

Efeito da escopolamina sobre o desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) e sua importância para a estimativa do intervalo pós-morte

P.J. Thyssen*, M.D. Grella

Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas (SP), Brasil

* E-mail para correspondência: thyssenpj@yahoo.com.br. Tel.: +55-19-35216299.

Recebido em 28/06/2011; Aceito em 01/09/2011

RESUMO

A presença de drogas nos tecidos de um corpo pode afetar o desenvolvimento de larvas de moscas necrófagas que são encontradas alimentando-se neste substrato. Essa observação já foi constatada para várias drogas tais como heroína, cocaína, certos analgésicos, e compostos anfetamínicos e benzodiazepínicos, entre outras. Assim, neste estudo investigamos o efeito da escopolamina – uma droga amplamente usada como analgésico – sobre a taxa de desenvolvimento de larvas de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae), visando também avaliar e quantificar as consequências de tal interferência para a estimativa do intervalo pós-morte (IPM). Os resultados aqui obtidos mostram claramente que a escopolamina afetou significativamente a taxa de desenvolvimento de imaturos de *C. putoria*, quando presente em seu substrato alimentar. Tendo em vista que o IPM em muitos casos é calculado levando em consideração o peso ou a idade dos imaturos coletados em um corpo, a não consideração deste fator de interferência negativa pode conseqüentemente levar a uma subestimativa do tempo de morte em até 48 horas, em certos casos.

Palavras-chave: Mosca varejeira; Entomologia Forense; Toxicologia; Brasil.

ABSTRACT

The presence of drugs in the tissues of a corpse may affect the development of the necrophagous fly larvae feeding on the body. This observation has already been reported for several drugs such as heroine, cocaine, several analgesics, and amphetamines and benzodiazepines compounds, among others. In this study we investigated the effect of scopolamine - a drug widely used as analgesic - on the rate of development of larvae of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae), to also evaluate and quantifying the consequences of this interference for estimating the postmortem interval (PMI). The results obtained here clearly show that scopolamine has significantly affected the developmental rate of the immatures of *C. putoria*, when present in their substrate. Since the PMI in many cases is calculated taking into account the weight or age of the immatures collected in a body, the failure to consider this factor of negative interference may therefore lead to an underestimation of the time of death up to 48 hours in certain cases.

Keywords: Blowfly; Forensic Entomology; Toxicology; Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Corpos de animais em decomposição são fontes alimentares temporárias para diversos organismos tais como fungos, bactérias, artrópodes e até mesmo vertebrados [1]. Neste micro-habitat formado, os imaturos de dípteros e coleópteros (Insecta) são as Ordens predominantes durante quase toda a colonização [2].

Dentro do contexto forense, o estudo de insetos e outros artrópodes associado aos demais procedimentos periciais tem como principal propósito levantar informações e vestígios que possam ter valia para o andamento ou conclusão de um processo investigativo [3]. Desse modo, os dados entomológicos podem ser transformados em provas contundentes para a condenação ou refutação do álibi de um suspeito de crime ao demonstrar se houve, por exemplo, movimentação de um cadáver de um local para outro ou quando usados para estimar o intervalo pós-morte (IPM), ou seja, o

tempo decorrido desde a morte até a descoberta do corpo [4]-[5].

Atualmente, um ramo mais recente da entomologia forense – a Entomotoxicologia – tem revelado novas abordagens e alternativas para detecção de drogas ou toxinas em cadáveres, em especial àqueles que se apresentam em avançado estágio de decomposição e com suspeita de envenenamento, dada a não disponibilidade dos líquidos corporais como, por exemplo, sangue e urina, ou de tecidos moles, que constituem órgãos internos primariamente pesquisados para este fim [6]. Nesse caso, a identificação de uma substância que tenha sido consumida pela vítima antes do óbito pode ser obtida por meio do exame das larvas de insetos que são encontradas alimentando-se dos tecidos cadavéricos, uma vez que elas incorporam a substância em seus tecidos larvais por meio do processo metabólico pós-digestão. Entre as técnicas usualmente empregadas na identificação de substâncias, estão a cromatografia [7]

