

INFLUÊNCIA DO PREPARO DE AMOSTRA NA ANÁLISE QUÍMICA DE INSETOS PARA FINS FORENSES

KATHLEEN TAVARES WINKEL¹, LETÍCIA BRAATZ FERREIRA¹, CAROLINE CARAPINA DA SILVA¹, BRUNA SILVEIRA PACHECO¹, BRUNO NUNES DA ROSA¹, CLAUDIO M. P. DE PEREIRA^{1*}

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – kathwinkel@gmail.com; lahbbioupel@gmail.com; *claudiochemistry@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As Ciências Forenses são compostas por grandes áreas interdisciplinares e cada uma tem sua importância singular, dentre elas está a Entomologia Forense (PUJOL-LUZ et al., 2008). Dias Filho; Francez (2016) afirmam que dentre as várias questões com as quais o perito criminal se depara quando avalia um caso de morte violenta é “quando ocorreu a morte”. Os insetos podem auxiliar a várias circunstâncias relativas ao crime, tais como o intervalo pós morte (IPM), quando um corpo foi movido para um segundo local depois da morte, se foi em algum momento manipulado por animais ou se fez uso de entorpecentes. Dentre os dípteros, *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae) apresenta considerável importância em diversas áreas deste estudo, inclusive na estimativa do IPM.

Para as análises dos mais diversos tipos de compostos ou substâncias é importante a aplicação de um preparo da amostra, especialmente para sólidas. Como preparo da amostra busca-se evitar o máximo de erros para obter os melhores resultados possíveis. Processos como moagem e secagem são alguns exemplos de preparo a serem aplicados às amostras antes do emprego de um método de extração (GOSSELIN, 2010; EL-SAMAD; EL-MOATY; MAKEMER, 2011).

Os insetos são constituídos de biomoléculas essenciais como os lipídios, sendo ácidos graxos grandes representantes desta classe. Esses lipídios em geral apresentam grande importância para a proteção do inseto, evitando a perda de água e, além disso, podem auxiliar na identificação de espécie por meio de análise quimiométrica (BYRD; CASTNER, 2010).

Análises de substâncias químicas nos insetos estão atraindo cada vez mais os olhares dos químicos, que podem trazer muitos avanços através de métodos analíticos e seus conhecimentos sobre estas técnicas, as quais aliadas à experiência de biólogos tomam os conhecimentos necessários. Diante disto, o trabalho tem como objetivo analisar diferentes formas de preparo de amostra buscando obter melhores resultados para análise química de insetos para fins forenses.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta e Manutenção dos espécimes

Exemplares de *Chrysomya megacephala* foram coletados em ambiente urbano, de forma ativa. Após a coleta, os indivíduos foram mantidos em gaiolas plásticas e transparentes. Foram alimentados com dietas à base de açúcar e proteína, onde ficaram mantidos sob temperatura controlada ($\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas (h).

O estímulo para postura foi realizado disponibilizando carne bovina no interior das gaiolas por aproximadamente 2 h. Após esse período a carne com postura foi retirada das gaiolas e colocada em um sistema duplo fechado com organza, contendo serragem úmida, até o período de pupariação. Posteriormente as pupas foram transferidas para potes de vidros até a emergência dos adultos.

2.2 Preparo da amostra, extração e derivatização de ácidos graxos

Os imaturos com 96 h de desenvolvimento foram retirados do meio, lavados em água destilada, secos em papel filtro e pesados. Em seguida foram armazenados por 24 h em ultra freezer (- 80 °C), onde uma fração foi liofilizada por 48 h e pesada para análise do teor de umidade.

Para extração dos ácidos graxos (AGs) foram pesadas 4 amostras contendo 1,0 g cada, as quais foram classificadas como ML (Macerada e Liofilizada), M (macerada não liofilizada), IL (Inteira Liofilizada) e I (Inteira não liofilizada).

O método de extração realizado foi Bligh;Dyer (1959) modificado, onde foi utilizado uma mistura de clorofórmio, metanol e solução aquosa de sulfato de sódio, sob agitação à temperatura ambiente. A fase orgânica foi separada e evaporada em rotaevaporador.

