

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade - PPGECB

ALTERAÇÕES NO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE  
COLEÓPTEROS SÃO IMPORTANTES EM INVESTIGAÇÕES  
FORENSES?

Fabiane Cassari de Oliveira

Dourados-MS

2018

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Fabiane Cassari de Oliveira

ALTERAÇÕES NO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE  
COLEÓPTEROS SÃO IMPORTANTES EM INVESTIGAÇÕES  
FORENSES?

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes

Coorientadores: Prof. Dr. William Fernando Antonialli-Júnior

Dra. Michele Castro de Paula

Dourados-MS

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

O48a Oliveira, Fabiane Cassari De

Alterações no perfil químico cuticular de coleópteros são importantes em investigações forenses? / Fabiane Cassari De Oliveira -- Dourados: UFGD, 2018.

61f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Wedson Desidério Fernandes

Co-orientador: William Fernando Antonialli-Júnior, Michele Castro de Paula

Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande Dourados

Inclui bibliografia

1. Entomologia forense. 2. Hidrocarbonetos cuticulares. 3. Deslocamento de cadáver. 4. Predadores. 5. Necrófagos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

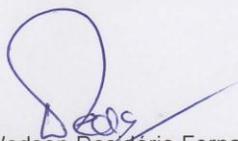
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**“ALTERAÇÕES NO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE COLEÓPTEROS SÃO  
IMPORTANTES EM INVESTIGAÇÕES FORENSES?”**

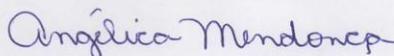
Por

**FABIANE CASSARI DE OLIVEIRA**

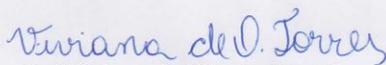
Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
**MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**  
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr. Wedson Desidério Fernandes  
Orientador/Presidente - UFGD



Dr.ª Angélica Mendonça  
Membro titular - EMEF



Dr.ª Viviana de Oliveira Torres  
Membro titular - UFGD

Aprovada em: 17 de agosto de 2018

## **BIOGRAFIA DO ACADÊMICO**

Eu, Fabiane Cassari de Oliveira, natural de Ivinhema-Mato Grosso do Sul, nasci no dia 21 de novembro de 1994; sou filha de Maria Mafalda Cassari e Antônio Bisinoti de Oliveira. Estudei o Ensino Fundamental e Médio na Escola Estadual Reynaldo Massi, concluindo em 2010 e iniciando a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS)- Unidade de Ivinhema em 2011. No período da graduação, final de 2011 a 2015, fui selecionada com bolsa no programa de iniciação a docência (PIBID), trabalhando com confecção de materiais lúdicos para a aplicação em turmas de Ensino Fundamental. Minha linha de pesquisa durante a graduação foi com comportamento de abelha sem ferrão, que deu origem a meu Trabalho de Conclusão de Curso, tendo como tema INFLUÊNCIA DOS FATORES ABIÓTICOS NA ATIVIDADE DE VOO DE *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811 (HYMENOPTERA, APIDAE), NO VERÃO E NO INVERNO. Em 2016 ingressei no Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade na Universidade Federal da Grande Dourados e atualmente desenvolvo trabalhos relacionados com a utilização de coleópteros para a determinação do local de morte em Entomologia Forense.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À minha família pelo incentivo durante todos os meus estudos, principalmente a minha mãe Maria Mafalda Cassari que sempre acreditou nos meus sonhos, me aconselhou e sempre esteve comigo, me dando apoio, amor e carinho. Ao meu pai Antônio Bisinoti de Oliveira pelo incentivo, confiança e amor. Aos meus irmãos Fernanda Cassari de Oliveira e Fábio Antônio Cassari de Oliveira pelo apoio e incentivo, sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador Professor Dr. Wedson Desiderio Fernandes, pela excelente orientação, por me acolher quando eu mais precisei, pela paciência, dedicação e confiança em mim para a realização deste estudo.

À minha coorientadora Professora Dra. Michele Castro de Paula, pela força, carinho, confiança, pelas inúmeras coletas e troca de experimentos que me ajudou a realizar, pelas ideias, correções e noites perdidas para me ajudar a terminar a Dissertação.

Ao meu coorientador Professor Dr. William Fernando Antonialli Junior, por me acolher em seu laboratório, disponibilizar seu local de trabalho e pelas sugestões e ideias para contribuir com o estudo.

À Kamylla pela ajuda nas coletas e em tudo que estava relacionado com análises químicas. Aos meus irmãos científicos, Dailson e Andrelle, pela ajuda nas coletas, pelo carinho e momentos de distração. E a todos do LABECO por me acolher.

Á todos os amigos pelo apoio nos momentos mais difíceis, pela força e incentivo, principalmente a Jéssica, por sempre estar do meu lado.

À Universidade Federal da Grande Dourados.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

A todos vocês, o meu mais sincero agradecimento.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Mafalda Cassari,  
Antônio Bisinoti de Oliveira e aos meus  
irmãos, Fernanda Cassari de Oliveira e  
Fabio Antônio Cassari de Oliveira.

Dedico.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	1
GENERAL ABSTRACT .....	3
INTRODUÇÃO GERAL .....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
Contexto histórico .....	6
Coleópteros associados à decomposição de carcaças .....	6
Histeridae Gyllenhal, 1808 .....	7
<i>Euspilotus azureus</i> Sahlberg, 1823 .....	7
Dermestidae .....	8
<i>Dermestes maculatus</i> De Geer, 1774 .....	8
Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs) .....	8
OBJETIVO GERAL .....	9
HIPÓTESES .....	9
REFERÊNCIAS .....	10

## CAPÍTULO I

### **PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE *Euspilotus azureus* (COLEOPTERA: HISTERIDAE): PERSPECTIVA PARA USO EM INVESTIGAÇÕES FORENSES**

CAPÍTULO I .....	15
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16

INTRODUÇÃO .....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	19
RESULTADOS .....	21
DISCUSSÃO.....	24
REFERÊNCIAS .....	27

## **CAPÍTULO II**

### **EFEITO DA INGESTÃO DO INSETICIDA TIAMETOXAM NO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE BESOUCOS DE INTERESSE FORENSE**

CAPÍTULO II .....	33
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	34
INTRODUÇÃO .....	35
MATERIAL E MÉTODOS .....	37
RESULTADOS .....	40
DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS .....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52

**OBS:** O trabalho está formatado de acordo com as normas da Revista “Journal of Medical Entomology” Fator de Impacto: 1.650 (Qualis/Biodiversidade A2).

# ALTERAÇÕES NO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE COLEÓPTEROS SÃO IMPORTANTES EM INVESTIGAÇÕES FORENSES?

## RESUMO GERAL

A aplicação dos estudos com a entomofauna em investigações criminais e processos civis é conhecida como Entomologia Forense. Sua importância relaciona-se ao fato de que os insetos geralmente são os primeiros a encontrar um corpo em decomposição, sendo atraídos pelos odores e gases liberados após a morte. A ordem de maior importância para entomologia forense é a Diptera, pois são os primeiros a encontrarem um corpo em decomposição. Por outro lado, os coleópteros são considerados como o segundo grupo mais importante para a entomologia forense, pois também podem responder à várias questões e consequentemente auxiliar no campo da perícia criminal. Esta dissertação está dividida em dois capítulos sendo que no primeiro testamos a hipótese de que por meio da análise do perfil químico cuticular de machos e fêmeas da espécie de *Euspilotus azureus*, seria possível distinguir amostras da cutícula destes insetos provenientes de diferentes tipos de ambientes, possibilitando o uso destes compostos como ferramenta complementar para avaliar se cadáveres pode ter sofrido deslocamento do local onde ocorreu a morte. Os resultados mostram que amostras da cutícula do besouro *E. azureus* são ferramentas úteis para auxiliar na investigação do local onde o crime pode ter acontecido, ou mesmo casos de translocação de cadáveres na tentativa de ocultamento, uma vez que a composição varia significativamente em função, sobretudo de condições locais específicas. Os compostos provenientes do dimorfismo sexual da cutícula desta espécie comprovam que machos podem ser mais confiáveis para este tipo de investigação e deve ser levado em conta no momento da coleta de evidências no cadáver. No segundo capítulo verificamos a hipótese de que a contaminação por inseticida afetará o perfil químico cuticular de besouros de interesses forenses. Os resultados obtidos mostram que os Hidrocarbonetos Cuticulares podem ser afetados pela contaminação pelo inseticida tiametoxam, havendo uma alteração qualitativa e quantitativa da composição química cuticular das amostras de besouros. Isto aponta para o uso de uma nova ferramenta para avaliar se a causa da morte pode ter sido por envenenamento ou, se ainda, se o cadáver estiver em área de cultura, se houve possível

contaminação do cadáver, o que pode então afetar o ciclo de desenvolvimento de insetos e com isto dificultar a determinação do Intervalo Pós Morte usando este tipo de amostras.

# **CHANGES IN THE CUTICULAR CHEMICAL PROFILE OF COLEOPTERS ARE IMPORTANT IN FORENSIC INVESTIGATIONS?**

## **GENERAL ABSTRACT**

The application of studies with entomofauna in criminal investigations and civil proceedings is known as Forensic Entomology. Its importance relates to the fact that insects are usually the first to find a decomposing body, being attracted by odors and gases released after death. The most important order for forensic entomology is the Diptera, because they are the first to find a decomposing body. On the other hand, coleoptera are considered as the second most important group for forensic entomology, as they can also answer various questions and consequently assist in the field of criminal proficiency. This dissertation is divided in two chapters and in the first one we tested the hypothesis that, through the analysis of the cuticular chemical profile of males and females of the species of *Euspilotus azureus*, it would be possible to distinguish cuticle samples of these insects coming from different types of environments, the use of these compounds as a complementary tool to evaluate if corpses may have suffered displacement from the place where death occurred. The results show that cuticle samples from the *E. azureus* beetle are useful tools to assist in investigating where the crime may have occurred, or even cases of cadaveric translocation in the attempt to conceal, since the composition varies significantly in function, especially of specific local conditions. The compounds derived from the sexual dimorphism of the cuticle of this species prove that males may be more reliable for this type of investigation and should be taken into account when collecting evidence on the corpse. In the second chapter we verified the hypothesis that the insecticide contamination will affect the chemical profile of beetles of forensic interest. The results show that the Cuticular Hydrocarbons can be affected by the contamination by the insecticide thiamethoxam, with a qualitative and quantitative alteration of the cuticular chemical composition of the beetle samples. This points to the use of a new tool to assess whether the cause of death may have been by poisoning or even if the corpse is in the culture area, if there has been possible contamination of the corpse, which may then affect the development of insects and thus make it difficult to determine the postmortem interval using this type of samples.

## INTRODUÇÃO GERAL

A entomologia forense é dividida de acordo com Lord e Steversson (1986) como: Entomologia **Urbana**: quando há presença de insetos em imóveis causando danos e consequentemente prejuízos. Entomologia de **Produtos estocados**: quando os insetos causam algum tipo de dano em produtos estocados em grande escala. E a Entomologia **Médico-Legal**: Diferente da entomologia urbana e de produtos estocados, a médico-legal os insetos são parte constituinte da investigação envolvendo a área criminal, principalmente em casos de morte violenta.

Os insetos são um dos primeiros a localizarem um corpo após a morte, utilizando-o assim como sítio de oviposição, alimentação, tanto para os adultos como imaturos (Oliveira-Costa 2013).

