do Instituto Médico Legal (IML) como em coletas de campo, sendo a *C. putoria* considerada como indicador forense para a área (Carvalho *et al.*, 2000). Em Curitiba, Moura e colaboradores (2005) observaram que *C. albiceps*, juntamente com *Lucilia eximia* e *Oxysarcodesia paulistanensis* formavam 80% da comunidade de insetos que colonizaram as carcaças experimentais. Na Venezuela, Velásquez (2008), identificou *C. albiceps* como indicador forense para área de savana, não sendo coletada em seu experimento em região de floresta fechada.

Andrade e colaboradores (2005) coletaram em cadáveres humanos larvas de califorídeos sendo os de *C. megacephala* e *C. albiceps* os mais abundantes e coletadas de uma região litorânea do Rio Grande do Norte, Brasil, de clima tropical úmido, não sendo encontradas em região de clima semi-árido.



**Figura 6.** Distribuição de *Chrysomya* nas Américas. Datas indicam o primeiro registro no local específico (Baumgartner & Greenberg, 1984).

## 2 - OBJETIVOS GERAIS

1. Verificar o efeito da anfetamina, metabólito da metanfetamina, quando adicionada em dieta artificial, sobre o desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae);
2. Detectar, pelo método da imunohistoquímica, a anfetamina em tecidos larvais de *C. megacephala* e *C. putoria*;
3. Verificar o efeito do *ecstasy*, quando adicionado em dieta artificial, sobre o desenvolvimento de imaturos de *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*.



### **3 - DETECÇÃO E ESTUDO DO EFEITO DA METANFETAMINA NO DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE DUAS ESPÉCIES DE *CHRYSOMYA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE INTERESSE FORENSE**

*Detection and study of the effect of metamphetamine on the development of two immature species of Chrysomya (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance*

**Resumo.** Insetos têm sido utilizados com sucesso como espécime toxicológico alternativo quando tecidos humanos, geralmente utilizados para esse fim, não estão disponíveis devido ao estado de decomposição que os cadáveres geralmente são encontrados. O abuso da metanfetamina, tanto como agente anorexígeno como na sua forma básica (cristais), é alarmante no Brasil que é considerado, de acordo com o relatório mundial sobre drogas de 2008, como o país da América do Sul com a maior taxa de abuso desta droga. Neste estudo, larvas de moscas das espécies *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann), dois indicadores forenses para a região sudeste do Brasil, foram criadas em dieta artificial contendo três doses diferentes de anfetamina, o principal metabólito da metanfetamina. O desenvolvimento larval foi acompanhado através da pesagem em intervalos de 12 horas após a eclosão. Amostras de larvas de terceiro estágio foram coletadas e fixadas para detecção da droga por imunohistoquímica. Os objetivos desse trabalho foram observar o efeito da anfetamina na taxa de desenvolvimento de imaturos de califorídeos e a utilização da imunohistoquímica como método de detecção de derivados anfetamínicos em tecidos larvais. A anfetamina pareceu não afetar o desenvolvimento larval de *C. megacephala*, no entanto, parece influenciar no desenvolvimento de imaturos de *C. putoria*, aumentando o período de pupa. A detecção de anfetamina em larvas de *C. megacephala* e *C. putoria* por imunohistoquímica mostrou-se inconclusiva.

Palavras-chave: Calliphoridae, biologia de necrófagos, IPM, Entomologia Forense, Entomotoxicologia, metanfetamina, anfetamina, imunohistoquímica.

### 3.1 – Introdução

O Brasil, de acordo com o relatório mundial sobre drogas de 2008, é o país da América do Sul com maior taxa de abuso de metanfetamina, especialmente devido ao seu uso indiscriminado para o controle da obesidade bem como para manter o estado de alerta prolongado, como no caso de alguns caminhoneiros ou estudantes. Nas últimas décadas ela voltou a ser motivo de preocupação devido ao seu consumo, com fins recreacionais, por via respiratória na sua forma básica, denominada popularmente como *ice* ou *crystal*, introduzida no país juntamente com as festas *raves* (Chasin & Salvadori, 1996; Passagli & Carvalho, 2007).

Apesar dos casos envolvendo mortes serem raros, a associação dessa droga com outras, principalmente com antidepressivos e barbitúricos, pode levar a quadros de internações hospitalares (Chasin & Salvadori, 1996; Passagli & Carvalho, 2007).

Em casos onde ocorre morte sem causa aparente ou quando há suspeita do indivíduo ser usuário de drogas, exames toxicológicos são necessários para determinar se houve algum tipo de intoxicação (envenenamento ou *overdose*). Assim que a morte ocorre, insetos são os primeiros a encontrar o corpo em decomposição e, por isso, podem ser úteis no auxílio da investigação criminal (Catts & Goff, 1992). Diversos são os trabalhos que usaram com sucesso larvas de insetos como fonte alternativa para exames toxicológicos, provando estas serem espécimes confiáveis quando tecidos, geralmente, utilizados para tal fim não estão mais disponíveis (Beyer *et al.*, 1980; Kintz *et al.*, 1990a; 1990b).

Atualmente há uma tendência no estudo dos efeitos que drogas e toxinas exercem no desenvolvimento larval, pois a aceleração ou retardamento nesta taxa pode interferir na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) quando baseada na biologia desses insetos (Goff *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 2001; Grella & Thyssen, 2008).

Na região sudeste do Brasil, moscas varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) são, geralmente, as mais encontradas colonizando corpos em decomposição e por isso utilizadas como indicadores forenses para a região (Carvalho, *et al.*, 2000).

Os objetivos do presente estudo foram observar a influência da anfetamina, metabólito da metanfetamina, na taxa de desenvolvimento de imaturos de duas espécies de interesse forense no Brasil, *C. megacephala* e *C. putoria* e verificar a possibilidade do emprego da técnica de imunohistoquímica para detecção da anfetamina nos tecidos larvais.

### 3.2 – Material e Métodos

**Espécies estudadas e obtenção dos exemplares para estudo envolvendo taxa de desenvolvimento.** Os exemplares das espécies alvo do presente estudo, *C. megacephala* e *C. putoria*, foram coletados por meio de iscas e armadilhas apropriadas em campo colocadas no campus de Rubião Junior da UNESP e no campus da UNICAMP. Após a identificação dos exemplares, eles foram mantidos em gaiolas plásticas transparentes (30x30x50cm), com aberturas laterais revestidas por telas de náilon, alimentados com dietas à base de açúcar e proteína, constituídas por solução açucarada e fígado bovino cru. Estas gaiolas permaneceram em sala climatizada no Laboratório de Criação de Larvas, situado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, sob temperatura controlada de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ . Como substrato de oviposição foi oferecido carne bovina moída crua.

Após a postura, os ovos colocados sobre a carne foram retirados com o uso de pincel fino e depositados em frascos de vidro contendo a dieta artificial proposta por Leal *et al.* (1982) e modificada segundo Estrada *et al.* (2009), acrescida de fígado bovino cru, numa proporção de 2,0g/ovo. A anfetamina, principal metabólito da metanfetamina, foi adicionada na dieta nas dosagens de uma dose terapêutica (1xDT), duas vezes a dose terapêutica (2xDT) e cinco vezes a dose terapêutica (5xDT), sendo a dose terapêutica considerada de 0,07 mg/kg. Um grupo foi mantido apenas em dieta artificial, sem presença de qualquer substância, o qual será denominado grupo controle negativo. Três grupos, denominados controles positivos 1 (1xDT), 2 (2xDT) e 3 (5xDT), foram feitos com metanol correspondente a cada concentração de anfetamina

usada nos grupos experimentais pois o padrão de anfetamina utilizado estava diluído em metanol na proporção 1:1.

Os frascos, cobertos com organza e elástico, foram acondicionados em câmaras climáticas modelo Fanen 387, localizadas no Laboratório de Ecologia, do Departamento de Parasitologia, sob temperatura controlada de  $27\pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ , onde todas as etapas vitais foram acompanhadas.

A cada 12 h, após a eclosão dos imaturos, 10 amostras foram retiradas de cada grupo experimental e controles, e seu ganho de massa corporal foi medido, por meio de pesagem em balança analítica de precisão, até atingirem o estágio de pupa.

**Fixação e preparo dos imaturos para detecção por imunohistoquímica.** As larvas dos imaturos quando atingiram o terceiro estágio foram retiradas da dieta artificial, lavadas em solução tampão PBS 2%, cortadas ao meio e então fixadas em paraformaldeído tamponado 4% durante 24 horas. Após o tempo determinado, as amostras foram retiradas do paraformaldeído e fixadas em parafina (Bourel *et al.*, 2001; Arrais-Silva *et al.*, 2005).

