

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE DÍPTEROS DE INTERESSE FORENSE: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS METODOLOGIAS

LETÍCIA BRAATZ FERREIRA¹; KATHLEEN TAVARES WINKEL¹; LUCAS MORAES BERNEIRA¹; MARCO AURELIO ZIEMANN DOS SANTOS²; PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN³; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA²

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Bacharelado em Química Forense – leticia.b1995@hotmail.com, kathwinkel@gmail.com, lucas.berneira@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) – marczziemann@gmail.com, claudiochemistry@gmail.com

³Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Departamento de Biologia Animal, IB.

1. INTRODUÇÃO

A entomologia forense aplica os conhecimentos de desenvolvimento e ecologia de insetos à investigações criminais e disputas judiciais (PUJOL-LUZ et al., 2008). Os quais podem ser evidências tão importantes quanto os outros vestígios encontrados em locais de crimes, como impressões digitais, fios de cabelo e projéteis de arma de fogo (CATTS; GOFF, 1992; DOREA; STUMVOLL; QUINTELA, 2005).

Um dos dípteros que apresentam grande interesse forense é *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae), conhecida popularmente por mosca-varejeira, pode auxiliar na estimativa do intervalo pós morte (IPM), que envolve o intervalo mínimo e máximo do tempo de ocorrência da morte até o momento da descoberta do corpo (GOMES, 2012). Além disso, pode ser útil na extração de material genético, avaliação da presença de drogas e outras substâncias, atuando diretamente no processo de decomposição (OLIVEIRA-COSTA et al., 2013).

A identificação adequada dos insetos é o elemento mais importante no campo da entomologia forense (BYRD, CASTNER, 2010). Neste contexto, a quimiotaxonomia pode trazer alguns avanços para facilitar o trabalho dos investigadores (DRIJFHOUT, 2010).

A superfície da cutícula de um inseto é coberta por uma camada fina de lipídeos, biomoléculas essenciais, presentes na maioria dos seres vivos. Dentre essa classe química, os ácidos graxos (AGs) são os seus principais representantes (NARVAÉZ-RIVAS M.; LEÓN-CAMACHO, 2016).

A extração de AGs pode ser realizada através de metodologias convencionais como a FOLCH; LEES; SLOANEY (1957) e BLIGH; DYER (1959), ambos utilizando solventes clorofórmio: metanol, no entanto, os volumes de solventes de FOLCH; LEES; SLOANEY (1957) são muitos elevados em relação aos utilizados no BLIGH; DYER (1959). Outros métodos para extração de ácidos graxos vêm sendo estudados, uma alternativa interessante é a de GOLEBIEWSKI et al. (2008), na qual a amostra não precisa ser triturada e utiliza solventes como: éter de petróleo e diclorometano.

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo realizar a extração de ácidos graxos presentes em *Chrysomya megacephala*, através das técnicas de BLIGH; DYER (1959) e GOLEBIEWSKI et al. (2008) de forma a avaliar eficiência e potencial de extração em uma análise qualitativa.

2. METODOLOGIA

Coleta e manutenção dos espécimes

Adultos de *Chrysomya megacephala* foram coletados no campus Capão do Leão através de armadilhas modificadas, propostas por MORETTI et al. (2009), utilizando como isca fígado bovino. Após a coleta, os espécimes foram identificados e mantidos em gaiolas plásticas transparentes com aberturas laterais vedadas com telas. Os adultos foram alimentados com dieta a base de açúcar e proteína (ESTRADA et al., 2009) e mantidas sob condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C) e umidade relativa (70 ± 10 %).

Para estimular a postura foi fornecida carne bovina moída crua que ficou na gaiola por 2 horas, em seguida foi acondicionada em um sistema duplo fechado com organza, contendo serragem úmida, onde permaneceram até a pupariação. As pupas foram transferidas para potes de vidro até emergirem os adultos.

Extração e identificação de Ácidos Graxos

Para a extração de ácidos graxos foram utilizadas amostras, previamente liofilizadas, de 1g de machos e 1g de fêmeas de *C. megacephala*, recém emergidos, em triplicata, utilizando as metodologias de BLIGH; DYER (1959) (BD) e GOLEBIEWSKI et al. (2008) (GB).

Em ambas as metodologias, as amostras contendo os ácidos graxos foram derivatizadas utilizando reagente de HARTMANN (HARTMANN; LAGO 1973). Posteriormente, foram diluídas em hexano e analisadas em Cromatografia a gás com detector por ionização em chama (GC-FID). Para identificação dos ésteres de ácidos graxos foi utilizado o padrão FAME mix-37 (Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica de dípteros de *Chrysomya megacephala* revelou um perfil de ácidos graxos (AGs) conforme descrito na Tabela.

Tabela. Perfil de ácidos graxos de machos e fêmeas de *Chrysomya megacephala* a partir de duas metodologias de extração.