Tabela 1. Médias para o peso registrado (mg) (\bar{x} ±SD) a cada 12 h durante o desenvolvimento larval de *Chrysomya putoria* exposta às diferentes concentrações de escopolamina e em relação ao grupo controle, onde (a) representa o fim do segundo estágio larval; (b) marca o fim do terceiro estágio larval; (c) início da fase de pupa; e (d) 100% de mortalidade dos indivíduos no segundo estágio.

Idade (h)	Grupos experimentais				
	Controle	0,25 x DL	0,5 x DL	1 x DL	2 x DL
12	0,2±0,01	0,2±0,01	0,1±0,01	0,1±0,01	0,1±0,01
24	0,7±0,01	0,7±0,01	0,4±0,01	0,3±0,01	0,2±0,01
36	2,1±0,45	1,7±0,39	0,9±0,01	0,5±0,01	0,2±0,01
48	6,2±1,30	4,2±0,77	3,1±0,53	1,0±0,01	0,3±0,01
60	15,4±2,51 (a)	10,2±1,31 (a)	6,6±1,52 (a)	2,5±0,58	0,5±0,01 (d)
72	25,9±5,12	21,0±2,23	10,1±2,11	4,0±0,91	-
84	37,6±4,14	33,4±4,31	19,4±3,16	6,7±1,43 (a)	-
96	41,1±5,87	39,8±2,17	28,7±3,71	10,9±3,02	-
108	49,0±1,93	45,6±2,76	35,6±3,94	16,7±4,92	-
120	46,2±2,60 (b)	44,5±3,50 (b)	38,6±3,53	20,6±8,10	-
132	46,1±4,95	44,5±2,51	43,4±2,45	24,0±6,76	-
144	42,1±2,64	39,3±2,05	39,9±3,28 (b)	24,6±5,47	-
156	35,6±3,83 (c)	35,5±1,14 (c)	42,7±2,89	23,1±5,56	-
168	-	-	37,1±2,17	26,8±2,82	-
180	-	-	32,9±2,50 (c)	28,9±1,60 (b)	-
192	-	-	-	28,6±2,96	-
204	-	-	-	24,9±4,29 (c)	-

Tabela 2. Intervalo de emergência (h) e taxa de viabilidade (%) de *Chrysomya putoria* em relação aos diferentes grupos experimentais. *No grupo 2 x DL a mortalidade de 100% dos indivíduos foi registrada no segundo estágio larval, assim os mesmos parâmetros relatados para os demais grupos não puderam ser observados.

Grupos experimentais*	Intervalo de emergência (h)	Taxa de viabilidade (%)
Controle	254	95,6
0,25 x DL	252	93,2
0,5 x DL	288	76,2
1 x DL	312	69,2

e a imunohistoquímica [8].

Pelo fato de certas substâncias poderem afetar o desenvolvimento das larvas ditas necrófagas, tal como fora registrado para heroína [9], cocaína [10], escopolamina [11], alguns analgésicos e compostos anfetamínicos e benzodiazepínicos [12]-[14], estudos que investigam e quantificam este grau de interferência sobre os aspectos biológicos de diferentes espécies ganham elevada importância. Isto porque o IPM estimado pelos métodos entomológicos na maioria das vezes usa como parâmetro o tempo de vida ou a idade do inseto, levando em conta as possíveis influências que pairam sobre este ciclo.

A escopolamina, comercialmente mais conhecida como Buscopan® (Boehringer Ingelheim), está entre os primeiros analgésicos de ampla utilização no Brasil atuando como depressor do sistema nervoso central [15]. Registros de intoxicação por esse alcalóide não são raros, tanto por ingestão deliberada quanto acidental, uma vez

que também se encontra incluído em demais preparações comerciais [16].