As amostras foram lavadas em água, desidratadas e diafanizadas antes de serem montadas em parafina. Os blocos de parafina com as amostras foram então submetidos a cortes histológicos, de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , para confecção de lâminas. Os cortes foram então desparafinizados, reidratados, corados com hematoxilina de Ehrlich e eosina, para visualização da morfologia das larvas; diafanizados e montados em lamínula.

**Imunohistoquímica.** Os cortes de tecidos das larvas foram desparafinizados, hidratados e o bloqueio da peroxidase endógena realizado, utilizando-se  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% (Arrais-Silva *et al.*, 2005). Os cortes foram lavados em PBS, submetidos ao PBS-BSA 1% e incubados com o anticorpo primário anti-anfetamina, anticorpo monoclonal desenvolvido em camundongos (Biostride Inc., USA). Anticorpo secundário anti-camundongo conjugados com a enzima peroxidase (Sigma Inc., USA) foi utilizado neste protocolo, já padronizado para tecidos de mamíferos (Arrais-Silva *et al.*, 2005). A reação foi revelada utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB), os cortes foram lavados em água destilada, contracorados com hematoxilina de Harris,

desidratados e montados em meio de montagem cyto seal-60 (Sigma) (Arrais-Silva *et al.*, 2005).

Assim como feito por Bourel e colaboradores (2001), foram utilizados controles negativos (tecidos não incubados com anticorpo primário) bem como outros controles (larvas alimentadas somente com a dieta artificial e com metanol adicionado às dietas) foram realizados. A observação dos tecidos larvais foi realizada em microscópio óptico comum.

### **3.3 – Resultados e Discussão**

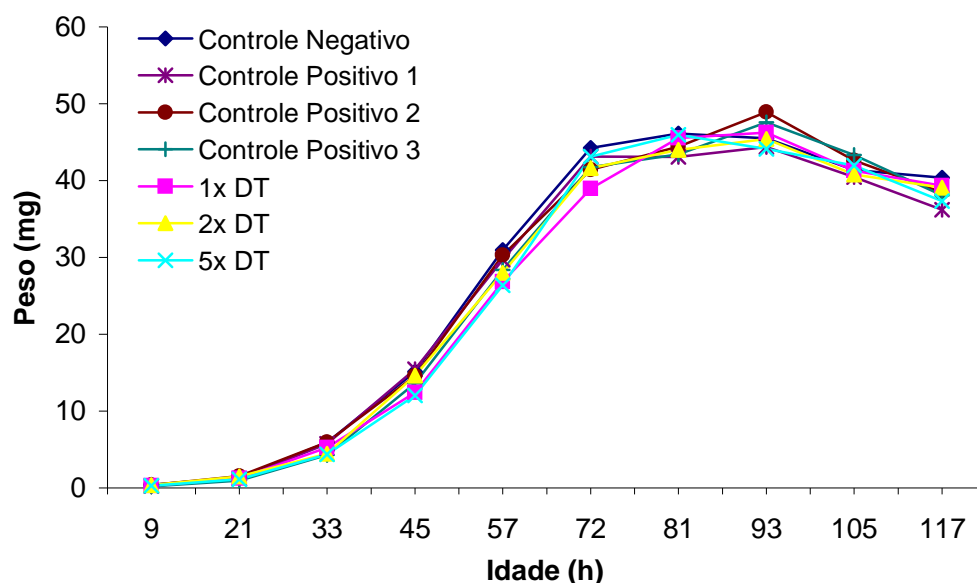
**Efeitos na taxa de desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria*.** Como pode ser observado na Tabela 3.1 e Figura 3.1, no presente estudo não foi encontrada qualquer diferença em relação ao tempo de desenvolvimento entre larvas de *Chrysomya megacephala* dos grupos experimentais e controle, fato que coincide com o observado por Carvalho (2004) que estudou o efeito da anfepramona, um derivado anfetamínico, sobre o desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya albiceps*. Goff e colaboradores (1992), no entanto, observaram um aumento da taxa de desenvolvimento do sarcófago *Parasarcophaga ruficornis* para as colônias alimentadas com tecidos contendo uma e duas vezes a dose letal de metanfetamina.

A ausência de influência da droga no desenvolvimento das larvas no presente estudo pode ser devido ao fato de ter sido utilizado a dose terapêutica, que é uma dose muito pequena quando comparada à dose letal de 71,4 mg utilizada por Goff *et al.* (1992).

Outra possibilidade para não haver diferença no desenvolvimento entre os grupos tratados e os controles é o fato das larvas de *C. megacephala* não terem metabolizado as drogas assim como relatado por Grella & Thyssen (2008) em trabalho com imaturos de *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*, criados em dieta artificial acrescida de cloridrato de oxycodone, onde não observaram diferenças significativas no desenvolvimento entre os grupos controle e os grupos experimentais, sugerindo a não metabolização dessas drogas pelas larvas nem seu bioacúmulo, o que também pode ser comprovado devido à alta viabilidade de todos os grupos.

**Tabela 3.1.** Média de peso (em mg) e desvio padrão das larvas de *Chrysomya megacephala* criadas em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações de anfetamina.

Idade (h)	Controle Negativo	Controle Positivo 1	Controle Positivo 2	Controle Positivo 3	1xDT	2xDT	5xDT
9	0,4 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,3 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,28 ± 0,00
21	1,36 ± 0,20	1,21 ± 0,36	1,55 ± 0,34	0,94 ± 0,00	1,26 ± 0,25	1,48 ± 0,28	1,11 ± 0,00
33	5,92 ± 0,61	5,74 ± 0,80	5,94 ± 0,50	4,3 ± 0,68	5,25 ± 0,39	4,47 ± 1,08	4,39 ± 0,42
45	15,12 ± 3,83	15,47 ± 2,17	14,58 ± 3,77	13,64 ± 1,22	12,4 ± 1,36	14,62 ± 2,26	12,03 ± 1,28
57	30,96 ± 3,27	29,72 ± 3,12	30,28 ± 4,25	28,37 ± 3,93	26,84 ± 4,72	27,98 ± 6,80	26,38 ± 2,95
72	44,23 ± 3,52	43,13 ± 2,67	41,42 ± 5,26	41,75 ± 5,64	38,96 ± 4,80	41,61 ± 3,92	43,11 ± 2,54
81	46,13 ± 5,19	43,09 ± 2,25	44,41 ± 3,46	43,4 ± 6,80	45,54 ± 3,06	44,01 ± 4,54	45,95 ± 2,20
93	45,5 ± 2,03	44,38 ± 3,26	48,93 ± 3,65	47,6 ± 3,17	46,26 ± 3,71	45,4 ± 2,49	44,13 ± 2,48
105	41,37 ± 2,53	40,47 ± 3,36	42,61 ± 2,63	43,33 ± 4,03	41,31 ± 5,52	40,8 ± 4,17	41,94 ± 2,30
117	40,36 ± 3,14	36,22 ± 1,85	38,45 ± 2,13	38,08 ± 2,75	39,34 ± 3,28	39,1 ± 2,46	37,34 ± 2,75



**Figura 3.1.** Taxas de desenvolvimento de larvas de *Chrysomya megacephala* criadas em dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anfetamina.

Quanto aos efeitos da anfetamina no desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya putoria*, parece haver um aumento no peso das larvas criadas em dietas artificiais contendo a droga quando comparadas aos controles positivos (dietas acrescidas de concentrações de metanol correspondentes às doses terapêuticas de

anfetamina), no entanto não em relação ao grupo controle negativo (dieta sem adição de qualquer droga/toxina) (Tabela 3.3 e Figura 3.2).

Devido ao fato do padrão anfetamínico utilizado estar diluído em metanol, na proporção 1:1, os controles positivos terem tido o ganho de peso menor que o controle positivo e os grupos experimentais e trabalho anterior realizado por Carvalho (2004) ter constatado aumento de peso de quase duas vezes em larvas *C. putoria* que se alimentaram de substrato contendo duas vezes a dose letal de anfepramona (um derivado anfetamínico) quando comparada com grupo controle, pode-se inferir que talvez o metanol tenha um efeito antagônico ao da anfetamina sobre o desenvolvimento dessa espécie, ou seja, o metanol teria o efeito de diminuir a taxa de desenvolvimento de *C. putoria*, enquanto a anfetamina aumentaria a taxa de desenvolvimento.

Além disso, outros trabalhos mostraram a influência de drogas no desenvolvimento de larvas de *C. putoria*, como no trabalho usando substrato contendo cocaína, onde Carvalho (2004) observou um retardamento no desenvolvimento de larvas de *C. putoria* e o mesmo foi observado quando os imaturos desta mesma espécie foram criados em tecidos de coelho injetados com diazepam (Carvalho *et al.*, 2001).