Ácidos Graxos	BD		GB (externo)		GB (interno)	
	Macho (%)	Fêmea (%)	Macho (%)	Fêmea (%)	Macho (%)	Fêmea (%)
C14:0 mirístico	2,16	2,60	4,84	3,84	2,28	2,58
C16:0 palmítico	21,19	20,03	22,12	21,11	20,91	22,17
C16:1 palmitoleico	8,50	10,42	6,89	7,27	10,93	10,43
C18:0 esteárico	5,42	6,18	8,24	6,55	5,68	5,86
C18:1n9c oleico	33,21	36,24	30,87	34,5	40,82	41,56
C18:2n6c linoleico	15,89	9,99	5,66	6,04	9,21	8,03
C18:3n3 α -linolênico	4,91	4,42	14,67	14,91	1,54	1,43
C18:3n6 γ -linolênico	--	--	--	--	0,51	0,67
C20:0 araquídico	--	--	--	--	0,41	0,43
C20:3n3 eicosatrienóico	1,66	1,30	4,94	--	--	--
C20:4n6 araquidônico	3,03	4,37	1,77	3,94	--	--
C22:0 behênico	--	--	--	--	--	3,72
C24:0 lignocérico	1,58	1,20	--	--	0,66	--
C20:4n6 araquidônico	--	--	--	--	4,04	3,12
C20:5n3 eicosapentaenóico EPA	2,45	3,25	--	1,84	3,01	--
TOTAL	100	100	100,02	100	100	100

*BD - Bligh; Dyer (1959); GB - Golebiowski et al. (2008); %em área.

Com base nos dados obtidos se pode verificar que ambas as metodologias foram eficientes na extração e identificação de ácidos graxos, onde a prevalência de AGs insaturados variou de 63 a 70%. Contudo, a cadeia carbônica variou de C14 a C20.

Destaca-se a presença majoritária de C16:0 e C18:1n9c, com valores expressivos, em ambas as metodologias. Altas concentrações desses mesmos AGs também foram obtidos em machos e fêmeas de *Lucilia sericata*, uma outra espécie de mosca varejeira (GOLEBIEWSKI et al. 2012).

A técnica de GB apresentou uma maior sensibilidade, pois somente nesta técnica houve extração de C18:3n6, C20:0, C22:0 e C20:4n6, todos estes na amostra de AGs internos, entretanto em baixas concentrações.

O método de BD é muito eficiente na extração de ácidos graxos de diversos tipos de amostras biológicas, porém ainda é preciso que outras avaliações sejam realizadas, a fim de desvendar o potencial na análise de ácidos graxos em moscas.

Tendo em vista os procedimentos das técnicas utilizadas, a metodologia de GOLEBIEWSKI et al. (2008) mostrou-se mais promissora, já que não há destruição das amostras e estas seguem viáveis para outros tipos de identificação, seja taxonômica, molecular ou ainda quimiotaxonomica.

4. CONCLUSÕES

É possível a extração de ácidos graxos de machos e fêmeas de *Chrysomya megacephala* através das metodologias de BLIGH; DYER (1959) e GOLEBIEWSKI et al. (2008), sendo esta última um pouco mais sensível e não exigindo grandes técnicas de laboratório.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. Canadá, v.37. p.911-917, 1959.
- BUCKNER, J. S. Cuticular polar lipids of insects. In: STANLEY-SAMUELSON, D. W., NELSON, D. R. **Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology**. University of Nebraska Press, Lincoln 1993. p.227-270.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. **Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. Flórida: CRC Press LLC, 2001.
- CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**. Estados Unidos, v.37, p.253-272, 1992.
- DOREA, L. E. C.; STUMVOLL, V. P.; QUINTELA, V. **Criminalística**. Campinas, SP: Millenium Editora, 2005.
- DRIJFHOUT, F. P. Cuticular Hydrocarbons: A New Tool in Forensic Entomology?. In: AMENDT, J.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L.; GRASSBERGER, M. **Current Concepts in Forensic Entomology**. Springer, 2010.
- ESTRADA, D. A.; GRELLA, M. D.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. **Neotropical Entomology**. Londrina, v.38. n.2. p. 203-207, 2009.
- Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Fiocruz, 2010.

- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**. V.226, p.497-509, 1957.
- GOLEBIEWSKI M.; MALINSKI E.; BOGUS M. I.; KUMIRSKA J.; STEPNOWSKI P. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford. v. 38. p. 619–627, 2008.
- GOLEBIEWSKI, M.; MIECZYSLAWA, I. B; PASZKIEWIEZ, M.; WIELOCH, W.; WTÓKA, E.; STPENOSWKI, P. The composition of the cuticular and internal free fatty acids and Alcohols from *Lucilia sericata* males and females. **Lipids**, Gdansk, v.47, p.613–622, 2012.
- GOMES, G. **Aspectos fisiológicos de chrysomyamegacephala (f.)(diptera: calliphoridae): metabolismo energético, termorregulação e neurofisiologia**. 2012. Tese (Doutorado em ciências biológicas, área de zoologia). Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**. v.22. n.6. p.475, 1973.
- LOCKEY K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative biochemistry and physiology**. v.89B. p.595-645, 1988.
- MORETTI, T.C.; THYSSEN, P.J.; SOLIS, D. R. Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). **Entomologia Generalis**, v.31, p349-353, 2009.
- NARVAÉZ-RIVAS, M.; LEÓN-CAMACHO. Fatty Acids: Determination and Requirements. **Encyclopedia of food and health**. Seville, Espanha. v.2. p.609-614. 2016.
- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense, Quando os insetos são vestígios**. Campinas: Millennium, 2013.
- PUJOL-LUZ, J. R.; ARANTES, L. C.; CONSTANTINO, R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**. Curitiba, v.52, n.4, p.485-492, 2008.