Neste estudo, investigamos o efeito da escopolamina sobre a taxa de desenvolvimento larval de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), uma mosca assinalada como de importância forense na região Sudeste do Brasil [17], objetivando avaliar e quantificar as consequências de tal interferência para a estimativa do IPM.

2. METODOLOGIA

Os espécimes usados neste estudo foram obtidos de colônias de moscas adultas de *C. putoria* estabelecidas em laboratório, a partir de coletas em campo realizadas na área urbana do município de Campinas (22°54'02"S, 47°03'39"O), Estado de São Paulo, Brasil. Para tanto foram usadas armadilhas adaptadas para este fim contendo iscas como peixe e vísceras de frango, as quais permaneceram expostas por um período de 24 h.

Após a coleta, os espécimes foram submetidos a baixas temperaturas (-20°C durante 90 segundos) para permitir a correta triagem e identificação do organismo foco deste estudo [18], sendo então transferidos para gaiolas plásticas transparentes (30x30x50 cm), mantidas em sala climatizada (27±1°C, 12 h de fotofase e 70±10% de UR), onde os adultos foram alimentados com solução açucarada e água ad libitum. Uma porção de 50 g de carne bovina moída crua foi oferecida para as fêmeas para estimular a oviposição. Os ovos depositados pelas fêmeas foram mantidos sobre esse substrato até que as

larvas eclodissem, permitindo assim iniciar a montagem dos grupos experimentais.

Considerando que a dose letal (DL) de escopolamina para o homem é de 1270 mg/kg, quatro grupos experimentais foram montados com as seguintes concentrações: 0,25 x DL; 0,5 x DL; 1 x DL e 2 x DL. Paralelamente um grupo controle, sem adição da droga, foi mantido sob as mesmas condições para avaliar o efeito do tratamento. Para cada grupo foram feitas três réplicas, das quais eram retiradas amostras aleatoriamente para registro da massa corporal das larvas (10 espécimes a cada 12 h, desde a eclosão da larva até a pupariação ou enquanto era possível encontrar imaturos vivos) e do tempo de desenvolvimento (considerando cada estágio e o estágio imaturo total) frente cada tratamento, além do cálculo da taxa de viabilidade (percentagem de sobrevivência até atingir o estágio adulto).

Cada réplica era representada por um grupo de 150 larvas acondicionadas em potes plásticos, devidamente identificados e contendo dieta artificial própria para o desenvolvimento de insetos necrófagos [19]. Nos grupos experimentais, cujo objetivo era observar o efeito da droga sobre o desenvolvimento, foram acrescentadas diferentes concentrações de escopolamina na e durante o preparo da dieta.

Para comparar o efeito dos tratamentos sobre a taxa de desenvolvimento larval considerando a variação do peso como variável resposta foi feita uma ANOVA de um fator com auxílio do programa estatístico S.A.S. [20].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de desenvolvimento de *C. putoria*, mensurada pelo ganho de massa corpórea, foi significativamente influenciada pela presença de escopolamina ($F= 3,383$; $p= 0,0141$) no substrato alimentar utilizado por esta espécie, como mostrado na Fig. 1. A mesma observação é válida com relação ao tempo total de vida do inseto em seu estágio imaturo, ou seja, desde a eclosão até a pupariação Tab.(1) incluindo o intervalo de emergência (que antecede o nascimento dos adultos) Tab.(2), principalmente quando em exposição às altas concentrações da droga.