**Tabela 3.2.** Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de *Chrysomya megacephala* que se desenvolveram nas diferentes concentrações de anfetamina ( $n = 150$ ).

Grupo	Pupários	Adultos emergentes			Intervalo de emergência
		Machos	Fêmeas	Total	
Controle Neg.	121 (80,7%)	59	61	120 (80%)	96
Controle Pos. 1	125 (83,3%)	66	52	118 (78,7%)	96
Controle Pos. 2	114 (76%)	55	54	109 (72,7%)	96
Controle Pos. 3	125 (83,3%)	55	67	122 (81,3%)	96
1xDT	132 (88%)	75	52	129 (86%)	96
2xDT	88 (58,7%)	46	37	83 (55,3%)	96
5xDT	116 (77,3%)	54	55	109 (72,7%)	96

Não foram observadas diferenças no intervalo de emergência dos adultos de *C. megacephala*, de acordo com a Tabela 3.2., porém os grupos controle positivos e os experimentais de *C. putoria* tiveram um período de pupa maior que o controle negativo,

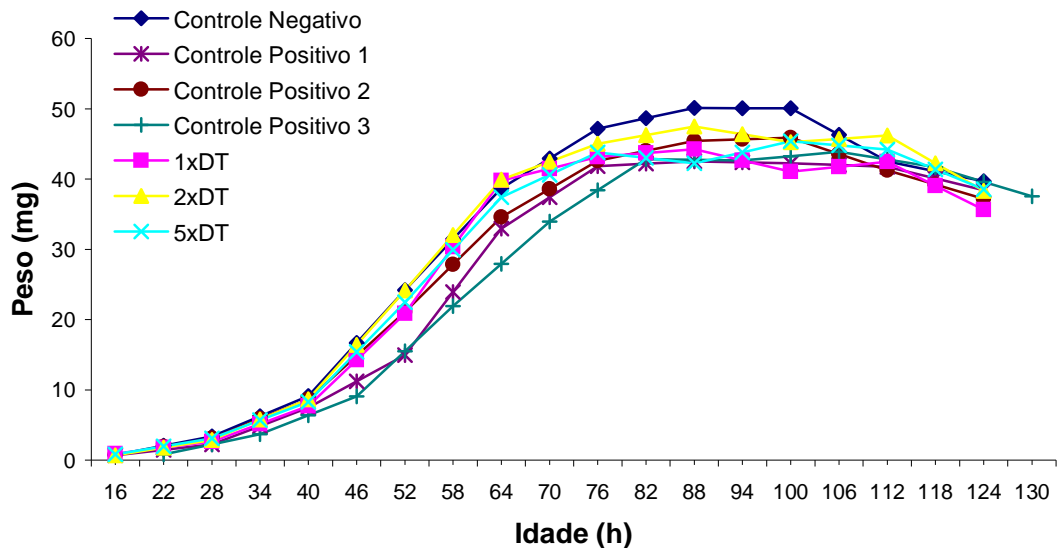
com uma diferença no intervalo de emergência de 24 h (Tabela 3.4). Tal atraso na emergência talvez seja devido à presença de metanol, pois como observado por Carvalho (2004) a anfepramona acelerou em 48 h o intervalo de emergência dos grupos de *C. putoria* tratados.

A mortalidade de pupas de *C. megacephala* foi baixa para todos os grupos, sendo o com a menor mortalidade o grupo controle negativo (0,8%) e o com maior o grupo 3xDT (6%), diferente do relatado por Goff e colaboradores (1992) que observaram uma mortalidade maior de pupas nas colônias que foram administradas meia e uma dose letal. Quanto à mortalidade de pupa nos grupos de *C. putoria*, ela foi maior nos grupos tratados com anfetamina quando comparados aos grupos controles, sendo o grupo 1xDT com maior mortalidade de pupa e o controle positivo 1 com menor mortalidade.

**Tabela 3.3.** Média de peso e desvio padrão (em mg) das larvas de *Chrysomya putoria* criadas em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações de anfetamina.

Idade(h)	Controle Negativo	Controle Positivo 1	Controle Positivo 2	Controle Positivo 3	1xDT	2xDT	5xDT
16	0,73 ± 0,00	0,67 ± 0,00	0,73 ± 0,00	-	0,92 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,82 ± 0,00
22	-	-	-	0,82 ± 0,00	-	-	-
28	3,38 ± 0,69	2,22 ± 0,51	3,1 ± 0,70	-	2,62 ± 0,64	2,87 ± 0,68	3,08 ± 0,84
34	-	-	-	3,68 ± 0,72	-	-	-
40	9,13 ± 0,58	7,46 ± 1,05	8,61 ± 0,78	-	7,68 ± 0,97	8,67 ± 0,82	8,3 ± 0,99
46	-	-	-	9,08 ± 1,65	-	-	-
52	24,18 ± 3,73	14,94 ± 5,09	21,1 ± 3,80	-	20,88 ± 4,55	24,14 ± 3,33	22,47 ± 4,26
58	-	-	-	21,93 ± 4,96	-	-	-
64	38,66 ± 5,02	32,94 ± 5,53	34,59 ± 3,75	-	39,79 ± 4,22	39,93 ± 3,23	37,41 ± 3,77
70	-	-	-	33,94 ± 6,45	-	-	-
76	47,16 ± 2,94	41,83 ± 2,66	42,58 ± 3,75	-	43,15 ± 5,10	45,03 ± 3,36	43,79 ± 5,37
82	-	-	-	42,84 ± 7,89	-	-	-
88	50,11 ± 3,78	42,5 ± 5,83	45,4 ± 3,93	-	44,25 ± 4,61	47,48 ± 3,76	42,23 ± 5,91
94	-	-	-	42,62 ± 4,46	-	-	-
100	50,07 ± 2,68	42,23 ± 2,77	45,88 ± 3,28	-	41,04 ± 3,66	45,24 ± 1,98	45,36 ± 4,13
106	-	-	-	43,86 ± 3,48	-	-	-
112	42,52 ± 5,41	41,74 ± 3,65	41,25 ± 3,86	-	42,46 ± 4,44	46,18 ± 3,87	44,21 ± 4,80
118	-	-	-	41,68 ± 4,88	-	-	-
124	39,69 ± 2,84	38,41 ± 2,55	37,17 ± 2,61	-	35,64 ± 4,01	38,32 ± 1,41	38,55 ± 2,92
130	-	-	-	37,53 ± 3,25	-	-	-





**Figura 3.2.** Taxas de desenvolvimento de larvas de *Chrysomya putoria* criadas em dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anfetamina.

**Tabela 3.4.** Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de *Chrysomya putoria* que se desenvolveram nas diferentes concentrações de anfetamina ( $n = 150$ ).

Grupo	Pupários	Adultos emergentes			Intervalo de emergência
		Machos	Fêmeas	Total	
Controle Neg.	65 (43,3%)	34	25	59 (39,3%)	120
Controle Pos. 1	90 (60%)	37	52	89 (59,3%)	144
Controle Pos. 2	75 (50%)	35	39	74 (49,3%)	144
Controle Pos. 3	62 (41,3%)	32	26	58 (38,7%)	144
1xDT	87 (58%)	35	37	72 (48%)	144
2xDT	91 (60,7%)	44	36	80 (53,3%)	144
5xDT	58 (38,7%)	28	22	50 (33,3%)	144

No entanto, obteve-se 41,3 % de mortalidade de larvas de *C. megacephala* para o grupo 2xDT (Tabela 3.2). Ainda, a mortalidade de larvas de *C. putoria* foi maior do que a de *C. megacephala*, sendo o grupo com maior taxa de mortalidade larval o 5xDT (61,3%) e o de menor o grupo 2xDT (39,3%) (Tabela 3.4.).

**Detecção das drogas nos imaturos de *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria*.** Os grupos controles de *C. putoria* não apresentaram coloração quando realizado o método da imunohistoquímica, já os grupos tratados apresentaram uma reação de coloração muito fraca a qual não podemos afirmar com segurança se tratar de resultado positivo para anfetamina. Bourel *et al.* (2001), no entanto, conseguiram detectar morfina, pelo método da imunohistoquímica, em larvas de *Calliphora vomitoria* na qual cada espécime positivo mostrou coloração específica da hemolinfa sob o tegumento enquanto os controles e as amostras negativas não apresentaram reação de coloração.

Já para as larvas de *C. megacephala*, obtivemos reação de coloração em todos os grupos, o que pode indicar uma reação inespecífica entre o anticorpo primário e outra substância que não a anfetamina como também foi observado por Goff e colaboradores (1992) ao tentarem detectar metanfetamina e seu metabólito anfetamina por RIA em larvas do sarcófagídeo *Parasarcophaga ruficornis*, obtendo uma reação fraca uniforme em todos os grupos, o que concluiu poder ser resultado de uma reação inespecífica para outra substância que não a metanfetamina ou seu metabólito. Por isso concluíram que RIA não seria um bom método para detecção de metanfetamina quando forem utilizada díptera como fonte alternativa para evitar resultados falso-positivos, o que ainda é cedo para afirmar para a imunohistoquímica, onde, talvez, seria o caso de novos testes, com diferentes concentrações do anti-corpo primário, serem realizados antes de se descartar o método como meio de detecção de anfetamina em tecidos larvais.