Há uma grande diversidade de insetos que colonizam cadáveres, de modo que cada espécie apresenta determinadas preferências frente a este recurso e neste sentido, podem ser classificadas, segundo Keh (1985), como: **Necrófagos**, cujo adulto e/ou imaturos se alimentam dos tecidos em decomposição; **Onívoros**, que se alimentam tanto da fauna que coloniza o cadáver quanto da matéria em decomposição; **Parasitas**, utilizam os colonizadores da carcaça para seu próprio desenvolvimento; **Predadores**, se alimentam dos adultos e/ou imaturos associados a carcaça e; **Acidentais**, encontram a carcaça por acaso, utilizando-a como extensão de seu habitat, sem utilizar nenhum recurso para alimentação ou desenvolvimento da prole. Esta preferência da fauna cadavérica por determinados estágios de decomposição é denominado então como sucessão ecológica, sendo possível observar com clareza um padrão de ocorrência das espécies (Smith, 1986).

A ordem de maior importância para entomologia forense é Diptera, pois as moscas são os primeiros insetos a encontrarem um corpo em decomposição. E os representantes da família Calliphoridae são considerados como os mais frequentes e abundantes, localizando o cadáver logo após a morte (Smith 1986, Wall e Warnes 1994). De modo que sua presença e atividade pode acelerar a decomposição do corpo (Mann et al. 1990).

A ordem Coleoptera é a maior e mais diversa da classe Insecta, com mais de 300 mil espécies descritas, correspondendo a cerca de 40% das espécies conhecidas de Hexapoda (Triplehorn e Johnson 2015). Os besouros possuem um amplo hábito alimentar, podendo ser encontrados em quase todos os ambientes (Borror e Delong

1988). Neste sentido, por esta capacidade muitas espécies são associadas ao ambiente cadavérico, sendo então a segunda ordem mais importante para a entomologia forense, podendo, portanto, ser aplicada para auxiliar na solução de casos criminais e disputas judiciais (Pujol-Luz et al. 2008).

Por outro lado, os coleópteros são considerados como o segundo grupo mais importante para a entomologia forense, podendo também auxiliar no campo da perícia criminal. Os besouros possuem representantes, necrófagos, predadores e onívoros, algumas famílias como Histeridae e Staphylinidae (predadores) chegam pouco tempo após a morte, pois são predadores generalistas dos imaturos principalmente de dípteros. Já coleópteros como a família Dermestidae, colonizam a carcaça nos estágios mais avançados, se alimentando dos tecidos em decomposição mais desidratados (Oliveira-Costa 2013).

Os insetos podem ser aplicados em várias situações para auxiliar na elucidação de casos, seja no âmbito cível ou criminal, como, por exemplo, na identificação da origem de entorpecentes com base na identificação dos insetos presentes na droga (Arnaud 1974). Também podem ser utilizados para determinar maus tratos a incapazes. No estudo de Goff (1991), o autor utilizou o tempo de desenvolvimento de larvas de moscas da família Calliphoridae coletadas nas fezes da fralda de uma criança que foi vítima de maus tratos, para determinar o período de abandono.

Os insetos também podem ser aplicados para responder se houve morte violenta, ou não, por meio dos vestígios entomológicos, observando então os sítios de alimentação não usuais de adultos e imaturos, pois geralmente em cadáver sem ferimentos os insetos necrófagos realizam oviposturas em lugares protegidos para o inseto, como orifícios naturais (boca, nariz e genitálias) (Smith 1986). Auxiliam também na determinação do culpado em casos de sequestro ou crime sexual, utilizando análises de DNA retirado do trato digestório de mosquitos hematófagos (Hawley e Budowle 2000). Além da determinação do Intervalo Pós-Morte (IPM), ou seja, o tempo transcorrido entre a morte e o achado do corpo, podendo ser determinado por meio da aplicação do tempo de desenvolvimento dos imaturos e/ou pela sucessão entomológica (Catts 1992), sendo a estimativa do IPM a principal aplicação na Entomologia Forense (Oliveira-Costa 2013).

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Contexto histórico**

A utilização de insetos como instrumento forense foi relatado pela primeira vez na China, no século XIII, no qual após a constatação de um homicídio de um lavrador por meio de uma foice, o investigador pediu que todos os outros trabalhadores expusessem suas foices, de modo que apenas uma das foices atraiu as moscas, e após interrogatório o possível suspeito confessou o assassinato (Catts e Goff 1992, Pujol-Luz et al. 2008).

Segundo Pujol-Luz et al. (2008) o marco inicial da Entomologia Forense no Brasil ocorreu após a realização do trabalho de Oscar Freire em 1908, no qual ele apresenta a primeira coleção de insetos necrófagos. Neste mesmo ano, Edgar Roquete Pinto realizou um estudo sobre a fauna cadavérica humana. Samuel Pessoa, Frederico Lane e Herman Luderwaldt descreveram a fauna de besouros necrófagos em São Paulo, entre 1911 e 1941.

Com base na coleção de insetos do Museu Paulista, foi publicada uma lista de insetos necrófagos no ano de 1911 por Luderwaldt, além disso, foi publicado ainda, em 1914 por Oscar Freire, um estudo sobre a fauna cadavérica na Bahia. Com a ajuda de Freire, Berfort de Mattos no ano de 1919 realizou um trabalho sobre sarcófagos em São Paulo. Após todos esses estudos Oscar Freire em 1923 publicou um trabalho sobre a fauna cadavérica brasileira (Pujol-Luz et al. 2008).

### **Coleópteros associados à decomposição de carcaças**

Há registros de besouros de diversos hábitos alimentares em carcaças, não apenas espécies necrófagas, mas também coprófagas, predadoras, saprófagas e onívoras (Oliveira-Costa 2013). Indivíduos das famílias Cleridae, Silphidae, Scarabaeidae e Dermestidae têm hábitos necrófagos e copro-necrófagos e, portanto, apresentam potencial de uso na entomologia forense. Já besouros das famílias Histeridae e Staphylinidae são predadores, sendo encontrados principalmente nos estágios iniciais da decomposição cadavérica, podendo também serem aplicados no campo das ciências forenses.

Vários estudos com coleópteros vêm mostrando sua eficácia nas investigações forenses, podendo assim responder várias questões, como deslocamento e/ou ocultação de cadáveres, detecção de toxinas, determinação da causa morte e até mesmo estimativa do intervalo pós-morte (IPM) (Madra et al. 2014), sendo que (Bajerlein et al. 2018) conseguiram determinar o IPM por meio de larvas de terceiro instar da espécie *Necrodes*

*littoralis* (Coleoptera: Silphidae). Staphylininae foi utilizado como indicadores da estação da morte e/ou do deslocamento de cadáver, os autores constataram que esta família pode ser utilizada como indicadores da sazonalidade, podendo fornecer informações valiosas para ciências forenses (Madra et al. 2014). O efeito da atividade do besouro *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) em feridas pós-morte e as alterações decorrentes podem mascarar ferimentos ocorridos antes e/ou depois da morte, podendo assim influenciar na determinação da causa da morte (Zanetti et al. 2015). Também já foi possível detectar e quantificar a fluoxetina, um antidepressivo a partir de amostras de *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) demonstrando potencial uso para detecção da causa da morte, principalmente em casos no qual não há mais tecidos disponíveis para análises toxicológicas tradicionais (Zanetti et al. 2016).

### **Histeridae Gyllenhal, 1808**

A família Histeridae possui cerca de 4.300 espécies descritas, contendo 11 subfamílias (Mazur 2011). Seus representantes são pequenos, possuindo cerca de 0,5 a 10,0 mm de comprimento, corpo oval, geralmente com coloração preto brilhante (Oliveira-Costa 2013). Os besouros desta família possui uma distribuição geográfica ampla, podendo ser encontrados em diversos tipos de ambientes, como carcaças (Wolff et al. 2001, Cruz e Vasconcelos 2006, Mise et al. 2007, 2010), fezes (Rodrigues e Marchini 1998), criação de aves poedeiras (Gianizella e Prado 1998), vegetação em decomposição (Celli et al. 2015). E já foram registrados nas cidades de Campinas-SP (Monteiro-Filho e Penereiro 1987, Gianizella e Prado 1998), Recife-PE (Cruz e Vasconcelos 2006), São Paulo-SP e Uberlândia-MG (Luederwaldt 1911, Carvalho et al. 2004), Itumbira-GO (Marchiori et al. 2000), Campo Grande-MS (Koller et al. 2002) e Espírito Santo (Lopes et al. 2005).

### ***Euspilotus azureus* (Sahlberg 1823) (Histeridae: Coleoptera)**

*Euspilotus* é o gênero mais encontrados em estudos forenses (Carvalho e Linhares 2001, Mise et al. 2007, 2010, Mayer e Vasconcelos 2013, Almeida et al. 2015), sendo registrados em várias regiões do Brasil, como nos estudos de Souza e Linhares (1997) que identificaram este gênero em Campinas-SP, Curitiba-PR, Manaus-AM e Capão do Leão-RS, Mayer e Vasconcelos (2013) na Serra Talhada-PE, já Mise et al.

(2007) em Curitiba-PR. Esta espécie, também já foi encontrada na Argentina, Chile e Guiana Francesa (Mazur 2011, Aballay et al. 2012, Degallier et al. 2012).

### **Dermestidae**

Os representantes desta família são considerados pequenos variando de 2,0 a 10,0 mm de comprimento e ovais, possuem antenas curtas e clavadas, o élitro cobre totalmente o abdômen, seu corpo é piloso, possuindo coloração discreta, seus imaturos são de coloração parda, corpo coberto de longas cerdas, seu estágio larval pode variar muito de acordo com sua alimentação e temperatura (Oliveira-Costa 2013). Besouros da família Dermestidae são encontrados comumente em carcaças de animais, principalmente nos estágios de decomposição avançado. A maioria das espécies se alimentam de matérias de origem animal e são conhecidos como besouro de couro, por se alimentarem de pele seca, pelos, penas, lã, couro e até mesmo tecidos moles de animais, e ainda algumas espécies dos gêneros *Anthrenus* e *Attagenus*, tem a capacidade de se alimentarem de produtos de origem vegetal (Dell' Orto 1985, Bousquet 1990).

### ***Dermestes maculatus* De Geer, 1774**

*Dermestes maculatus* é a espécie mais comum em carcaças (Souza e Linhares 1997), podendo ser uma importante evidencia entomológica para as ciências forenses, pois está presente nos estágios mais finais de decomposição, onde não há mais evidencias de moscas e seus imaturos. Esta espécie pode decompor um homem a restos em um intervalo de 5 meses, quando exposto em um local fechado, este processo de decomposição, sem a presença dos dermestídeos demoraria muito mais (Schroeder et al. 2002).

### **Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs)**

O corpo dos insetos é constituído por diferentes camadas, sendo a mais superficial denominada epicutícula, a qual é composta por hidrocarbonetos, álcoois, ésteres alquílicos, glicerídeos, esteróis e aldeídos (Page et al. 1990). Dentre os Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs), eles geralmente são saturados, insaturados ou ramificados (Howard et al. 1978). Estes HCs têm como função proteção contra dessecação e microrganismos (Singer 1998), além de atuar na comunicação química (Blomquist e Bagnères 2010).