Os lipídeos extraídos foram submetidos ao processo de derivatização baseado na metodologia de Hartman; Lago (1973), utilizando solução metanólica de NaOH a 0,5 M e reagente de Hartman sob refluxo a 80 °C. Os AGs foram convertidos a seus ésteres, sendo a fase orgânica separada e evaporada em rotaevaporador.

As amostras derivatizadas foram diluídas em hexano e padrão interno (C19:0) e analisadas em um Cromatógrafo a Gás com Detector por Ionização em Chama (GC-2010, Shimadzu). As análises qualitativa e quantitativa foram realizadas por área normalizada utilizando padrão C4C24 (FAME 37-Mix - Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, EUA) e o programa CG Solution.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bligh; Dyer (1959) é uma metodologia de extração amplamente utilizada, como por exemplo, em amostra algal (SANTOS et al., 2017) e animal (BASHAN, 1998) mostrando-se eficiente, inclusive nas amostras de *C. megacephala* realizadas neste estudo.

Após a liofilização, pode-se determinar que o teor de umidade para as larvas de *C. megacephala* com 96 h de desenvolvimento foi em média 30%. Além disso, as amostras liofilizadas exigiram em média 70 larvas, enquanto que para as amostras não liofilizadas foram necessárias em torno de 30 larvas para atingir o peso de 1,0 g utilizado na etapa de extração de AGs.

Pode-se perceber também que as amostras maceradas apresentaram a maior massa de lipídeos extraídos (0,18 g e 0,05 g), além de apresentarem uma variedade muito maior de AGs dos perfis das amostras inteiras. Os resultados experimentais vão de encontro à teoria de que uma maior área de superfície e homogeneização da amostra proporcionam maior contato com o sistema extrator. Desta forma, para que haja maior eficiência nos procedimentos de extração, torna-se necessário que a amostra seja previamente moída.

Por outro lado, amostras inteiras e não liofilizadas trazem vantagens para as análises, pelo fato de exigir uma menor quantidade de larvas e por se manter íntegra para outras avaliações, como na identificação taxonômica. É muito comum que se utilize a liofilização como ferramenta para aumentar a preservação e estabilidade de amostras (DE OLIVEIRA ALVES et al., 2008), porém, no caso da

extração pela metodologia de Bligh; Dyer (1959), não se observa tanto essa influência porque a água faz parte do sistema ternário de solventes extratores de AGs (clorofórmio + metanol + água). Assim, esse procedimento deve ser levado em conta conforme os objetivos propostos.

A análise cromatográfica revelou um perfil de ácidos graxos que variou do ácido C14:0 ao C20:5n3, apresentando de 5 a 13 AGs nas diferentes amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos de larvas de *Chrysomya megacephala* submetidas a diferentes procedimentos de preparo de amostra.

Ácidos Graxos	ML (%)	M (%)	IL (%)	I (%)
Mirístico (C14:0)	2,10	2,33	-	-
Miristoleico (C14:1)	0,34	0,50	-	-
Pentadecanóico (C15:0)	0,33	0,40	-	-
Palmítico (C16:0)	26,18	25,75	-	31,59
Palmitoleico (C16:1)	13,20	12,43	-	13,06
Heptadecanóico (C17:0)	0,38	0,39	-	-
Cis-10-Heptadecanóico (C17:1)	-	0,77	-	-
Estearico (C18:0)	5,41	5,00	-	11,87
Oleico (C18:1n9c)	48,20	46,88	-	25,22
Linoleico (C18:2n6c)	2,59	2,76	-	18,26
Linolênico (C18:3n3)	0,53	0,65	-	-
Araquidônico (C20:4n6)	-	1,08	-	-
Eicosapentanóico (C20:5n3)	0,74	1,06	-	-

*ML = Macerado e Liofilizado; M = Macerado não liofilizado; IL = Inteiro Liofilizado; I = Inteiro não liofilizado.

Durante a extração lipídica, pode-se perceber que na amostra IL houve um aumento no volume das larvas, por absorção do solvente, o que pode explicar a ausência de um perfil de AGs em relação as outras amostras. O solvente e os AGs provavelmente ficaram retidos no interior das larvas e, dessa forma, não foram recuperados. A amostra do tipo I apresentou uma menor variedade de AGs, com um perfil composto por uma maior quantidade de AGs insaturados.