Em outro trabalho, Goff *et al.* (1997) conseguiram detectar em imaturos da mosca sarcófagide, *Parasarcophaga ruficornis* (F.), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), outro derivado anfetamínico popularmente conhecido como *ecstasy*, utilizando LC/MS ao invés de RIA. Provavelmente o sucesso da detecção por LC/MS está no fato de ser um método mais sensível e cuja detecção não é resultado de uma reação prévia realizada nos tecidos como a imunohistoquímica ou RIA.

#### 4 - ESTUDO DO EFEITO DO ECSTASY NO DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE TRÊS ESPÉCIES DE *CHRYSOMYA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE INTERESSE FORENSE

*Effect of ecstasy on the development of three immature species of Chrysomya (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance*

**Resumo.** O aumento do abuso do ecstasy entre jovens no Brasil é preocupante, uma vez que casos de óbitos já foram reportados relacionados à ingestão desta droga. Insetos têm sido utilizados com sucesso como espécime toxicológico alternativo quando tecidos humanos, geralmente utilizados para esse fim, não estão disponíveis devido ao estado de decomposição que os cadáveres geralmente são encontrados. Neste estudo, larvas de moscas das espécies *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria*, indicadores forenses para a região sudeste do Brasil, foram criadas em dieta artificial contendo três doses diferentes de MDMA, o principal componente do *ecstasy*. O desenvolvimento larval foi acompanhado através da pesagem em intervalos de 12 horas após a eclosão. Os objetivos desse trabalho foram observar o efeito do *ecstasy* na taxa de desenvolvimento de imaturos de califorídeos para fornecer informações mais precisas para os casos nos quais a estimativa de intervalo pós-morte seja baseada no ciclo de vida dessas espécies. O MDMA pareceu não produzir efeito no desenvolvimento larval de *C. albiceps* nem de *C. putoria*, mas acelerou consideravelmente o desenvolvimento de *C. megacephala*.

Palavras-chave: Calliphoridae, biologia de necrófagos, IPM, Entomologia Forense, Entomotoxicologia, *ecstasy*, MDMA.

#### 4.1 – Introdução

O *ecstasy* é o derivado anfetamínico mais conhecido no Brasil e está associado aos *clubbers* e suas festas denominadas *raves*, que invadiram o país nas últimas décadas (Ribeiro & Marques, 2002; Moro *et al.*, 2006; Quinton & Yamamoto, 2006). Embora MDMA, principal componente do *ecstasy*, seja considerada uma droga segura, isto é,

que não representa um perigo físico, mas por ser geralmente utilizada em associação com outras drogas, relatos de reações adversas e mortes relacionadas ao seu consumo não são raros, tendo como as principais complicações a hepatotoxicidade e a intoxicação hídrica (Almeida & Silva, 2003).

Em casos de morte envolvendo abuso de drogas, exames toxicológicos são imprescindíveis para determinar a causa de óbito. Porém, o fato de algumas vezes os cadáveres serem encontrados em estágio de decomposição avançado, impossibilita a utilização de tecidos humanos para análises toxicológicas. Nestes casos, diversos trabalhos já mostraram que larvas de insetos podem ser usadas como fonte alternativa confiável para tal exame (Beyer *et al.*, 1980; Kintz *et al.*, 1990a; 1990b).

Além disso, a presença de droga nos tecidos em decomposição pode alterar a taxa de desenvolvimento de imaturos de insetos que colonizam o corpo, influenciando na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) quando baseada na biologia destes animais. Por isso, atualmente há uma tendência no estudo dos efeitos que drogas e toxinas exercem no desenvolvimento larval, para que em casos de *overdose* ou envenenamento a estimativa de IPM seja mais precisa (Goff *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 2001; Grella & Thyssen, 2008).

Na região sudeste do Brasil, moscas varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) são as mais encontradas colonizando corpos em decomposição e, por isso, utilizadas como indicadores forenses para a região (Carvalho *et al.*, 2000).

O objetivo do presente estudo foi observar a influência do *ecstasy* na taxa de desenvolvimento de imaturos de três espécies de dípteros de interesse forense no Brasil, *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*.

## 4.2 – Material e Métodos

**Espécies estudadas e obtenção dos exemplares para estudo envolvendo taxa de desenvolvimento.** Os exemplares das espécies alvo do presente estudo, *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* foram coletados por meio de iscas e armadilhas apropriadas em campo, no campus de Rubião Junior da UNESP/Botucatu e no campus da UNICAMP. Após a identificação dos exemplares, eles foram mantidos em gaiolas

plásticas transparentes (30x30x50cm), com aberturas laterais revestidas por telas de náilon, alimentados com dietas à base de açúcar e proteína, constituídas por solução açucarada e fígado bovino cru. Estas gaiolas permaneceram em sala climatizada no Laboratório de Criação de Larvas, situado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, sob temperatura controlada de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ . Como substrato de oviposição foi oferecido carne bovina moída crua.

Após a postura, os ovos colocados sobre a carne foram retirados com o uso de pincel fino e depositados em frascos de vidro contendo a dieta artificial proposta por Leal *et al.* (1982) e modificada segundo Estrada *et al.* (2009), acrescida de fígado bovino cru, numa proporção de 2,0g/ovo. A DL50 para Ecstasy utilizadas neste estudo foi de 22 mg/kg e foi adicionado na dieta nas dosagens subletal (1/2 DL), letal (DL) e supra letal (2xDL). Um grupo foi mantido apenas em dieta artificial, sem presença de qualquer substância, o qual foi denominado grupo controle.

Os frascos, cobertos com organza e elástico, foram acondicionados em câmaras climáticas modelo Fanen 387, localizadas no Laboratório de Ecologia, do Departamento de Parasitologia, sob temperatura controlada de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ , onde todas as etapas vitais foram acompanhadas.

A cada 12 h, após a eclosão dos imaturos, 10 amostras foram retiradas de cada grupo experimental e seu ganho de massa corporal foi medido, por meio de pesagem em balança analítica de precisão, até atingirem o estágio de pupa.

### **4.3 – Resultados e Discussão**

**Efeitos no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria*.** No presente estudo, não foi observada diferença entre a taxa de desenvolvimento das larvas de *C. albiceps* quando comparados os grupos experimentais com o grupo controle até a pesagem de 72 horas, quando as larvas do grupo controle estavam mais pesadas que as dos grupos tratados. Essa diferença foi observada até a pesagem de 84 horas quando também foi notado que as larvas do grupo 2xDL tinham

tido o menor ganho de massa. Na pesagem de 96 horas, o peso dos imaturos de *C. albiceps* do grupo controle era similar ao do grupo 1/2xDL e eram maiores que os dos grupos 1xDL e 2xDL, nesta ordem. Após esse tempo de observação até empuparem a taxa de desenvolvimento foi semelhante entre os grupos, sendo que na hora 120 foi observado que dentro de cada grupo havia diferenças entre os pesos dos espécimes, o que também foi observado para o grupo controle às 144 horas (Tabela 4.1 e Figura 4.1).

Carvalho (2004) estudou o efeito de um derivado anfetamínico muito utilizado como inibidor de apetite no Brasil, a anfepramona, em larvas de *C. albiceps* e *C. putoria* e verificou que esta droga não exerce efeitos significativos no desenvolvimento de imaturo de *C. albiceps* assim como observado por Grella & Thyssen (2008) quando estudaram o efeito de cloridrato de oxycodone no desenvolvimento desta espécie. Porém, Carvalho (2004) observou que as larvas de *C. albiceps* quando criadas em substrato contendo cocaína, o seu desenvolvimento era acelerado da 6<sup>a</sup> até a 24<sup>a</sup> hora de exposição e que larvas desta espécie na presença de diazepam também apresentava aceleração no desenvolvimento bem como um maior ganho de massa quando comparadas ao controle (Carvalho *et al.*, 2001).

Os efeitos observados neste trabalho foram sutis se compararmos com o trabalho de Ferrari *et al.* (2008) que verificaram, ao trabalhar com larvas de *C. albiceps* criadas em dieta artificial acrescida do hormônio testosterona, que as larvas do grupo experimental apresentaram média do peso corporal cinco vezes maior do que a média de peso corporal das larvas do grupo controle (6,0 mg e 1,2 mg por larva, respectivamente) e que a diferença verificada no tamanho era bastante nítida.