A classe de compostos denominados alcanos lineares tem como principal função, a prevenção contra perda de água. Já os alcanos ramificados e alcenos têm como principal função a comunicação química (Gibbs 2002). Estes HCs pode variar de acordo com fatores genéticos, ambientais (Gibbs et al. 1997).

Estudos com a utilização de HCs vêm sendo realizados, seja para observar a influência da dieta no perfil químico de insetos sociais (Richard et al. 2004), determinar a idade dos diferentes estágios de desenvolvimento (Paula et al. 2017), diferenciar entre populações (Byrne et al. 1995; Paula et al. 2017), dimorfismo sexual (Booksmythe et al. 2017) entre outros.

No entanto não há estudos que avaliem a variação da cutícula de coleópteros de acordo com diferentes ambientes, além de estudos que buscam entender se a exposição a toxinas influenciará o perfil químico cuticular. O uso dos compostos cuticulares de insetos de importância forense vem se mostrando promissor (Ye et al. 2007, Fockink et al. 2015, Paula et al. 2017, Booksmythe et al. 2017) sendo então vantajosas novas alternativas para auxiliar a perícia forense, informações estas que podem ser cruciais para dar suporte à laudos de médicos legistas e patologistas forenses, visto que dados entomológicos são muitas vezes a única alternativa confiável, principalmente em corpos em estágio de decomposição mais tardio.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar se o uso de HCs de coleópteros que ocorrem comumente em carcaças pode auxiliar a resolver casos investigados por entomologistas forenses.

## **HIPÓTESES**

Hipótese capítulo I: a análise do perfil químico cuticular de machos e fêmeas da espécie de *E. azureus* possibilitará a diferenciação das amostras da cutícula destes insetos provenientes de diferentes tipos de ambientes, possibilitando o uso destes compostos como ferramenta complementar para avaliar se cadáveres podem ter sofrido deslocamento do local onde ocorreu a morte.

Hipótese capítulo II: o perfil químico cuticular das espécies *E. azureus* e *D. maculatus* sofrerá alteração pela ingestão de recurso contaminado com compostos tóxicos. Esperamos que, no caso de contaminação, a detecção, por meio da alteração do

perfil químico do inseto, auxiliie nas investigações forenses para a descoberta da possível causa da morte.

## REFERÊNCIAS

- Aballay F.H, G. Arriagada, G.E. Flores e N.D. Centeno. 2012.** An illustrated key to and diagnoses of the species of Histeridae (Coleoptera) associated with decaying carcasses in Argentina. *ZooKeys* 261: 61–84.
- Almeida, L.M., R.C. Corrêa, e P.C. Grossi. 2015.** Coleoptera species of forensic importance from Brazil: an updated list. *Rev. Bras. Entomol.* 59: 274–284.
- Arnaud, P.H. 1974.** “Insects and mites associated with stored *Cannabis sativa* Linnaeus”. *The Pacific Entomologist*, 53(1): 91–92.
- Bajerleina, D., D. Taberskib, S. Matuszewskic. 2018.** Estimation of postmortem interval (PMI) based on empty puparia of *Phormia regina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and third larval stage of *Necrodes littoralis* (L.) (Coleoptera: Silphidae) – Advantages of using different PMI indicators. *J Forensic Leg Med.* 55: 95–98.
- Blomquist, G. e A.G. Bagnères. 2010.** Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology. Cambridge University Press, Cambridge, NewYork.
- Booksmythe, I., H.D. Rundle, e G. Arnqvist. 2017.** Sexual dimorphism in epicuticular compounds despite similar sexual selection in sex role-reversed seed beetles. *J. Evol. Biol.* 30: 2005–2016.
- Borrer, D.J., D.M. DeLong. 1988.** Introdução ao Estudo dos Insetos. São Paulo: Edgard Blücher.
- Bousquet, Y. 1990.** Beetles associated with stored products in Canada: An identification guide. Minister of Supply and Services. Biosystematics Research Centre Ottawa, Ontario. 215 pp.
- Byrne, A.L., M.A. Camann, T.L. Cyr, E.P. Catts, e K.E. Espelie. 1995.** Forensic implications of biochemical differences among geographic populations of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *J. Forensic Sci.* 40: 372–77.
- Carvalho L.M.L., P.J. Thyssen, A.X. Linhares, e F.A.B. Palhares. 2000.** A checklist of Arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95: 135–138.

- Carvalho, L.M.L., e A.X., Linhares. 2001.** Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. *J. Forensic Sci.* 46: 604–608.
- Carvalho, L.M.L., P.J. Thyssen, M.L. Goff, e A.X. Linhares. 2004.** Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. *Anil Aggrawal's Internet J. Forensic Med. Tox.* 5:33–39.
- Catts, E.P. 1992.** “Problems in estimating the PMI in death investigations”. *J. Agric. Entomol.* 9(4): 245–255.
- Catts, E.P. e M.L. Goff. 1992.** Forensic entomology in criminal investigations. *Annu. Rev. Entomol.* 27: 253–272.
- Celli, N.G.R., F.W.T. Leivas, M.F.C. Caneparo, e L.M. Almeida. 2015.** Chave de identificação e diagnose dos Histeridae (Insecta: Coleoptera) de interesse forense do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre.* 105: 461–473.
- Cruz, T.M. e Vasconcelos, S.D. 2006.** Entomofauna de solo associada à decomposição de carcaça de suíno em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil. *Biociências,* 14(2): 193–201.
- Degallier, N., G. Arriagada, P. Kanaar, D.P. Moura, A.K. Tishechkin, M.S. Caterino e W.B. Warner. 2012.** Coleoptera Histeridae de Guyane. VII. Compléments au catalogue avec des données sur la faune du Surinam et une contribution à la connaissance des Saprininae. *ACOREP-France: Coléoptères de Guyane.* 33–52.
- Dell’Orto, H. 1985.** Insectos que dañan granos productos almacenados. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. 146 pp.
- Fockink, D.H., C.B.C. Martins, e P.H.G. Zarbin. 2015.** Identification and synthesis of the male produced volatiles of the carrion beetle, *Oxelytrum erythrurum* (Coleoptera: Silphidae). *Tetrahedron Letters* 56: 5353–5356.
- Gianizella, S.L. e A.P. Prado. 1998.** Levantamento e Sazonalidade de Coleópteros (Histeridae) em Criação de Aves Poedeiras. *An. Soc. Entomol. Bras.* 27: 551–557.
- Gibbs, A.G., A.K. Chippindale, e R.R. Michael. 1997.** Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 200: 1821–1832.
- Gibbs, A.G., 2002.** Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *J. Insect Physiol.* 48: 391–400.

- Goff, M.L. 1991.** Comparison of insect species associated with decomposing remains recovered inside dwellings and outdoors on the island of Oahu, Hawaii. *J. Forensic Sci.* 36(3):748–753.
- Hawley, E.M., e B. Budowle. 2000.** “Amplified fragment length polymorphism (Ampflps) in mosquito blood meals used to identify individual hosts and detect multiple feedings”. Proceedings 2and International Symp. On the Forensic Aspects os DNA (US Government Printing Office.
- Howard, R.W., C.A. McDaniel, e C.J. Blomquist. 1978.** Cuticular hydrocarbons of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Chem. Ecol.* 4: 233–245.
- Keh B. 1985.** Scope and applications of forensic entomology. *Ann. Rev. Entomol.* 30: 137–154.
- Koller, W.W., A. Gomes, e S.R. Rodrigues. 2002.** Fimicolous Histeridae Coleoptera in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz. J. Biol.* 62: 473–478.
- Lopes, P.P., J.N.C. Louzada, P.L. Oliveira-Rebouças, L.M. Nascimento, e V.P.G. Santana-Reis. 2005.** Resposta da Comunidade de Histeridae (Coleoptera) a Diferentes Fisionomias da Vegetação de Restingas no Espírito Santo. *Neotrop. Entomol.* 34: 25–31.
- Lord, W.D., e J.R. Stevenson. 1986.** Directory of Forensic Entomologists. Def. Pest Mgmt. Info. Anal. Center(eds), Washington: Walter Reed Army Medical Center.
- Luederwaldt, G. 1911.** Os insectos necrophagos paulistas. *Rev. Mus. Paul.* 8: 414–433.
- Madra, A., S. Konwerski, e S. Matuszewski. 2014.** *Necrophilous staphylininae* (Coleoptera: Staphylinidae) as indicators of season of death and corpse relocation. *Forensic Sci. Int.* 242: 32–37.
- Marchiori, C.H., C.G. Silva, E.R. Caldas, C.I.S. Vieira, K.G.S. Almeida, F.F. Teixeira, e A.X. Linhares. 2000.** Artrópodos associados com carcac, a de suíno em Itumbiara,sul de Goiás. *Arq. Inst. Biol.* 67:167–170.
- Mann K.G., M.E. Nesheim, W.R. Church, P. Haley, e S. Krishnaswamy. 1990.** Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood.* 76:1.
- Mayer, A.C.G., e S.D. Vasconcelos. 2013.** Necrophagous beetles associated with carcasses in a semi-arid environment in Northeastern Brazil Implications for forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 226:41–45.
- Mazur, S. 2011.** A concise catalogue of the Histeridae (Insecta: Coleoptera). Warsaw: WULS – SGGW Press. 332 pp.

- Mise, K.M., A.S.B. Souza, C.M. Campos, R.L.F. Keppler, e L.M. Almeida. 2010.** Coleoptera associated with pig carcass exposed in a forest reserve, Manaus, Amazonas, Brazil. *Biota Neotrop.* 10: 321–324.
- Mise, K.M., L.M. Almeida, M.O. Moura. 2007.** Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. *Rev. Bras. Entomol.* 51: 358–368.
- Mise, K.M., R.C. Corrêa, e L.M. Almeida, 2013.** Coleopterofauna found on fresh and frozen rabbit carcasses in Curitiba, Paraná, Brazil. *Braz. J. Biol.* 73:543–548.
- Monteiro-Filho E.L.A., e J.L. Penereiro. 1987.** Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo. *Brasil. Rev. Bras. Biol.* 47: 289–295.
- Oliveira-Costa, J. 2013.** Insetos “peritos”: entomologia Forense no Brasil. 1st ed. Ed. Millenium, Campinas, São Paulo.
- Page, M., L.J. Nelson, M.I. Haverty e G.J. Blomquist. 1990.** Cuticular hydrocarbons as chemotaxonomic characters for bark beetles: *Dendroctonus ponderosae*, *D. jeffreyi*, *D. brvicois*, and *D. frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 892–901.
- Paula, M. C., W. F. Antonialli-Junior, A. Mendonça, K. B. Michelutti, A. D. Eulalio, C. A. L. Cardoso, T. Lima, e C. J. Von Zuben. 2017.** Chemotaxonomic 15 Profile and Intraspecific Variation in the Blow Fly of Forensic Interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 54: 14–23.
- Pujol-Luz, J. R.; L. C. Arantes e R. Constantino. 2008.** Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Rev. Bras. Entomol.* 52: 485-492.
- Richard, F. J., A. Hefetz, J. P. Christides, e C. Errard. 2004.** Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Chemoecology.* 14: 9–16.
- Rodrigues, S.R. e L.C. Marchini. 1998.** Espécies de Histeridae coletadas em Piracicaba, SP. *Sci. Agri.* 55: 59–63.
- Roquette-Pinto, E. 1908.** Nota sobre a fauna cadavérica do Rio de Janeiro. *A Tribuna Médica* 21: 413–417.
- Schroeder, H., H. Klotzbach, L. Oesterhelweg, e K. Puschel. 2002.** Larder beetles (Coleoptera, Dermestidae) as an accelerating factor for decomposition of a human corpse. *Forensic Sci. Int.* 127: 231–236.