Os ácidos oleico, palmítico e palmitoleico, predominantemente observados nas amostras ML, M e I são comumente encontrados em insetos, especialmente em dípteros (BARLOW, 1964). Li et al. (2012) observaram um perfil semelhante trabalhando com esta mesma espécie, apesar de terem utilizado outra metodologia de extração de AGs. Esses AGs vem sendo relacionados por sua importância na bioquímica destes espécimes, estando relacionados a digestão, já que as células intestinais de insetos absorvem preferencialmente ácido oleico (C18:1n9c), e ácido palmítico (C16:0) (KIRFEL; KOMNICK, 1999).

Em dípteros a prevalência do ácido palmitoleico (C16:1) é comum (BARLOW, 1964), enquanto que em coleópteros, por exemplo, apresentam valores muito menores, abaixo de 2% (LEUNG et al., 2012).

Assim, para fins de tentativa de identificação forense, as amostras maceradas liofilizadas mostraram-se mais precisas para a determinação de um perfil de AGs característico, apesar de parecer que a liofilização não seja estritamente necessária.

4. CONCLUSÕES

Esse estudo sugere que, para a análise de AGs de larvas de dípteros utilizando-se a metodologia de Bligh; Dyer (1959), as amostras devem necessariamente ser trituradas, independentemente da liofilização. Conclui-se que essas informações são extremamente relevantes, visto que dependendo do tipo de preparo a que uma amostra é submetida, diferentes resultados são obtidos. Assim, foi possível adaptar uma metodologia convencional de forma a se obter parâmetros mais precisos para fins de entomologia forense.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARLOW, J.S. Fatty in some insects and spider fact, **Can. J. Biochem.** v.42, p. 1365–1374, 1964.
- BASHAN, M. The distribution in lipid classes of fatty acids biosynthesized by the black cricket *Melanogryllus desertus* Pall. (Orthoptera: Gryllidae). **Turkish J. Entomol.** v.22, p.93–99, 1998.
- BLIGH, W.J.; DYER, E. G.. A rapid method of total lipid extraction and purification, **Can. J. Biochem. Physiol.** v.37, p.911–917, 1959.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. Forensic Entomology. **The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. Flórida: CRC Press LLC, 2001.
- DE OLIVEIRA ALVES, C.C.; DE RESENDE, J.V.; CRUVINEL, R.S.R.; PRADO, M.E.T. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) liofilizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 830–839, 2008.
- DIAS FILHO, C. R.; FRANCEZ, P. A. da C. **Introdução à biologia forense**. Campinas, SP. Millenium editora, 2016.
- EL-SAMAD, L. M.; EL-MOATY, Z. A.; MAKEMER, H. M., Effects of Tramadol on the Development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) and Detection of the Drug Concentration in Postmortem Rabbit Tissues and Larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 8, 2011.
- GOSSELIN, M., FERNANDEZ, M.M.R., WILLE, S.M.R., SAMYN, N., BOECK, G., BOUREL, B., Quantification of Methadone and its Metabolite 2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in third instar larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) using liquid chromatography– tandem mass spectrometry, **Journal of Analytical Toxicology**, v. 34, 2010.
- HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, London, v.22, p.475-476, 1973.
- KIRFEL, G.; KOMNICK, H. Differential absorption and esterification of dietary long- chain fatty acids by larvae of the dragonfly, *Aeshna cyanea*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** v.40, p.183–193, 1999.
- LEUNG D, YANGDP, LIZX, ZHAO ZM, CHENJP, ZHULP. Biodiesel from *Zophobas morio* Larva Oil: process optimization and FAME characterization. **Industrial and engineering Chemistry Research** v.51 p.1041–5, 2012.
- LI, Z.; YANG, D.; HUANG, M.; Hu, X.; SHEN, J.; ZHAO, Z.; CHEN, J. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) larvae: A new biodiesel resource. **Applied Energy** v.94, p.349–354, 2012.
- 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.
- SANTOS, M.A.Z.; COLEPICOLO, P.; PUPO, D.; FUJII, M.T.; de PEREIRA, C.M.P.; MESKO, M.F. Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids, **J. Appl. Phycol.** v.29, p. 759–767, 2017.