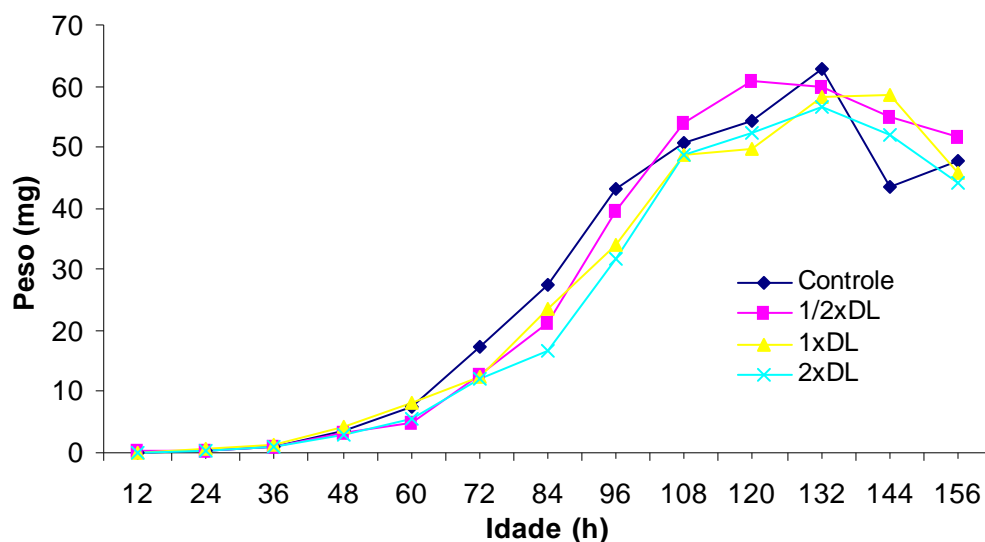
A presença de *ecstasy* na dieta artificial onde foram criados imaturos de *Chrysomya megacephala* acelerou em 36 horas o desenvolvimento dos grupos tratados quando comparados com o grupo controle (Tabela 4.3 e Figura 4.2) o que também foi observado por Goff e colaboradores (1997) quando considerado o tempo total de desenvolvimento de larvas de *Parasarcophaga ruficornis* em substrato contendo 2xDL de MDMA.

**Tabela 4.1.** Média de peso (em mg) e desvio padrão das larvas de *Chrysomya albiceps* criadas em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações de MDMA (*ecstasy*).

Idade(h)	Controle	1/2xDL	1xDL	2xDL
12	0,14 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,11 ± 0,00
24	0,44 ± 0,00	0,4 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,39 ± 0,00
36	1,01 ± 0,25	0,82 ± 0,00	1,21 ± 0,34	0,93 ± 0,32
48	3,54 ± 0,58	3,18 ± 0,39	4,1 ± 0,49	3,05 ± 0,43
60	7,36 ± 0,87	4,96 ± 0,69	8,23 ± 1,61	5,53 ± 0,56
72	17,24 ± 2,96	12,88 ± 1,94	12,52 ± 4,09	12,22 ± 1,93
84	27,34 ± 4,30	21,12 ± 2,33	23,61 ± 4,91	16,68 ± 2,62
96	43,22 ± 6,80	39,42 ± 7,40	33,93 ± 5,70	31,84 ± 5,67
108	50,58 ± 5,96	54,12 ± 7,78	48,7 ± 4,22	48,73 ± 5,92
120	54,38 ± 10,74	60,89 ± 10,92	49,85 ± 8,35	52,47 ± 11,03
132	62,9 ± 5,64	59,79 ± 13,02	58,2 ± 8,87	56,68 ± 10,16
144	43,42 ± 10,97	54,81 ± 5,36	58,47 ± 5,78	51,93 ± 6,76
156	47,83 ± 4,93	51,6 ± 5,28	45,8 ± 6,18	44,28 ± 7,65

O ganho de peso máximo das larvas de *C. megacephala* foi similar entre os grupos controle e 1/2xDL porém atingidos em tempos diferentes. Enquanto o grupo controle atingiu seu peso máximo às 96 horas de experimento, os grupos tratados atingiram às 74 horas, ou seja, uma diferença de 24 horas, além do fato dos grupos 1xDL e 2xDL apresentarem ganho de peso máximo menor que os grupos controle e 1/2xDL (Tabela 4.3 e Figura 4.2).

Diferentemente do que observaram Goff *et al.* (1997) quando perceberam que o grupo controle e o grupo com 2xDL de MDMA tiveram o desenvolvimento de imaturos de *P. ruficornis* acelerado entre as horas 24 e 114 de desenvolvimento, quando comparado com os grupos 1/2xDL e 1xDL. Oliveira *et al.* (2009) também observaram uma diferença significativa no tempo de desenvolvimento larval de *C. megacephala* quando usaram diferentes concentrações de buscopam em dietas artificiais, formando um gradiente de diminuição de peso conforme aumentava a concentração da droga na dieta. Além disso, observou um atraso de 54 h no desenvolvimento larval no grupo de 1xDL. Entretanto, cloridrato de oxycodone parece não exercer efeito no desenvolvimento de imaturos de *C. megacephala* conforme descrito por Grella & Thyssen (2008).



**Figura 4.1.** Taxas de desenvolvimento de larvas de *Chrysomya albiceps* criadas em dietas artificiais contendo diferentes concentrações de MDMA (*ecstasy*).

**Tabela 4.2.** Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de *Chrysomya albiceps* que se desenvolveram nas diferentes concentrações de MDMA ( $n = 150$ ).

Grupo	Pupários	Adultos emergentes	Intervalo de emergência
Controle	116 (77,3%)	94 (62,7%)	144
1/2xDL	116 (77,3%)	111 (74%)	144
1xDL	122 (81,3%)	102 (68%)	144
2xDL	131 (86,7%)	124 (82,7%)	144

A taxa de desenvolvimento de larvas de *C. putoria* não apresentou diferenças entre os grupos experimentais e o grupo controle, à exceção do período de 60 e 84 horas quando as larvas dos grupos tratados estavam com peso maior do que o controle (Figura 4.3.). Carvalho (2004) também constatou aceleração no desenvolvimento de larvas de *C. putoria* que se alimentaram de tecido contendo anfepramona a partir de 24

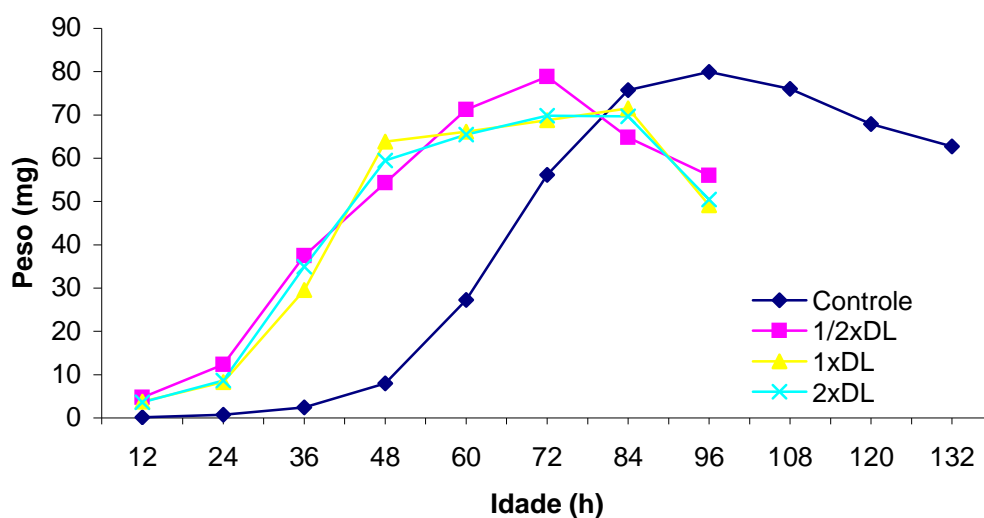


horas de contato com a droga, sendo que no fim das 54 horas, o seu peso era quase o dobro do controle. Larvas de *C. putoria* que se alimentaram de tecido contendo cocaína, também tiveram o desenvolvimento acelerado no período de 6 e 18 horas de experimento. Já às 24 horas de experimento com cocaína nenhuma diferença significativa foi observada no desenvolvimento de *C. putoria* (Carvalho, 2004).