Se fosse levada em conta apenas a fase larval para estimar o IPM, por exemplo, imaturos provenientes dos grupos 0,5 x DL (= 635 mg/kg) e 1 x DL (= 1270 mg/kg) atingiriam a fase de pupa somente 24 e 48 h depois do grupo controle, respectivamente, sendo que os intervalos são ainda maiores quando adicionados os limites de tempo até o nascimento dos adultos, de 58 e 106 h, respectivamente, ou 2,4 e 4,4 dias. Essa observação, em conjunto com a publicada por Oliveira e colaboradores [21] que registraram um efeito similar da escopolamina sobre o desenvolvimento da espécie *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), justifica a relevância na investigação da presença de tal substância nos tecidos/órgãos de um cadáver, assim

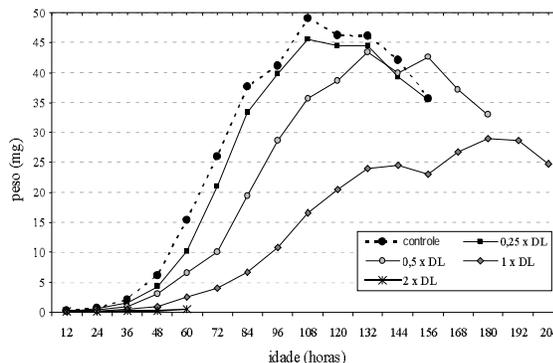


Figura 1. Curvas de desenvolvimento de *Chrysomya putoria* na fase larval criada sob diferentes concentrações de escopolamina em relação ao grupo controle.

como nas larvas de insetos que são recolhidas do corpo, quer seja na busca da causa da morte [22] ou para estimar o tempo de óbito.

Um dos primeiros trabalhos que corrobora a possibilidade do uso de insetos para aferir um caso de morte causado por overdose de barbitúricos foi feito por Beyer e colaboradores [23], o qual denota a aplicação prática da entomotoxicologia tal como presumido acima. Neste, os autores registram como foi feita a detecção de fenobarbital em tecidos larvais de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1805) (Diptera: Calliphoridae) a partir de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia de camada fina (em inglês TLC).

É possível salientar ainda que apenas concentrações a partir de 0,5 x DL exerçam um efeito inibidor no crescimento de *C. putoria*, visto que as larvas submetidas à concentração de 0,25 x DL (= 317,5 mg/kg) apresentaram ganho de massa corpórea e tempo de desenvolvimento próximos ao controle.

A taxa de viabilidade registrada para *C. putoria* decresceu à medida que as concentrações de escopolamina na qual cada grupo tratado foi exposto aumentavam, exceto para 0,25 x DL Tab.(2). Para os imaturos expostos a 2 x DL (= 2540 mg/kg) as consequências passam a ser negativas ou deletérias, visto que 100% dos indivíduos morreram decorridas apenas 60 h de eclosão, com um ganho de peso bem inferior ao que fora observado no grupo controle até as 24 h de vida. Assim, em casos que envolvam o encontro de larvas que apresentem este tipo de padrão de desenvolvimento – eclosão dos ovos, porém retardo no crescimento ou alta mortalidade –, a exposição a uma substância tóxica, não se restringindo somente a escopolamina, deve ser prioritariamente considerada.

Demais estudos que vem sendo conduzidos com várias espécies de moscas das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera), por serem estas as pioneiras na colonização de cadáveres, expostas à diversas classes de substâncias sugerem que o desenvolvimento larval responde diferentemente tanto em relação ao tipo e concentração da droga quanto a espécie considerada

para o estudo. Embora as observações aqui feitas estejam restritas a apenas poucas espécies de moscas, não se pode descartar que variações similares sobre o desenvolvimento larval possam ocorrer com outras espécies de varejeiras que eventualmente se alimentem em tecidos contendo escopolamina ou seus metabólitos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos mostram claramente que a escopolamina afeta significativamente a taxa de desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya putoria*, quando presente em seu substrato alimentar. Tendo em vista que o IPM em muitos casos é calculado levando em consideração o peso ou a idade dos imaturos coletados em um corpo, a não consideração deste fator de interferência negativa pode conseqüentemente levar a uma subestimativa do tempo de morte.