- Singer, T.L., K.E. Espelie e G.J. Gamboa, 1998.** Nest and nestmate discrimination in independent-founding paper wasps. In: Pheromone Communication in Social Insects (R.K. Vander Meer, M.D. Breed, M.L. Winston and K.E. Espelie, Eds.) Westview Press, Oxford. 104–125.
- Smith, K. G. V. A. 1986.** A Manual of forensic entomology. Trustees of the British Museum (Natural History), London, England. 205 p.
- Souza, A.M. e A.X. Linhares. 1997.** Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. Med. Vet. Entomol. 11: 8–12.
- Triplehorn, C.A., e N.F. Johnson. 2015.** Estudo dos insetos. 2<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: Cengage Learning.
- Wall, R. e M.L. Warnes. 1994.** Responses of the sheep blowy *Lucilia sericata* to carrion odour and carbon-dioxide. Entomol. Exp. Appl. 73: 239–246.
- Wolff, M., A. Uribe, A. Ortiz, e P. Duque. 2001.** A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. J. Forensic. Sci. 120: 53–59.
- Ye, G.Y., K. Li, J.Y. Zhu, G.H. Zhu, e C. Hu. 2007.** Composition in Pupal Exuviae for Taxonomic Differentiation of Six Necrophagous Flies. J. Med. Entomol. 44: 450–456.
- Zanetti N.I., A.A. Ferrero, N.D. Centeno. 2015.** Modification of postmortem wounds by *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) activity: a preliminary study. J Forensic Legal Med. 36: 22–24.
- Zanetti, N.I., A.A. Ferrero, N.D. Centeno. 2016.** Determination of fluoxetine in *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) by a spectrophotometric method. Science e Justice, 56(6): 464–467.

## CAPÍTULO I

### PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE *Euspilotus azureus* (COLEOPTERA: HISTERIDAE): PERSPECTIVA PARA USO EM INVESTIGAÇÕES FORENSES

#### RESUMO

Os coleópteros são a segunda ordem de insetos mais frequentes e abundantes encontrados em carcaças em decomposição. Uma alternativa para a aplicação dos insetos no campo das ciências forenses é sua utilização para auxiliar a determinação do local de morte, ou seja, “onde a morte ocorreu” em casos de ocultação e/ou movimentação de cadáver. Ainda que se saiba a importância dos besouros para gerar informações para perícia forense, esta área ainda é pouco explorada, sobretudo, com relação a fauna de coleópteros do Brasil. Sendo assim, testamos a hipótese de que por meio da análise do perfil químico cuticular de machos e fêmeas da espécie de *Euspilotus azureus* será possível distinguir amostras da cutícula destes insetos provenientes de diferentes tipos de ambientes, possibilitando o uso destes compostos como ferramenta complementar para avaliar se cadáveres podem ter sofrido deslocamento do local onde ocorreu a morte. Coletamos fêmeas e machos de besouros da espécie *E. azureus* no município de Dourados-MS, utilizando 1kg de carne de porco em três tipos de ambientes: mata, urbano e pastagem, levados para o laboratório para confirmação da espécie, sexagem e posterior extração. As análises foram realizadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Os resultados mostram que amostras da cutícula do besouro *E. azureus* são ferramentas úteis para auxiliar na investigação do local onde o crime pode ter acontecido, ou mesmo casos de translocação de cadáveres na tentativa de ocultamento, uma vez que a composição varia significativamente em função, sobretudo de condições locais específicos. Os compostos provenientes do dimorfismo sexual da cutícula desta espécie comprovam que machos podem ser mais confiáveis para este tipo de investigação e deve ser levado em conta no momento da coleta de evidências no cadáver.

**Palavras-Chave:** hidrocarbonetos cuticulares, entomologia forense, insetos predadores, deslocamento de cadáver.

***Euspilotus Azureus* CUTICULAR CHEMICAL PROFILE (COLEOPTERA:  
HISTERIDAE): PERSPECTIVES TOWARDS ITS USE IN FORENSIC  
EXAMINATION**

**ABSTRACT**

Coleoptera are the second most frequent and abundant insects found in decaying carcasses. An alternative for the application of insects in the field of forensic sciences is its use to assist in the determination of the place of death, that is, "where death occurred" in cases of concealment and / or corpse movement. Although it is known the importance of beetles to generate information for forensic expertise, this area is still little explored, especially in relation to the coleopteran fauna of Brazil. Therefore, we tested the hypothesis that by analyzing the cuticular chemical profile of males and females of the species of *Euspilotus azureus* it will be possible to distinguish cuticle samples of these insects from different types of environments, making possible the use of these compounds as a complementary tool to evaluate if corpses may have been displaced from the place where death occurred. We collected females and males of beetles of the species *E. azureus* in the municipality of Dourados-MS, using 1kg of pork in three types of environments: forest, urban and pasture, taken to the laboratory for confirmation of the species, sexing and later extraction. The analyzes were performed by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The results show that cuticle samples from the *E. azureus* beetle are useful tools to assist in investigating where the crime may have occurred, or even cases of cadaveric translocation in the attempt to conceal, since the composition varies significantly in function, especially of specific local conditions. The compounds derived from the sexual dimorphism of the cuticle of this species prove that males may be more reliable for this type of investigation and should be taken into account when collecting evidence on the corpse.

**Keywords:** cuticular hydrocarbons, forensic entomology, predatory insects, corpse displacement.

## INTRODUÇÃO

A aplicação dos estudos com a entomofauna em investigações criminais e processos civis é conhecida como Entomologia Forense (Catts e Goff 1992). Sua importância relaciona-se ao fato de que os insetos geralmente são os primeiros a encontrar um corpo em decomposição, sendo atraídos pelos odores e gases liberados após a morte. Este recurso efêmero constitui uma rica fonte proteica, de modo que os insetos a utilizam para alimentação, maturação de seus ovários, reprodução e desenvolvimento de sua prole (Santos 2014).

Os insetos de maior importância para fornecer evidências para perícia forense são os dípteros, pois são os primeiros organismos que localizam o corpo e realizam a ovipostura; os imaturos encontrados no cadáver são utilizados para estimar o tempo decorrido entre a morte e o achado de corpo, ou seja, a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) (Oliveira-Costa 2003).

Os coleópteros são a segunda ordem de insetos mais frequentes e abundantes em carcaças em decomposição (Oliveira-Costa 2013). Esta ordem é representada por muitas espécies necrófagas, que são importantes para avaliar o IPM, principalmente nos estágios mais avançados do processo de decomposição, quando as larvas de moscas já deixaram a carcaça para pupar (Oliveira-Costa 2003), alimentando-se de tecidos mais secos, característica facilitada por sua mandíbula grande e esclerotizada (Oliveira-Costa 2003). No entanto, a coleopterofauna não inclui somente insetos necrófagos, há também espécies predadoras/parasitoides e onívoras (Oliveira-Costa 2003) que chegam até a carcaça quando já existe uma quantidade significativa de larvas e moscas adultas que servem como suprimento alimentar (Celli et al. 2015), o que de certa maneira também pode interferir na determinação do IPM.

Entre os coleópteros de maior importância forense a família Histeridae se destaca como a de maior ocorrência no Brasil (Monteiro-Filho e Penereiro 1987, Carvalho et al. 2000, Carvalho e Linhares 2001, Mise et al. 2007, 2010). Os histerídeos são considerados predadores de larvas de moscas Cyclorrhapha, encontrados nos estágios iniciais da decomposição (Rodriguez e Bass 1983, White 1983, Kovarik e Caterino 2001, Mise et al. 2007). Esta família é composta por aproximadamente 4.300 espécies descritas (Mazur 2011) encontrados em vários ambientes e substratos, como por exemplo, em carcaças (Wolff et al. 2001, Cruz e Vasconcelos 2006, Mise et al. 2007, 2010), fezes (Rodrigues e Marchini 1998, Koller et al. 2002, Lopes et al. 2005), criação de aves poedeiras

(Gianizella e Prado 1998), vegetação em decomposição, podendo também ocorrer em associação a insetos sociais, como, formigas e cupins (Celli et al. 2015). Dentre esta família *Euspilotus* é um dos gêneros mais importantes de Histeridae em estudos forenses (Carvalho e Linhares 2001, Mise et al. 2007), apresentando uma distribuição como o terceiro gênero mais coletado em carcaças na América do Sul. A espécie *Euspilotus azureus* é a mais amostrada em estudos de levantamento de fauna (Mise et al. 2007, 2010), em carcaças, geralmente associada ao estágio de inchamento e deterioração (Souza et al. 2008). Os espécimes possui corpo oval, convexo e sua coloração varia de preto a azul metálico (Celli et al. 2015) e para a diferenciação sexual é observado as cerdas na porção ventral dos tarsômeros, nos machos em forma de espátula e na fêmea espiniforme (Caneparo et al. 2017).

Uma aplicação dos insetos no campo das ciências forenses é sua utilização para auxiliar na determinação do local de morte, ou seja, “Onde a Morte ocorreu?”, em casos de ocultação de cadáver e/ou de sua movimentação (Madra et al. 2014). Normalmente o deslocamento do cadáver do local da morte resulta no transporte da fauna presente nele e a junção dos dados entre a composição da fauna de insetos presente no cadáver e a fauna de insetos da região geográfica onde o corpo foi encontrado fornecem evidências se o corpo foi movimentado do local onde ocorreu a morte (Byrne et al. 1995). Algumas espécies de insetos mostram uma grande preferência por determinados ambientes, tornando-se ótimos indicadores do local de morte e deslocamento de cadáveres (Catts e Goff 1992). Desta forma, informações baseadas na distribuição geográfica e no habitat natural das espécies coletadas na cena da morte, auxiliam na identificação do local onde a morte ocorreu (Centeno et al. 2002) e/ou a suposição da movimentação de cadáveres da cena do crime (Crosby et al. 1986). As preferências sazonais e de ambientes sugerem a utilização de alguns Staphylininae como bons indicadores de local de morte e/ou deslocamento de cadáveres (Madra et al. 2014).

Nesse sentido, uma ferramenta auxiliar que vem sendo utilizada para avaliar preferências sazonais e de ambiente são os hidrocarbonetos cuticulares (HCs), parte constituinte da camada lipídica do inseto que se encontra na camada mais superficial da cutícula, a epicutícula (Service et al. 1985). Estes compostos químicos geralmente são uma mistura de hidrocarbonetos saturados, insaturados e ramificados (Howard et al. 1978), e exercem um papel importante na proteção do inseto contra a dessecação, defesa

contra microrganismos (Singer 1998), e na comunicação química (Blomquist e Bagnères 2010).

Os HCs podem sofrer influência de fatores genéticos e ambientais (Gibbs et al. 1997), por isso são importantes ao serem utilizados para aplicações em casos de dúvidas de onde ocorreu a morte ou ocultamento do cadáver. Nesse sentido, alguns estudos vêm avaliando a composição química cuticular de espécies de importância forense, seja para auxiliar na diferenciação de espécies de importância forense (Moore et al. 2014), determinação da idade de imaturos (Zhu et al. 2006, Moore et al. 2014) e ainda para diferenciação de populações, como na espécie de mosca varejeira *Chrysomya megacephala* (Paula et al. 2017).