Aceleração no desenvolvimento larval de *C. putoria* também foi observada em experimentos com diazepam, resultando em peso maior para os grupos experimentais (Carvalho *et al.*, 2001). No entanto, a escopolamina, de acordo com experimentos de Grella e colaboradores (2007), parece fazer retardar o desenvolvimento larval de *C. putoria* quando na dose 1xDL, quando em dose de 0,25xDL não apresentou diferenças quando comparadas com o grupo controle sendo os dois grupos mais pesados que o 1xDL e que em dose de 2xDL todas as larvas morreram em 2<sup>o</sup> estágio. E o cloridrato de oxycodone não tem nenhum efeito sobre o desenvolvimento de larvas de *C. putoria*, conforme trabalho de Grella & Thyssen (2008).

**Tabela 4.3.** Média de peso (em mg) e desvio padrão das larvas de *Chrysomya megacephala* criadas em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações de MDMA (*ecstasy*).

Idade(h)	Controle	1/2 DL	1 DL	2 DL
12	0,12 ± 0,00	4,70 ± 0,74	3,74 ± 0,73	3,63 ± 0,69
24	0,75 ± 0,00	12,31 ± 1,54	8,30 ± 1,02	8,62 ± 1,06
36	2,43 ± 0,33	37,45 ± 5,33	29,56 ± 6,91	34,94 ± 4,87
48	8,00 ± 0,26	54,31 ± 5,17	63,85 ± 6,59	59,49 ± 6,33
60	27,24 ± 1,24	71,25 ± 4,98	66,15 ± 8,10	65,48 ± 12,79
72	56,19 ± 2,67	78,85 ± 7,50	68,77 ± 11,18	69,80 ± 7,64
84	75,76 ± 5,27	64,82 ± 13,15	71,54 ± 11,09	69,65 ± 8,89
96	79,92 ± 4,38	56,02 ± 3,26	49,16 ± 4,19	50,50 ± 5,13
108	76,05 ± 3,58	-	-	-
120	67,93 ± 5,42	-	-	-
132	62,76 ± 2,47	-	-	-



**Figura 4.2.** Taxas de desenvolvimento de larvas de *Chrysomya megacephala* criadas em dietas artificiais contendo diferentes concentrações de MDMA (*ecstasy*).

**Tabela 4.4.** Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de *Chrysomya megacephala* que se desenvolveram nas diferentes concentrações de MDMA ( $n = 150$ ).

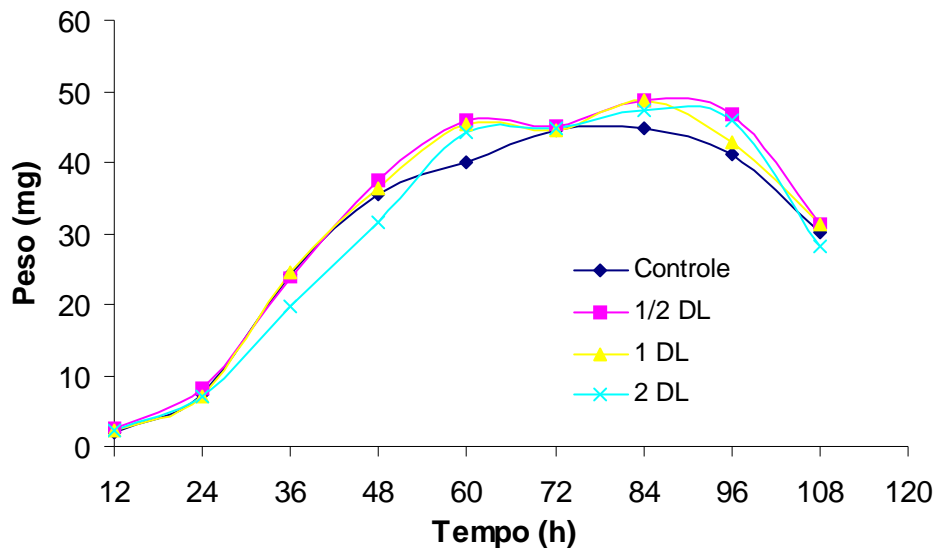
Grupo	Pupários	Adultos emergentes			Intervalo de emergência
		Machos	Fêmeas	Total	
Controle	51 (34%)	27 (18%)	22 (14,7%)	49 (32,7%)	120
1/2xDL	139 (92,7%)	60 (40%)	65 (43,3)	125 (83,3%)	120
1xDL	138 (92%)	70 (46,7%)	55 (36,7%)	125 (83,3%)	120
2xDL	134 (89,3%)	53 (35,3%)	59 (39,3%)	112 (74,7%)	120

No presente estudo nenhuma diferença foi observada no período de pupariação para as larvas de *C. albiceps* nem para *C. putoria* (Figura 4.1. e Figura 4.3.), diferentemente do observado por Carvalho (2004) que para *C. putoria*, as larvas dos grupos experimentais com anfepramona empuparam mais rapidamente que as do controle. No entanto, para *C. megacephala*, os grupos experimentais empuparam às 96 horas de experimento enquanto o grupo controle às 132 h, resultando numa diferença de 36 horas (Figura 4.2.).

Para *C. albiceps* a mortalidade larval foi baixa para todos os grupos, sendo menor a mortalidade para o grupo 2xDL e maior para os grupos controle e 1/2xDL, ou seja, quanto maior a concentração da droga menor foi a mortalidade larval (Tabela 4.2.). Goff *et al.* (1997) também observaram que a mortalidade larval e de pupa de *Parasarcopha ruficornis* foi maior nas colônias controle e 1/2xDL de MDMA e menor nas colônias 2xDL.

**Tabela 4.5.** Média de peso (em mg) e desvio padrão das larvas de *Chrysomya putoria* criadas em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações de MDMA (*ecstasy*).

Idade(h)	Controle	½ x DL	1 x DL	2 x DL
12	2,05 ± 0,00	2,51 ± 0,00	2,38 ± 0,00	2,36 ± 0,00
24	7,36 ± 0,82	8,19 ± 0,85	6,99 ± 0,73	7,13 ± 0,69
36	24,09 ± 4,40	23,54 ± 2,76	24,42 ± 3,21	19,72 ± 1,74
48	35,62 ± 2,40	37,52 ± 3,46	36,38 ± 4,57	31,68 ± 3,68
60	40,06 ± 7,45	45,93 ± 3,51	45,37 ± 6,99	44,23 ± 3,70
72	44,61 ± 3,45	45,01 ± 4,35	44,44 ± 1,92	44,66 ± 2,58
84	44,71 ± 3,71	48,73 ± 3,59	48,75 ± 3,52	47,27 ± 2,73
96	41,18 ± 2,05	46,78 ± 3,91	42,77 ± 2,29	45,91 ± 4,57
108	30,15 ± 6,22	31,26 ± 4,51	31,33 ± 3,27	28,08 ± 3,58



**Figura 4.3.** Taxas de desenvolvimento de larvas de *Chrysomya putoria* criadas em dietas artificiais contendo diferentes concentrações de MDMA (*ecstasy*).

**Tabela 4.6.** Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de *Chrysomya putoria* que se desenvolveram nas diferentes concentrações de MDMA ( $n = 150$ ).

Grupo	Pupários	Adultos emergentes			Intervalo de emergência
		Machos	Fêmeas	Total	
Controle	144 (96%)	83 (55,3%)	55 (36,7%)	138 (92%)	120
½xDL	141 (94%)	70 (46,7%)	64 (42,7%)	134 (89,3%)	120
1xDL	146 (97,3%)	67 (44,7%)	74 (49,3%)	141 (94%)	120
2xDL	134 (89,3%)	58 (38,7%)	67 (44,7%)	115 (76,7%)	144

Para *C. megacephala*, também foi observada baixa mortalidade larval para os grupos experimentais enquanto o grupo controle mostrou alta taxa de mortalidade larval, sendo que somente 34% das larvas empuparam (Tabela 4.4.). Outro fato interessante observado para a mortalidade larval de *C. megacephala* foi a de que, apesar da pouca diferença entre a taxa de mortalidade larval, quanto maior a concentração na droga na dieta, maior a taxa de mortalidade larval como tinha sido observado por Oliveira e colaboradores (2009) quando adicionaram buscopam em dietas artificiais oferecidas para imaturos de *C. megacephala* se desenvolverem.

Para *C. putoria*, a taxa de mortalidade larval foi menor para todos os grupos quando comparada com as outras espécies deste estudo, sendo as com menor mortalidade larval do grupo 1xDL e com a maior as do grupo 2xDL, sem formar um gradiente de relação entre a concentração da droga com mortalidade (Tabela 4.6.).

A taxa de mortalidade de pupas de *C. albiceps* foi menor para os grupos 1/2 xDL e 2xDL (3,3% e 4%, respectivamente) do que para os grupos controle e 1xDL (14,6% e 13,3%, respectivamente) (Tabela 4.2.). Para *C. megacephala*, apesar da baixa sobrevivência de larvas até o estágio de pupa, o grupo controle foi o que teve a menor mortalidade de larva sendo que das 51 larvas que empuparam, 49 adultos emergiram o equivalente a 96% de sobrevivência (Tabela 4.4.). A sobrevivência de pupa de *C. putoria* foi alta para todos os grupos (Tabela 4.6.).