AGRADECIMENTOS

Este estudo contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na forma de concessão de bolsa e auxílio à pesquisa, modalidade Projeto Temático (processos nº 06/55206-9, 05/54480-7 e 04/08544-0).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1] K.G.V. Smith. A manual of forensic entomology, Cornell University Press, United States of America (1986) 205p.
- [2] P. Nuorteva. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeshi, C.G.; Eckert, W.G.; Tedeshi, L.G. (eds.). Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards, United States of America (1977) 1072-1095.
- [3] P.J. Thyssen. Entomologia Forense. In: C.B. Marcondes. Entomologia médica e veterinária, Atheneu, Brasil (2011) 129-137.
- [4] B. Keh. Scope and applications of forensic entomology. Ann. Rev. Entomol. 30: 137-154 (1985).
- [5] S.L. VanLaerhoven; G.S. Anderson. Insect succession on buried carrion in two biogeoclimatic zones of British Columbia. J. Forensic Sci. 38: 702-707 (1999).
- [6] F. Introna; C.P. Campobasso; M.L. Goff. Entomotoxicology. Forensic Sci. Int. 120: 42-47. (2001).
- [7] L.M.L. Carvalho; A.X. Linhares; J.R. Trigo. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. Forensic Sci. Int. 120: 140-144 (2001).
- [8] B. Bourel; L. Fleurisse; V. Hédouin; J.C. Cailliez; C. Creusy; D. Gosset; M.L. Goff. Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. J. Forensic Sci. 46: 596-599 (2001).
- [9] F. Introna; C. Dico; Y.H. Caplan; J.E. Smialek. Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. J. Forensic Sci. 35: 118-122 (1990).
- [10] M.L. Goff; A.I. Omori; J.R. Goodbrod. Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boetcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). J. Med Entomol. 26: 91-93 (1989).
- [11] H.G. Oliveira; G. Gomes; J.J. Morlin-Jr; C.J.V. Zuben; A.X. Linhares. The effect of Buscopan® on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). J. Forensic Sci. 54: 202-206 (2009).
- [12] D.W. Sadler; L. Robertson; G. Brown; C. Fuke; D.J. Pounder. Barbiturate and analgesics in Calliphora vicina larvae. J. Forensic Sci. 42: 481-485 (1997).
- [13] M.L. Goff; W.A. Brown; A.I. Omori. 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. J. Forensic Sci. 37: 867-872 (1992).
- [14] K. Pien; M. Laloup; M. Pipeleers-Marichal; P. Grootaert; G.D. Boeck; N. Samyn; T. Boonen; K. Vits; M. Wood. Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. Int. J. Legal Med. 118: 190-193 (2004).
- [15] J.H. Brown; P. Taylor. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: L.S. Goodman; A.G. Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics, Canada (1996) 141-60.
- [16] A.M.D. Goth. Farmacologia Médica, Guanabara Koogan, Brasil (1981) 96-106.
- [17] L.M.L. Carvalho; P.J. Thyssen; A.X. Linhares; F.B. Palhares. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95: 135-138 (2000).
- [18] C.J.B. Carvalho; P.B. Ribeiro. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 9: 169-173 (2000).
- [19] D.A. Estrada; M.D. Grella; P.J. Thyssen; A.X. Linhares. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. Neotrop. Entomol. 38: 203-207 (2009).
- [20] SAS Inc. SAS for Microsoft Windows Professional, version 9.1, United States of America (2006) 1028p.
- [21] H.G. Oliveira; G. Gomes; J.J. Morlin Jr; C.J. Von Zuben; A.X. Linhares. The effect of Buscopan® on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). J. Forensic Sci. 54: 202-206 (2009).
- [22] C.P. Campobasso; M. Gherardi. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. Int. J. Legal Med. 118: 210-214 (2004).
- [23] J.C. Beyer; W.F. Enos; M. Stajic. Drug identification through analysis of maggots. J. Forensic Sci. 25: 411-412 (1980).