No entanto, há raros estudos que tem explorado a composição de HCs de besouros de interesse forense (Booksmythe et al. 2017), sobretudo, com relação a fauna do país. Neste sentido, geralmente em casos de deslocamento do cadáver do local da morte haverá também o deslocamento conjunto de sua fauna e, sabendo que estes insetos apresentam HCs específicos da população ou mesmo do local de onde foi transportado, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que por meio da análise do perfil químico cuticular de machos e fêmeas da espécie de *E. azureus* seria possível distinguir amostras da cutícula destes insetos provenientes de diferentes tipos de ambientes, possibilitando o uso destes compostos como ferramenta complementar para avaliar se cadáveres podem ter sofrido deslocamento do local onde ocorreu a morte.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local de coleta**

Coletamos os adultos de *E. azureus* em três ambientes diferentes na cidade de Dourados-MS, Brasil. O ambiente de pastagem estava localizada na latitude 22° 19' Sul, longitude 54° 93' Oeste, este ambiente era pastagem antes das modificações ocorridas para a construção das universidades a seu redor, mas ainda há uma grande área de pastagem que circunda este ambiente. O segundo ponto de coleta foi o ambiente de mata, latitude 22° 21' Sul, longitude 54° 92' Oeste, floresta pertencente à área de preservação da Reserva dos Coqueiros, ela é composta por uma área predominantemente preservada, apresentando mancha com cerca de 54 hectares de resquícios da transição de Cerrado e Mata Atlântica. O terceiro ponto de coleta foi o ambiente urbano, latitude 22° 23' Sul, longitude 54° 83' Oeste, no interior da cidade de Dourados-MS com uma distância de

9,01km do ambiente de mata e 10,4km do ambiente de pastagem. Para a coleta dos espécimes utilizamos pedaços de carne de porco com cerca de 1 kg exposto em uma bandeja de 17x27 cm para cada ambiente, exposto por aproximadamente 3 dias.

Após a coleta, os adultos foram levados para o Laboratório de Ecologia Comportamental (LABECO) situado no campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) para a confirmação da espécie de acordo com Celli et al. (2015), sexagem e posterior extração dos compostos químicos cuticulares.

### **Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)**

Realizamos as extrações dos compostos químicos da cutícula de adultos de *E. azureus* (Coleoptera: Histeridae) logo após a coleta. Para avaliar o dimorfismo químico cuticular entre machos e fêmeas da espécie foram utilizados 20 indivíduos, sendo 10 machos e 10 fêmeas para cada ambiente (mata, urbano e de pastagem), totalizando 60 indivíduos.

Cada indivíduo foi imerso em um recipiente de vidro com 2mL de hexano durante 3 minutos. Após a retirada do adulto as amostras foram secas em capela de exaustão e congeladas. Para as análises no Cromatógrafo, cada extrato foi solubilizado em 200 µL de hexano (Tedia, grau HPLC).

As amostras foram analisadas empregando um Cromatógrafo a Gás acoplado Espectrômetro de Massas (GC-MS Ultra 2010), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura).

As condições de análise foram: volume de injeção de 1 µL, injeção splitless; rampa de aquecimento com temperatura inicial de 150 °C alcançando 300 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> e permanecendo na temperatura final por 10 minutos; temperatura do injetor de 220 °C. As temperaturas do detector e da linha de transferência foram 250 °C e 200 °C, respectivamente.

Os parâmetros de varredura do espectrômetro de massas incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 e V, faixa de massa de m/z 45 a 600 e intervalo de varredura de 0.3s.

Realizamos as identificações dos compostos empregando o índice de retenção calculado, usando uma mistura de alcanos lineares (C7-C40, Sigma Aldrich com pureza ≥ 90%) como referência externa em relação ao índice de retenção da literatura (Brown et al. 1991, Zhu et al. 2006, 2013, Moore et al. 2014, Weiss et al. 2014, Bonelli et al. 2015,

Zhu et al. 2017) e associado à interpretação dos espectros de massas obtidos com as amostras e comparados com as bases de dados (NIST21 e WILEY229).

### **Análises Estatísticas**

Para avaliar o dimorfismo químico cuticular entre machos e fêmeas de *E. azurius* dos três ambientes aplicamos uma análise de função discriminante (DFA – *Discriminant Function Analysis*) com as áreas relativas de todos os compostos detectados pela análise cromatográfica. Esta análise estatística é indicada por revelar um conjunto de variáveis que melhor diferenciam os grupos avaliados (Quinn e Keough 2002).

A existência de diferença significativa entre os ambientes foi considerada quando o valor de p foi menor que 0,05. E o valor de Wilks' Lambda foi utilizado como medida da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos a zero indicam não sobreposição dos ambientes, enquanto valores próximos a 1 indicam elevada sobreposição e conseqüente inexistência de diferença significativa entre eles (Manly 2008).

Para avaliar o quanto as amostras dos ambientes são diferentes foi aplicado a distância de Mahalanobis ao quadrado para percepção da distância entre cada um dos grupos analisados.

## **RESULTADOS**

Considerando o perfil cuticular de machos e fêmeas de *E. azureus* (Coleoptera: Histeridae) foram detectados 13 picos, destes, 11 foram identificados, cujos compostos variaram de 19 a 32 átomos de carbono (Tabela 1). Foi possível detectar diferenças qualitativas e quantitativas entre besouros provenientes de diferentes ambientes e sexo. O composto majoritário, independente do sexo e tipo de ambiente foi o 9-pentacoseno representando entre 47% a 72% de área relativa total. E somente três compostos ocorreram em todas as amostras, sendo dois alcenos (9-pentacoseno e 9-heptacoseno) e um alcano ramificado (13-metilpentacosano) (Tabela 1).

As fêmeas de *E. azureus* do ambiente urbano apresentam 3 compostos, sendo 2 alcenos e 1 metil ramificado. Já os machos apresentam 9 compostos, sendo 5 alcenos, 3 alcanos ramificados e 1 alcano linear. A cutícula das fêmeas do ambiente de pastagem tem 3 compostos, sendo 1 alcano ramificado e 2 alcenos. Já machos apresentaram 6

compostos, 3 alcanos ramificados e 3 alcenos. As fêmeas e machos do ambiente de mata apresentam os mesmos 6 compostos, sendo 3 alcenos e 3 alcanos ramificados.

Independentemente do tipo de ambiente os alcenos foram os mais representativos em teores, seguido dos alcanos ramificados e alcanos lineares (Fig. 1).

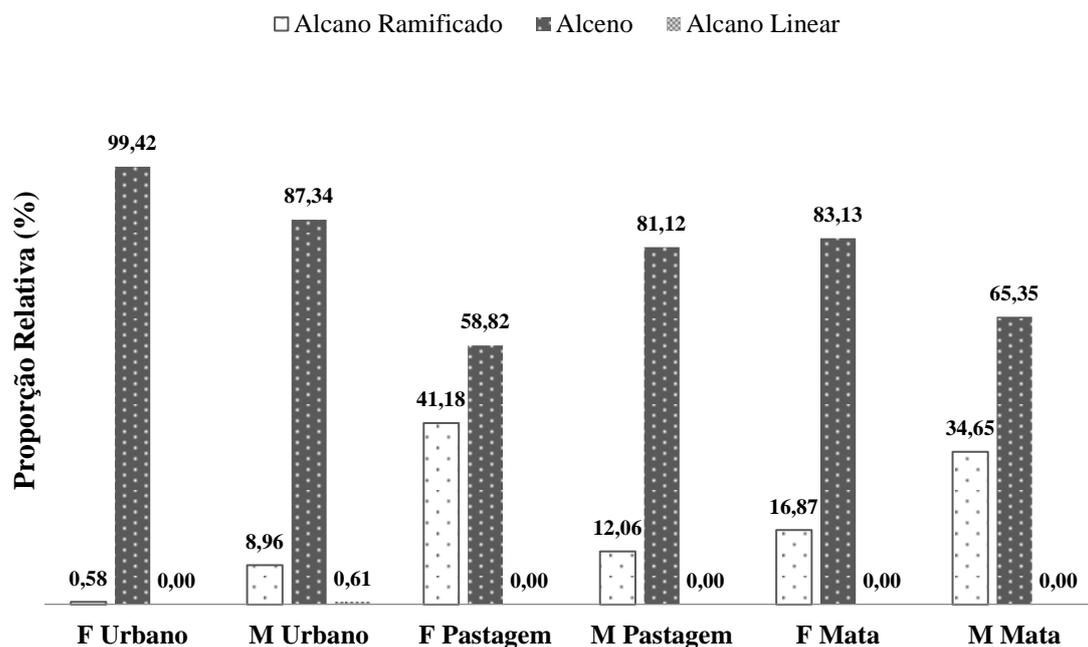
**Tabela 1.** Proporções relativas (%) dos hidrocarbonetos cuticulares presentes em amostras de machos e fêmeas de *Euspilotus azureus* de diferentes ambientes.

Compostos	IR	Ambiente Urbano		Ambiente de Pastagem		Ambiente de Mata	
		Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
3-Metiloctadecano•	1872	ND	5,5±7,2	ND	6,5±11,2	ND	ND
1-Nonacedeno•	1885	ND	0±0,1	ND	ND	ND	ND
Nonadecano•	1900	ND	0,6±1,3	ND	ND	ND	ND
2-Metilnonadecano•	1963	ND	1,9±2,8	ND	2,7±4,6	ND	ND
9- Tricoseno•	2270	ND	0,4±0,6	ND	1,0±1,3	ND	ND
9-Pentacoseno*#	2473	72,3±6,1	57,2±18	47,1±33	61,1±21,1	71,7±12,8	50,1±8,1
13-Metilpentacosano#	2535	0,6±0,9	1,6±1,3	41,2±36,5	2,8±3,1	8,4±2,8	5,6±1,2
9-Heptacoseno#	2678	27,1±6,1	26,7±11,3	11,7±5,2	19,0±17,6	10,1±2,7	11,0±1,7
6-Metiloctacosano°	2845	ND	ND	ND	ND	2,5±4,5	6,1±3,2
9-Nonacoseno	2878	ND	3,0±2,9	ND	ND	1,3±1,7	4,2±2,2
13,17-diMetiltriacontano°	3056	ND	ND	ND	ND	6,0±9,5	22,9±5,6

ND= não detectado, IR= índice de retenção,\*Composto majoritário, #Compostos que aparecerem em todas as amostras, • Compostos exclusivos de machos do ambiente urbano e de pastagem, ° Compostos exclusivos de ambiente de mata.

A análise discriminante mostra que, existem diferenças significativas entre as amostras de cutícula de fêmeas e machos oriundos de 3 diferentes ambientes (Wilks' lambda= 0,018, F=4,788 e p <0,001) (Fig. 2 A e B). Houve diferença significativa também entre a cutícula das fêmeas provenientes de diferentes ambientes (Wilks' lambda= 0,125 F=8,412 p<0,001) (Fig. 2 B) e entre a cutícula de machos dos ambientes distintos (Wilks' lambda=0,010 F=10,497 p<0,001) (Fig. 2 A).