O grupo de *C. megacephala* e *C. putoria* com maior mortalidade de pupa foi o 2xDL (Tabelas 4.4. e 4.6.). A taxa de viabilidade de adultos foi alta para todos os

grupos estudados exceto pelo grupo controle de *C. megacephala*, o que pode sugerir que a dieta a base de rumem não seja a mais adequada para esta espécie e que a presença do *ecstasy* na dieta tenha aumentado a sobrevivência. Grella *et al.* (2008) em seus estudos com dietas contendo cloridrato de oxycodone também observou alta viabilidade de adultos para as três espécies de califorídeos estudadas, *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*. Grella e colaboradores (2007) também observaram que a sobrevivência de larvas de *C. putoria* era menor conforme o aumento de concentração de escopolamina na dieta.

O intervalo de emergência foi igual quando comparados os grupos controle e experimentais de *C. albiceps*, bem como para *C. megacephala*. No caso de *C. putoria*, o grupo 2xDL demorou 24 h a mais do que os demais grupos para emergência dos adultos (Tabelas 4.2, 4.4 e 4.6), o que difere dos dados obtidos por Carvalho (2004) onde os grupos de *C. putoria* tratados com anfepramona emergiram 48 horas antes do grupo controle.

Quando considerado o tempo total de desenvolvimento (larva-adulto), não foram observadas diferenças entre os grupos de *C. albiceps*. Por outro lado, os grupos experimentais de *C. megacephala* demoraram 36 horas a menos do que as larvas do grupo controle para se desenvolverem, ou seja, o desenvolvimento total dos tratados durou 216 horas enquanto do controle 252 horas, concordando com o que foi encontrado por Goff *et al.* (1997) onde o tempo total de desenvolvimento de larvas de *Parasarcophaga ruficornis* foi menor para o grupo tratado com 2xDL de MDMA. O oposto foi observado, no presente estudo, para *C. putoria* onde o grupo 2xDL demorou 24 horas a mais para completar o desenvolvimento do que o grupo controle.

## 5 – CONCLUSÕES GERAIS

Levando em consideração os estudos relativos à influência de drogas e toxinas no desenvolvimento de imaturos de insetos, juntamente com os dados obtidos no presente trabalho, conforme exposto nos capítulos anteriores podemos concluir que:

- Drogas quimicamente próximas, tais como a metanfetamina e o *ecstasy*, podem exercer reações diferentes em espécies diferentes de moscas como observado no presente estudo para *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* quando criadas em dietas contendo anfetamina e *ecstasy*;
- Espécies diferentes se comportarão diferenciadamente quando expostas a mesma droga, conforme visto neste estudo para *C. megacephala* e *C. putoria* quando criadas em dieta contendo anfetamina e para as três espécies de *Chrysomya* estudadas quando desenvolvidas em dieta contendo *ecstasy*;
- A não detecção de droga no tecido larval por um método não é indicativo de ausência da droga no substrato do qual a larva se alimentou, mas pode ser indicativo da não metabolização da droga pelas larvas ou que tal método não seja adequado para a detecção da droga em particular.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, L. V. 1997. Toxicity of Ecstasy *In*: Saunders, N. *Ecstasy Reconsidered*. London: Neals Yard. 352 p.
- Almeida, S. P. & Silva, M. T. A. 2003. Ecstasy (MDMA): Effects and patterns of use reported by users in São Paulo. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25(1):11-7.
- Amendt, J., Krettek, R. e Zehner, R. 2004. Forensic Entomology. *Naturwissenschaften* 91:51-65.
- Amorim, J.A. & Ribeiro, O.B. 2001. Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(6): 781-784.
- Andrade, H. T. A., Varela-Freire, A. A., Batista M. J. A. & Medeiros, J. F. 2005. Calliphoridae (Diptera) Coletados em Cadáveres Humanos no Rio Grande do Norte. *Neotropical Entomology* 34(5):855-856.
- Arrais-Silva, W.W., Paffaro Jr., V. A., Yamada, A. T. & Giorgio, S. 2005. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Experimental and Molecular Pathology*, 78: 49-54.
- Barnes, R. D. & Rupert, E. E. 1993. *Zoologia dos invertebrados*. 6<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Roca. 1028 p.
- Barr, A. M., Panenka, W. J., MacEwan, G. W., Thornton, A. E., Lang, D.J., Honer, W.G. & Lecomte, T. 2006. The need for speed: an update on methamphetamine addiction. *Journal of Psychiatry Neuroscience*, 31(5):301-13. Review.
- Baumgartner, D. L. & Greenberg, B. 1984. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the new world. *Journal of Medical Entomology*, 21(1): 105-113.
- Benecke, M. 2001. A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 120: 2-14.
- Benecke, M. & Lessig, R., 2001. Child Neglect and forensic entomology. *Forensic Science International*, 120: 155-159.
- Benecke, M., Joseph, E. & Zweihoff, R., 2003. Abandono de ancianos: Entomología Forense: Casos y Consideraciones. *In*: <http://www.benecke.com/maden.html>
- Beyer, J. C., Enos, W. F. & Stajic, M. 1980. Drug identification through analysis of maggots. *Journal of Forensic Sciences*, 25: 411-12.
- Borges, M. A. Z. & Melo, A. L. 1999. Efeito da ivermectina na atratividade e na colonização de carcaças de *Rattus norvegicus* por dípteros necrófagos. *In*: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, Poços de Caldas, MG. Resumos. Belo Horizonte: SBP/, 1999. p.80.
- Bourel, B., Hédouin, V., Martin-Bouyer, L., Bécart, A., Tournel, G., Deveaux, M. & Gosset, D. 1999. Effects of Morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic Sciences*, 44 (2): 354-358.
- Bourel, B.; Fleurisse, L.; Hédouin, V.; Cailliez, J.C.; Creusy, C., Gosset, D., Goff, M.L. 2001. Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. *J. For. Sci.*, 46 (3): 596-599.

- Bourel, B., Tournel, G., Hédouin, V., Deveaux, M., Lee Goff, M. & Gosset, D. 2001. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. *Forensic Science International*, 120: 127-131.
- Brusca, R. C. & Brusca, G. J. 2007. *Invertebrados*. 2<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 968 p.
- Buzzi, Zundir José. 2002. *Entomologia Didática*. 4<sup>a</sup>. ed. Curitiba: Ed. UFPR. 348 p.
- Campobasso, C. P., Gherardi, M., Caligara, M., Sironi, L. & Introna, F. 2004. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. *Intentional Journal of Legal Medicine*, 118: 210-214.
- Carvalho, L.M.L., Thyssen, P.J., Linhares, A.X. & Palhares, F.B. 2000. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (1): 135-138.
- 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 Science International*, 120: 140-144.
- Carvalho, L. M. L. 2004. Detecção e efeito de drogas no desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (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*.
- Carvalho, L.M.L., Thyssen, P.J., Goff, M.L. & Linhares, A.X. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 5(1): 33-39.
- Catts, E. P. & Goff, M. L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 37: 253-272.
- Chapman, R. F. 1998. *The Insects – Structure and Function*. 4<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press. 770 p.
- Chasin, A. A. M. & Salvadori, M. C. 1996. Estimulantes do Sistema Nervoso Central In: Oga, S. (ed) *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu Editora, São Paulo, SP, pp 255 – 269.
- Erzinçlioglu, Z. 2003. Forensic entomology. *Clinical Medicine*, 3(1): 74-76.
- Estrada, D. A., Grella, M. D., Thyssen, P. J. & Linhares, A. X. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2):203-207.
- Falcão, L.A.R. 2006. O uso das drogas sintéticas: uma pesquisa bibliográfica. *Monografia apresentada à Faculdade de Psicologia da Universidade São Marcos – São Paulo - SP*.
- Ferrari, A.C., Soares, A. T. C., Guimarães, M. A. & Thyssen, P. J. 2008. Efeito da testosterona no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Medicina, Ribeirão Preto*, 41 (1): 30-4.
- Gangliano-Candela, R. e Aventaggiato, L. 2001. The detection of toxic substances in entomological specimens. *International Journal of Legal Medicine*, 114: 197-203.