## *Euspilotus azureus*

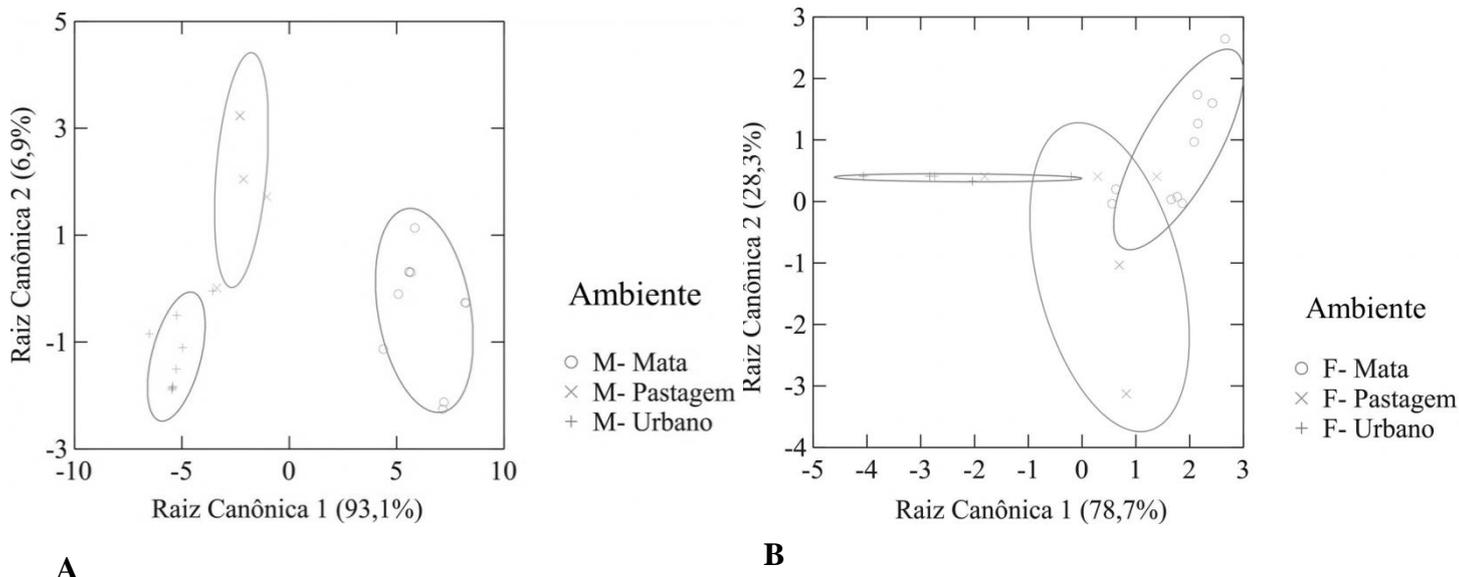


**Fig. 1.** Proporção relativa (%) de compostos presentes na cutícula de machos (M) e fêmeas (F) da espécie de besouro *Euspilotus azureus* dos ambientes de mata, urbano e pastagem.

A distância de Mahalanobis ao quadrado entre as amostras de machos e fêmeas (Tabela 2) provenientes de diferentes ambientes mostrou que o perfil químico dos indivíduos da mata é mais distante dos demais e que há uma maior similaridade entre o perfil químico dos indivíduos do ambiente urbano e pastagem, entretanto ainda assim pastagem é o que mais se aproxima do ambiente de mata (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distâncias de Mahalanobis ao quadrado obtidas pela comparação dos diferentes ambientes de machos (M) e fêmeas (F) de *Euspilotus azureus*.

	<b>Ambientes</b>					
	<b>Urbano</b>		<b>Pastagem</b>		<b>Mata</b>	
	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>
<b>Urbano</b>	0,00	0,00	21,58	10,54	134,32	17,00
<b>Pastagem</b>	21,58	10,54	0,00	0,00	79,32	5,96
<b>Mata</b>	134,32	17,00	79,32	5,96	0,00	0,00



**Fig. 2:** Diagrama de dispersão mostrando a diferenciação do perfil cuticular por CG-EM de **A-** machos (M) e **B-** fêmeas (F) da espécie de besouro *Euspilotus azureus* nos ambientes de mata, pastagem e urbano.

## DISCUSSÃO

Foram detectadas diferenças qualitativas e quantitativas nas amostras de fêmeas e machos de *E. azureus* entre os diferentes tipos ambientes sendo que dos 11 compostos, o maior número foi identificado nas amostras de machos do ambiente urbano e o menor número, 3 em fêmeas do ambiente urbano e de pastagem. Na cutícula do besouro *Megabruchidius dorsalis* e *M. tonkineus*, os autores identificaram 20 compostos em machos e fêmeas variando entre 27 a 32 átomos de carbono (Booksmythe et al. 2017). Em *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae) observaram uma mistura de compostos por n-alcenos, alcenos e metil ramificados, nos quais identificaram 88 compostos que variam de 18 a 33 átomos de carbono (Steiger et al. 2008). Esta variação do número de compostos entre espécies de insetos fortalece o fato de que estes podem ser usados como ferramenta taxonômica complementar (Roux et al. 2006, Ye et al. 2007, Guillem et al. 2012, Moore et al. 2014).

Assim como em nosso estudo, Martin et al. 2008, detectaram relativamente poucos compostos na cutícula da formiga da espécie *Formica exsecta*, sugerindo que a discriminação entre coespecíficos evoluiu para confiar em respostas altamente sensíveis de poucos compostos. Por outro lado, o número de compostos também está ligado a

ecologia do inseto, pois dele depende o quanto o animal é exposto a variação ambiental e o quanto depende deles durante as interações intraespecíficas.

O composto majoritário, independente do sexo e ambiente foi o 9-pentacoseno. Somente três compostos ocorrem em todas as amostras, dentre elas, dois alcenos (9-pentacoseno e 9-heptacoseno) e um alceno ramificado (13-metilpentacosano). Os alcenos (C23:1, C25:1, C27:1 e C29:1) com dupla ligação no carbono nove presentes na cutícula de formigas da espécie *Formica exsecta* são responsáveis pelo reconhecimento entre companheiros de ninho (Martin et al. 2008). Logo, a presença majoritária do 9-pentacoseno neste estudo, indica que este composto deve ser muito importante para intermediar a comunicação química destes insetos, provavelmente no momento da reprodução.

Nas amostras da cutícula desta espécie encontramos apenas um alceno linear e este ocorreu somente em machos do ambiente urbano. É fato que os alcanos lineares são utilizados para evitar a dessecação (Lockey 1988), no entanto, uma característica dos coleópteros que lhes conferiu o grande sucesso evolutivo que possivelmente pode explicar o fato de poucos alcanos lineares é a presença de uma cutícula muito esclerotizada que tem como função proteger o inseto, seja contra perda de água ou evitar predação, funcionando como um escudo protetor (Borror e DeLong 1988). Esta característica provavelmente está ligada ao fato desta espécie não investir em compostos específicos para evitar a perda de água. Outro ponto que possivelmente pode explicar o fato da mesma apresentar poucos compostos de cadeias mais leves pode estar ligada ao comportamento adotado por esta espécie durante todo seu ciclo de vida, pois permanecem protegidas abaixo do solo ou sob pedras, abrigadas em lugares onde não há exposição a temperaturas elevadas, predando larvas, sobretudo de dípteros (Caneparo et al. 2017). Por outro lado, é necessário levar em conta o fato de que os HCs podem também apresentar várias funções, pois uma categoria de compostos pode apresentar funções tanto de sinalização, quanto barreira contra dessecação (Chung e Carroll 2015).

O composto mais numeroso foi o 9-pentacoseno e o mais abundante foi 1-nonacedeno, independente do sexo. Observamos variação do número de compostos entre machos e fêmeas do ambiente urbano e de pastagem, ocorrendo maior número de compostos nas amostras de machos. Machos e fêmeas do ambiente de mata apresentaram o mesmo número de compostos, porém, ocorreram diferenças em seus teores.

Em estudos com os besouros *Megabruchidius dorsalis* e *M. tonkineus*, foram identificadas somente diferenças quantitativas entre indivíduos de sexo diferentes (Booksmythe et al. 2017). Quando amostras de cutícula de *Drosophila mojavensis* foram observadas, somente encontrou-se diferenças quantitativas entre amostras de machos e fêmeas, sendo que essas diferenças foram observadas mais especificamente em alcenos e alcadienos, além disso, os autores afirmam que este dimorfismo sexual baseado nos HCs é específico de cada região (Egges e Ahrens 2001).

Em estudos com *Calliphora vomitaria* (Diptera), os machos e fêmeas diferiram em seus hidrocarbonetos cuticulares, sendo que apenas em fêmeas foi detectado o composto alceno e os machos apresentaram uma menor quantidade de compostos (Trabalon et al. 1992). Em análise do perfil químico cuticular de machos e fêmeas de *Hydrotaea aenescens* (Diptera: Muscidae), foi observado que o dimorfismo se torna mais pronunciado de acordo com a idade, sendo a que a partir de 4 a 8 dias observou-se uma maior abundância de alcenos nos machos (Carlson et al. 2001).

O fato de encontrarmos diferenças qualitativas entre as amostras dos dois sexos e entre os diferentes tipos de ambientes mostra que ainda serão necessários mais estudos sobre estes compostos, sobretudo para espécies de interesse forense.

No entanto, o fato da cutícula dos machos terem mais compostos, pode estar relacionado aos seus diferentes papéis na carcaça e durante a reprodução, pois eles chegam primeiro na carcaça atraídos pelos odores liberados durante a decomposição. Depois de um tempo predando, eles liberam feromônios voláteis para atração da fêmea até o recurso, onde irão copular, e realizar a ovipostura (Von Hoermann et al. 2011, Fockink et al. 2015).

As amostras de machos representaram melhor a variação que há entre elas em função de cada um dos 3 ambientes (Fig. 2 A). Assim, esta informação é útil caso a perícia tenha em mãos este tipo de evidência para se analisar e caso queiram determinar o local do crime e/ou ocultação do cadáver.

De modo geral as amostras provenientes de 3 diferentes tipos de ambientes apresentam diferenças significativas em seu perfil químico cuticular (Fig. 2 A e B). De fato, outros estudos relacionaram as diferenças encontradas entre amostras de insetos de diferentes populações como provenientes de fatores ambientais (Kruger et al. 1991, Dahbi et al. 1996, Dapporto et al. 2004, Paula et al. 2017). É provável que as amostras aqui sejam de indivíduos provenientes de uma mesma população dado as distâncias

geográficas entre elas. De fato, a composição cuticular reflete a semelhança com o ambiente (Dapporto et al. 2004). Portanto os fatores ambientais são importantes para compor o perfil químico dos insetos (Kruger et al. 1991), uma vez que estas diferenças podem ocorrer devido as diferentes pressões ambientais (Service et al. 1985).

As amostras de indivíduos coletados em ambientes mais próximos apresentaram o perfil químico cuticular relativamente mais semelhantes comparado com o perfil da cutícula dos indivíduos coletados entre ambientes relativamente mais distantes. De fato, a distância de Mahalanobis ao quadrado indica que o ambiente de mata se encontra mais distante dos demais com um perfil bem característico, pastagem ficou entre os dois ambientes mostrando que o perfil químico é intermediário. Já as amostras do ambiente urbano ficaram mais próximas do ambiente de pastagem (Tabela 2). Em estudos com vespas *Polistes dominula*, foi encontrada maior similaridade de compostos nas localidades mais próximas comparado com as localidades mais distantes (Dapporto et al. 2004). Esta similaridade pode ser explicada por maior nível de parentesco entre os indivíduos de ambientes mais próximos, devido a capacidade de dispersão da espécie (Service et al. 1985). Por outro lado, também podem ser consequência, ao menos em parte de similaridade dos recursos explorados em cada um dos ambientes (Menzel et al. 2017).

Os resultados mostram que as análises químicas da cutícula do besouro *E. azureus* são ferramentas complementares úteis para ajudar a investigar o local onde o crime pode ter acontecido, ou mesmo casos de translocação de cadáveres na tentativa de ocultamento, uma vez que a composição varia significativamente em função sobretudo, de condições locais específicas. O dimorfismo sexual dos HCs desta espécie comprova que amostras de machos podem ser as mais confiáveis para este tipo de investigação e deve ser levado em conta no momento da coleta de evidências no cadáver.

## REFERÊNCIAS

- Blomquist, G. e A.G. Bagnères. 2010.** Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology. Cambridge University Press, Cambridge, NewYork.
- Bonelli, M., M.C. Lorenzi, J.P. Christide`s, S. Dupont, e A.G. Bagnères. 2015.** Population diversity in cuticular hydrocarbons and mtDNA in a mountain social wasp. J. Chem. Ecol. 41: 22–31.

- Booksmythe, I., H.D. Rundle, e G. Arnqvist. 2017.** Sexual dimorphism in epicuticular compounds despite similar sexual selection in sex role-reversed seed beetles. *J. Evol. Biol.* 30: 2005–2016.
- Borrór, D.J., D.M. DeLong. 1988.** Introdução ao Estudo dos Insetos. São Paulo: Edgard Blücher.
- Brown, W.V., J.P. Spradbery, e M.J. Lacey. 1991.** Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp, *Vespula germanica* (F.) (Hymenoptera: Vespidae). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 99: 553–562.
- Byrne, A.L., M.A. Camann, T.L. Cyr, E.P. Catts, e K.E. Espelie. 1995.** Forensic implications of biochemical differences among geographic populations of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *J. Forensic Sci.* 40: 372–77.
- Caneparo, M.F.C., M.L. Fischer, L.M. Almeida. 2017.** Effect of Temperature on the Life Cycle of *Euspilotus azureus* (Coleoptera: Histeridae), a Predator of Forensic Importance. *Fla Entomol.* 100: 795–801.
- Carlson, D.A., U.R. Bernier, J.A. Hogsette, B.D. Sutton. 2001.** Distinctive hydrocarbons of the black dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Diptera: Muscidae) *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 48: 167–178
- Carvalho L.M.L., P.J. Thyssen, A.X. Linhares, e F.A.B. Palhares. 2000.** A checklist of Arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95: 135–138.
- Carvalho, L.M.L., e A.X., Linhares. 2001.** Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. *J. Forensic Sci.* 46: 604–608.
- Catts, E.P. e M.L. Goff. 1992.** Forensic entomology in criminal investigations. *Annu. Rev. Entomol.* 27: 253–272.
- Celli, N.G.R., F.W.T. Leivas, M.F.C. Caneparo, e L.M. Almeida. 2015.** Chave de identificação e diagnose dos Histeridae (Insecta: Coleoptera) de interesse forense do Brasil. *Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre.* 105: 461–473.
- Centeno, N., M. Maldonado, e A. Oliva. 2002.** Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires province (Argentina). *Forensic Sci. Int.* 126: 63–70.
- Chung, H., e S.B. Carroll. 2015.** Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *BioEssays.* 37, 822–830.

- Crosby, T.K., J.C. Watt, A.C. Kistemaker, e P.E. Nelson. 1986.** Entomological identification of the origin of imported cannabis. *J. Forensic Sci. Soc.* 26: 35–44.
- Cruz, T.M. e S.D. Vasconcelos. 2006.** Entomofauna de solo associada à decomposição de carcaça de suíno em um fragmento de mata atlântica de Pernambuco, Brasil. *Biociências, Porto Alegre.* 14: 193–201.
- Dahbi, A., X. Cerda, A. Hefetz, e A. Lenoir. 1996.** Social closure, aggressive behavior, and cuticular hydrocarbon profiles in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (Hymenoptera, Formicidae). *J. Chem. Ecol.* 22: 2173–2186.
- Dapporto, L., P. Theodora, C. Spacchini, G. Pieraccini, e S. Turillazzi. 2004.** Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.* 51: 279–286.
- Etges, W.J. e M.A. Ahrens. 2001.** Premating isolation is determined by larval-rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. V. Deep geographic variation in epicuticular hydrocarbons among isolated populations. *Am. Nat.* 158: 585–598.
- Fockink, D.H., C.B.C. Martins, e P.H.G. Zarbin. 2015.** Identification and synthesis of the male produced volatiles of the carrion beetle, *Oxelytrum erythrurum* (Coleoptera: Silphidae). *Tetrahedron Letters* 56: 5353–5356.
- Gianizella, S.L. e A.P. Prado. 1998.** Levantamento e Sazonalidade de Coleópteros (Histeridae) em Criação de Aves Poedeiras. *An. Soc. Entomol. Bras.* 27: 551–557.
- Gibbs, A.G., A.K. Chippindale, e R.R. Michael. 1997.** Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 200: 1821–1832.
- Guillem, R.M., F.P. Drijfhout, e S.J. Martin. 2012.** Using chemotaxonomy of host ants to help conserve the large blue butterfly. *Biol. Conserv.* 148: 39–43.
- Howard, R.W., C.A. McDaniel, e C.J. Blomquist. 1978.** Cuticular hydrocarbons of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Chem. Ecol.* 4: 233–245.
- Koller, W.W., A. Gomes, e S.R. Rodrigues. 2002.** Fimicolous Histeridae Coleoptera in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 62: 473–478.
- Kovarik, P.W., M.S. Caterino. 2001.** Histeridae. In: Arnett RH, Thomas MC. (eds.) *American Beetles. Vol. 1: Archostemata, Myxophaga, Adephaga, Polyphaga: Staphyliniformia.* CRC Press. 443 p.

- Kruger, E.L., C.D. Pappas, e R. Howard. 1991.** Cuticular hydrocarbon geographic variation among seven North America populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 28: 859–864.
- Lockey, K.H. 1988.** Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 89: 595–645.
- Lopes, P.P., J.N.C. Louzada, P.L. Oliveira-Rebouças, L.M. Nascimento, e V.P.G. Santana-Reis. 2005.** Resposta da Comunidade de Histeridae (Coleoptera) a Diferentes Fisionomias da Vegetação de Restingas no Espírito Santo. *Neotrop. Entomol.* 34: 25–31.
- Madra, A., S. Konwerski, e S. Matuszewski. 2014.** *Necrophilous staphylininae* (Coleoptera: Staphylinidae) as indicators of season of death and corpse relocation. *Forensic Sci. Int.* 242: 32–37.
- Manly, B.J.F. 2008.** Métodos estatísticos multivariados: uma introdução, 3rd ed. Bookman, Porto Alegre, RS.
- Martin, S.J., H. Helantera, e F.P. Drijfhout. 2008.** Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in Formica ants. *Biol. J. Linn. Soc.* 95: 131–140.
- Mazur, S. 2011.** A concise catalogue of the Histeridae (Insecta: Coleoptera). Warsaw: WULS – SGGW Press. 332 pp.
- Menzel, F., T. Schmitt, e B.B. Blaimer. 2017.** The evolution of a complex trait: cuticular hydrocarbons in ants evolve independent from phylogenetic constraints. *J. Evol. Biol.* 30: 1372–1385.
- Mise, K.M., L.M. Almeida, M.O. Moura. 2007.** Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. *Rev. Bras. Entomol.* 51: 358–368.
- Mise, K.M., A.S.B. Souza, C.M. Campos, R.L.F. Keppler, e L.M. Almeida. 2010.** Coleoptera associated with pig carcass exposed in a forest reserve, Manaus, Amazonas, Brazil. *Biota Neotrop.* 10: 321–324.
- Monteiro-Filho E.L.A., e J.L. Penereiro. 1987.** Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo. *Brasil. Rev. Bras. Biol.* 47: 289–295.
- Moore, H.E.A., D. Craig, B. Adam, e F.P. Drijfhout. 2014.** Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Sci. Int.* 240: 48–53.

- Oliveira-Costa J. 2003.** Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios. Campinas. Ed. Millenium.
- Oliveira-Costa, J. 2013.** Insetos “peritos”: entomologia Forense no Brasil. 1st ed. Ed. Millenium, Campinas, São Paulo.
- Paula, M. C., W. F. Antonialli-Junior, A. Mendonça, K. B. Michelutti, A. D. Eulalio, C. A. L. Cardoso, T. Lima, and C. J. Von Zuben. 2017.** Chemotaxonomic Profile and Intraspecific Variation in the Blow Fly of Forensic Interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol. 54: 14–23.
- Quinn, G.P., e M.J. Keough. 2002.** Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press.
- Rodrigues, S.R. e L.C. Marchini. 1998.** Espécies de Histeridae coletadas em Piracicaba, SP. Sci. Agri. 55: 59–63.
- Rodriguez, W.C., W.M. Bass. 1983.** Insect activity and its relationship to decay rates of human cadavers in east Tennessee. J. Forensic Sci. 28: 423–432.
- Roux, O., C. Gers, e L. Legal. 2006.** When, during ontogeny, waxes in the blowfly (Calliphoridae) cuticle can act as phylogenetic markers. Biochem. Syst. Ecol. 34: 406–416.
- Santos, W.E. 2014.** Papel dos besouros (Insecta, Coleoptera) na Entomologia Forense. Rev. Bras. Crim. 3: 36-40.
- Service, P.M., E.W. Hutchinson, M.D. Mackinley, e M.R. Rose. 1985.** Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. Physiol. Zool. 58: 380–389.
- Singer, T.L., K.E. Espelie e G.J. Gamboa, 1998.** Nest and nestmate discrimination in independent-founding paper wasps. In: Pheromone Communication in Social Insects (R.K. Vander Meer, M.D. Breed, M.L. Winston and K.E. Espelie, Eds.) Westview Press, Oxford. 104–125.
- Souza, A.S.B., F.D. Kirst e R.F. Krüger. 2008.** Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul State in southern Brazil. Rev. Bras. Entomol. 52: 641–646.
- Steiger, S., K. Peschke e J.K. Müller. 2008.** Correlated changes in breeding status and polyunsaturated cuticular hydrocarbons: the chemical basis of nestmate recognition in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*? Behav. Ecol. Sociobiol. 62: 1053–1060.