- Goff, M. L., Omori, A. I. & Goodbrod, J. R. 1989. Effect of cocaine in tissues on the rate of development of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology*, 26: 91-93.
- Goff, M. L., Brown, W. A., Hewadikaram, K. A. & Omori, A. I. 1991. Effects of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimations of postmortem intervals using arthropod development patterns. *Journal of Forensic Sciences*, 36: 537-42.
- Goff, M. L.; Brown, W. A. & Omori, A. I. 1992. 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. *Journal of Forensic Sciences*, 37(3): 867-872.
- Goff, M. L., Brown, W. A., Omori, A. I. & LaPointe, D. A. 1993. Preliminary observations of the effect of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. *Journal of Forensic Sciences*, 38: 316-22.
- Goff, M. L. & Lord, W. D. 1994. Entomotoxicology – A new area for forensic investigation. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 15(1): 51-57.
- Goff, M. L.; Brown, W. A.; Omori, A. I. & LaPointe, D. A. 1994. Preliminary observations of the effects of phencyclidine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences*, 39(1): 123-128.
- Goff, M. L., Miller, M. L., Paulson, J. D., Lord, W. D., Richards, E. & Omori, A. I. 1997. 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. *Journal of Forensic Sciences*, 42: 276-80.
- Goff, M. L. & Lord, W. D. 2001. Entomotoxicology: Insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development *In*: Byrd JH, Castner JL (eds) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC, Boca Raton, Fla., pp 331–340.
- Grella, M. D., Estrada, D. A. & Thyssen, P. J. 2007. Scopolamine effect on the development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) and its importance for the post mortem interval estimate. *Entomologia mexicana*, 6: 870-873.
- Grella, M.D. & P.J. Thyssen. 2008. Qualitative analysis of the effect of oxycodone (opioid analgesic) on the development rate of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and its importance for estimating of the post-mortem interval in Brazil. *Annals of XXIII International Congress of Entomology*, Durban, Africa.
- Greenberg, B. 1991. Flies as Forensic Indicators. *Journal of Medical Entomology*, 28(5): 565-577.
- Greenberg, B. & Kunich, J. C. 2002. *Entomology and the law – Flies as Forensic Indicators*. Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom.

- Guimarães, J. H.; Prado, A. P. & Linhares A. X. 1978. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 22: 53-60.
- Guimarães, J. H.; Prado, A. P. & Buralli, G. M. 1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 23: 245-255.
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. 2007. *Os insetos: um resumo de entomologia*. 3<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Roca. 440 p.
- Gunatilake, M. & Goff, M. L. 1989. Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. *Journal of Forensic Sciences*, 34:714-16.
- Gunn, J. A., Shelley, C., Lewis, S. W., Toop, T. & Archer, M. The determination of morphine in the larvae of *Calliphora stygia* using flow injection analysis and HPLC with chemiluminescence detection. *Journal of Analytical Toxicology*,30: 519-523.
- Hall, Robert D. 2001. Perceptions and status of forensic entomology In: Byrd JH, Castner JL (eds) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC, Boca Raton, Fla., pp 1–15.
- Hanski, I. 1977. Biogeography and ecology of carrion flies in the Canary Island. *Annales Entomologici Fennici*. 43: 101-107.
- Hino, Y., Ojanpera, I., Rasanen, I. & Vuori, E. Performance of immunoassays in screening for opiates, cannabinoids and amphetamines in post-mortem blood. *Forensic Science International*, 131: 148-155.
- Imbiriba, A. S., Izutani, D. T., Milhoretto, I. T. & Luz, E. 1977. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba* 20: 35-39.
- Introna, F., LoDico, C., Caplan, Y. H. & Samlek, J. E. 1990. Opiate analysis of cadaveric blow fly larvae as an indicator of narcotic intoxication. *Journal of Forensic Sciences*, 35: 118-122.
- Introna, F., Campobasso, C. P. & Goff, M. L. 2001. Entomototoxicology. *Forensic Science International*, 120: 42-47.
- Kintz, P., Godelar, A., Tracqui, A., Mangin, P., Lugnier, A. A. & Chaumont, A. J. 1990a. Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine. *Journal of Forensic Science*, 35(1): 204-207.
- Kintz, P., Tracqui, A., Ludes, B., Waller, J., Boukhabza, A., Mangin, P., Lugnier, A. A. & Chaumont, A. J. 1990b. Fly larvae and their relevance to forensic toxicology, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 11(1): 63-65.
- Laurence, B. R. 1981. Geographical expansion of the range of *Chrysomya* blowflies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 130-131.
- Leal, T. T.; A. P. Prado & J. A. Antunes. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya cloropyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 41-44.
- Lord, W. D. 1990. Case studies of the use of insects in investigations. In: Catts EP, Haskell NH, eds. *Entomology and death: a procedural guide*. Clemson, SC: Forensic Entomology Specialties, 9-37.

- Mégnin, J. P. 1894. *La faune des cadavres: application de l'entomologie à la médecine légale*. Encyclopédie scientifique des Aide-mémoires, Masson et Gauthier-Villars, Paris. 224 p.
- Moro, E.T., Ferraz, A.A.F. & Módolo, N.S.P. 2006. Anestesia e o usuário de ecstasy. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 56 (2): 183-188.
- Moura, M.O., Carvalho, C.J.B. & Monteiro, E.L.A. 1997. A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Parana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(2): 269-274.
- Musvasva, E., Williams, K.A., Muller, W.J. & Villet, M.H. 2001. 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 Science International*, 120: 37-41.
- Nappo, Solange A. 2001. Droga mais poderosa que o crack pode chegar ao Brasil. *Psiquiatria na prática médica - UNIFESP*, 34(2).
- Nolte, K. B., Pinder, R. D. & Lord, W. D. 1992. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. *Journal of Forensic Sciences*, 37(4): 1179-1185.
- Nuorteva, P. 1974. Age determination of a blood stain in a decaying shirt by entomological means. *Forensic Science*, 3: 89-94.
- Nuorteva, P. 1977. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeschi GC, Eckert WG, Tedeschi LG, eds. *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards*; vol 2. Philadelphia, 1072-1095.
- Nuorteva, P. & Nuorteva, S. L. 1982. The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. *Ambio*, 11: 34-37.
- O'Brien, C. & Turner, B. 2004. Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. *International Journal of Legal Medicine*, 118: 188-189.
- Oliveira, H. G., Gomes, G., Morlin Jr., J. J., Von Zuben, C. J. & Linhares, A. X. 2009. The effect of Buscopan on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic Science*, 45 (1): 202-206.
- Passagli, M. & Carvalho, P. D. S. 2007. Drogas estimulantes do sistema nervoso central. In: Passagli, M. (ed) *Toxicologia Forense – Teoria e Prática*. Millennium Editora, Campinas, SP, pp 113–154.
- Pien, K., Laloup, M., Pipeleers-Marichal, M., Grootaert, P., De Boeck, G., Samyn, N., Boonen, T., Vits, K. & Wood, M. Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. *International Journal of Legal Medicine*, 118: 190-193.
- Quinton, M.S. & Yamamoto, B. 2006. Causes and consequences of methamphetamine and MDMA toxicity. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 8(2): article 38.
- Ribeiro, M. & Marques, A.C.P.R. 2002. Abuso e dependência – Anfetamina. *Projeto Diretrizes – Associação Brasileira de Psiquiatria*, p. 53-59.
- Sadler, D. W., Fuke, C., Court F. & Pounder, D. J. 1995. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. *Forensic Science International*, 71: 191-197.

- Sadler, D. W., Robertson, L.; Brown, G.; Fuke, C. & Pounder D. J. 1997. Barbiturates and Analgesics in *Calliphora vicina* larvae. *Journal of Forensic Sciences*, 42(3): 481-485.
- Silva, O. A. & Yonamine, M. 2004. Drug abuse among workers in Brazilian regions. *Revista de Saúde Pública*, 38(4): 552-556.
- Tracqui, A., Keyser-Tracqui, C., Kintz, P. & Ludes, B. 2004. Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? *International Journal of Legal Medicine*, 118: 194-196.
- Velásquez, Y. 2008. A checklist of arthropods associated with rat carrion in a montane locality of northern Venezuela. *Forensic Science International*, 174: 67-69.
- Vincent, C.; Kevan D. K. McE.; Leclercq, M. & Meek, C.L. A bibliography of forensic entomology. *Journal of Medical Entomology*, 22(2): 212-219.
- Von Zuben, C.J. 2001. Zoologia Aplicada: Recentes avanços em estudos de entomologia forense. *Entomologia y Vectores*, 8(2): 173-183.
- Vuori, E., Ojanperä, I., Nieminen, R., Savolainen, T., Wahlsten, P. & Jäntti, M. 2003. Death following ingestion of MDMA (ecstasy) and moclobemide. *Addiction*, 98: 365-368.
- Yonamine, M. 2004. A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais. *Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas*.
- Wigglesworth, V. B. 1972. *The principles of Insect Physiology*. 7<sup>a</sup> ed. London: Chapman & Hall Ltd. 827 p.
- Wolff, M.; Uribe, A.; Ortiz, A. & Duque, P. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. *Forensic Science International*, 120: 53-59.