- Trabalon M., M. Campan, J.L. Clément, C. Lange, e M.T. Miquel. 1992.** Cuticular hydrocarbons of *Calliphora vomitoria* (Diptera): relation to age and sex Gen. Comp. Endocrinol., 85(2): 208–216.
- Von Hoermann C., J. Ruther, S. Reibe, B. Madea, e M. Ayasse. 2011.** The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle *Dermestes maculatus* (De Geer). Forensic Sci. Int. 212: 173–179.
- Weiss, K., C. Parzefall, e G. Herzner. 2014.** Multifaceted defense against antagonistic microbes in developing offspring of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). PLoS ONE. 9: 1–14.
- White, R.E. 1983.** Superfamily Histeroidea. In: White RE. (Eds.). A field guide to the beetles of North America. The Peterson field guide series 29. Boston: Houghton Mifflin Company. 368 pp.
- Wolff, M., A. Uribe, A. Ortiz, e P. Duque. 2001.** A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. J. Forensic. Sci. 120: 53–59.
- Ye, G.Y., K. Li, J.Y. Zhu, G.H. Zhu, e C. Hu. 2007.** Composition in Pupal Exuviae for Taxonomic Differentiation of Six Necrophagous Flies. J. Med. Entomol. 44: 450–456.
- Zhu, G.H., G.Y. Ye, C. Hu, X.H. Xu, e K. Li. 2006.** Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. Med. Vet. Entomol. 20: 438–444.
- Zhu, G.H., Ye, G.Y., K. Li, C. Hu, X.H. Xu. 2013.** Determining the age of adult flesh flies, *Boettcherisca peregrina*, using pteridine fluorescence. Med. Vet. Entomol. 27: 59–63.
- Zhu, G.H., Z.J. Jia, X.J. Yu, K.S. Wu, L.S. Chen, J.Y. Lv, e M.E. Benbow. 2017.** Predictable weathering of puparial hydrocarbons of necrophagous flies for determining the postmortem interval: a field experiment using *Chrysomya rufifacies*. Int. J. Legal Med. 131: 1–10.

## CAPÍTULO II

### EFEITO DA INGESTÃO DO INSETICIDA TIAMETOXAM NO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE BESOUROS DE INTERESSE FORENSE

#### RESUMO

Durante todo o processo de decomposição a coleopterofauna pode ser utilizada para responder diversas questões no âmbito das ciências forenses e da entomotoxicologia. O aumento de mortes ligadas a utilização de compostos tóxicos, acidentalmente ou propositalmente, justifica o interesse por análises toxicológicas. No entanto, são raros os estudos que já investigaram este tema. Portanto, testamos a hipótese de que o perfil químico cuticular das espécies *Euspilotus azureus* e *Dermestes maculatus* sofre alteração pela ingestão de recurso contaminado com compostos tóxicos. Esperamos que, no caso de contaminação, a detecção, por meio da alteração do perfil químico do inseto, auxilie nas investigações forenses para a descoberta da possível causa da morte. Foram feitos experimentos na qual oferecemos 1kg carne de porco contaminada e não contaminada para adultos dos besouros de duas espécies. Os resultados obtidos mostram que os HCs podem ser afetados pela contaminação com inseticida tiametoxam, havendo uma alteração qualitativa e quantitativa da composição química cuticular das amostras de besouros. Isto aponta para o uso de uma nova ferramenta para avaliar se a causa da morte pode ter sido por envenenamento ou, ainda, se o cadáver estiver em área de cultura, se houve possível contaminação do cadáver, o que pode então afetar o ciclo de desenvolvimento de insetos e com isto dificultar a determinação do Intervalo Pós Morte usando este tipo de amostras.

**Palavras-Chave:** Predadores, necrófagos, hidrocarbonetos cuticulares.

## **EFFECT OF INTEGRATING TIAMETOXAM IN THE CUTICULAR CHEMICAL PROFILE OF BEETLES OF INTEREST**

### **ABSTRACT**

Throughout the decomposition process the coleopterofauna can be used to answer several questions in the forensic sciences and entomotoxicology. The increase in deaths associated with the use of toxic compounds, accidentally or intentionally, justifies the interest for toxicological analysis. However, there are few studies that have investigated this topic. Therefore, we tested the hypothesis that the chemical profile of the species *Euspilotus azureus* and *Dermestes maculatus* is altered by the ingestion of a resource contaminated with toxic compounds. We hope that, in the case of contamination, the detection, through the alteration of the chemical profile of the insect, will aid in forensic investigations for the discovery of the possible cause of death. Experiments were conducted in which we offered 1kg contaminated and uncontaminated pork to adult beetles of two species. The results show that the HCs can be affected by the contamination with insecticide thiamethoxam, with a qualitative and quantitative alteration of the chemical composition of the beetle samples. This points to the use of a new tool to assess whether the cause of death may have been poisoning or even if the corpse is in the culture area if there was possible contamination of the corpse, which may then affect the development cycle of insects and with this make it difficult to determine the Postmortem Interval using this type of samples.

**Keywords:** Predators, scavengers, cuticular hydrocarbons.

## INTRODUÇÃO

Os insetos possuem uma rica diversidade de espécies ocupando uma grande variedade de habitats e nichos (Borror e DeLong 1988). A fauna associada a cadáveres tem sido estudada como uma das principais alternativas para auxiliar a responder diversas questões no âmbito criminal (Oliveira-Costa 2013). A ciência que aplica evidências entomológicas para auxiliar a resolução de investigações criminais denomina-se “entomologia forense” (Pujol-Luz et al. 2008). Uma das principais questões a serem resolvidas dentro das investigações forenses é a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM), que pode ser realizada por meio da utilização dos imaturos que se alimentam deste recurso como fonte proteica ou pela sucessão ecológica dos insetos associados a carcaças (Catts e Haskel 1991).

O processo de decomposição de um cadáver apresenta vários estágios, como a fase ainda fresca, o inchaço, a decomposição ativa, avançada, a fase seca e os restos (Payne 1965). De acordo com o estágio de decomposição do cadáver diferentes espécies de insetos são atraídas, para utilizar o cadáver como sítio de reprodução e fonte de alimentação e, além disto, colonizam em uma sequência com base na sua preferência alimentar (Catts e Goff 1992, Benecke et al. 2004).

Coleoptera é a segunda ordem de maior diversidade de Insecta (Borror e DeLong 1988) e representa alto interesse forense já que é o segundo grupo que mais ocorre em carcaças, tornando-se então uma das principais evidências para a determinação do IPM, sobretudo, em casos com o estágio de decomposição mais avançado do cadáver (Kulshrestha e Satpathy 2001). Com o avanço do estágio de decomposição da carcaça, ocorre um aumento da abundância e diversidade dos coleópteros (Goff 1991).

De acordo com sua preferência alimentar os coleópteros são categorizados como: necrófagos, onívoros e predadores/parasitoides (Oliveira-Costa 2013). Dentre os necrófagos a família Dermestidae, se alimenta principalmente de pele seca e outros tecidos moles de animais, além disso, algumas espécies são pragas de grãos, sementes, cortiça e cereais (Mise et al. 2010). Dentro desta família a espécie *Dermestes maculatus* (Degeer 1774), é a mais comum encontrada em carcaças e por isso, de grande importância forense (Kulshrestha e Satpathy 2001). Esta espécie possui corpo alongado, convexo com o comprimento que varia de 0,75 a 1,0 cm, com coloração parda e pilosidade amarelada em todo o corpo (Almeida e Mise 2009). Seu estágio de

desenvolvimento pode variar de acordo com as condições ambientais em que são expostos, sendo encontrados de seis (Riley 1870) até onze instares (Gay 1938).

Outra família de besouros relevantes para a entomologia forense é a Histeridae, que possui cerca de 4.300 espécies descritas (Mazur 2011). É conhecida como predadora generalista e encontrada principalmente nos estágios iniciais da decomposição cadavérica, pois sua presença está associada à fase imatura de dípteros (Bajerlein et al. 2011). Entretanto, também ocorre nos estágios de decomposição ativa, avançada e esqueletização (Kovarik e Caterino 2001, Gennard, 2007, Mise et al. 2007), pois nestes estágios ainda há a presença de larvas de pós alimentação e pupas. A espécie *Euspilotus azureus* da família Histeridae tem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Venezuela, Argentina, Chile, Guiana Francesa (Aballay et al. 2012, Degallier et al. 2012) e também no Brasil, (Mise et al. 2007, 2010).

Neste sentido, a coleopterofauna pode ser utilizada para responder diversas questões no âmbito das ciências forenses durante todo o processo de decomposição e a ciência que estuda e aplica-os na análise toxicológica denomina-se entomotoxicologia (Introna et al. 2001). Há vários métodos de análise tradicionais capazes de qualificar e quantificar compostos tóxicos (Collins et al. 1997), no entanto quando um cadáver apresenta estágio de decomposição avançado a utilização da fauna entomológica é um método mais preciso (Oliveira-Costa 2013). Nestes casos por meio da análise do inseto é possível determinar tanto quantitativamente quanto qualitativamente os compostos tóxicos presentes em tecidos, uma vez que os insetos ao se alimentarem do cadáver em decomposição, acumulam substâncias que estavam presentes nos tecidos (Zanetti et al. 2016). Além disso, este ramo estuda o efeito que estas substâncias causam no desenvolvimento dos insetos para aumentar a precisão na estimativa do IPM. Com o aumento de mortes relacionadas a ingestão de compostos tóxicos, acidentalmente ou propositalmente, justifica o interesse por análises toxicológicas alternativas (Introna et al. 2001).

Crimes com tentativa de ocultamento de cadáveres é comum em regiões de difícil acesso, como por exemplo, em plantações de cana de açúcar, que devido à distância de áreas urbanizadas e altura das plantas, torna-se difícil o achado de corpo pela perícia, comprometendo assim estimativas de IPM. Monoculturas recebem aplicações de inseticidas de forma aérea e caso haja um cadáver exposto também sofrerá contaminação pelo inseticida utilizado na plantação.

Um dos grupos de inseticidas mais utilizados atualmente são os “neonicotinóides” (Tomizawa e Casida 2003). No qual podemos citar o tiametoxam que tem sido frequentemente utilizado em várias culturas, como: cana-de-açúcar, frutas cítricas, café, arroz e abacaxi, e sua aplicação é feita principalmente por meio aéreo ou terrestre (Nondillo et al. 2007). Não há estudos que avaliam os efeitos deste tipo de contaminação sobre a entomofauna e seu perfil químico.

Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são encontrados na camada mais superficial da cutícula dos insetos, a epicutícula (Service et al. 1985) são representados principalmente por uma mistura de hidrocarbonetos saturados, insaturados e ramificados (Howard et al. 1978), exercendo assim a função de proteção contra dessecação, defesa contra microrganismos patógenos (Singer 1998) e comunicação química (Blomquist e Bagnères 2010). Estes compostos vêm sendo muito estudados no campo das ciências forenses como uma alternativa para agilizar a obtenção de resultados e assim auxiliar na resolução de várias questões judiciais (Zhu et al. 2006, Ye et al. 2007, Moore et al. 2014, Paula et al. 2017).

Alguns estudos já avaliaram que o alimento ingerido pelo inseto possui influencia na composição do perfil químico cuticular (Liang e Silverman 2000, Buczkowski et al. 2005, Otte et al. 2018). Desta forma testamos a hipótese de que o perfil químico cuticular das espécies *E. azureus* e *D. maculatus* sofre alteração pela ingestão de recurso contaminado com compostos tóxicos e esperamos que, no caso de contaminação, a detecção, por meio da alteração do perfil químico do inseto, auxilie nas investigações forenses para a descoberta da possível causa da morte.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Testes realizados com *Euspilotus azureus* (Histeridae)**

Desenvolvemos o estudo no município de Dourados-MS, Brasil (latitude 22° 23” Sul, longitude 54° 83” Oeste), de agosto a setembro de 2017. Os adultos de *E. azureus* foram coletados com a utilização de dois pedaços de carne de porco com aproximadamente 1kg cada, que ficaram exposto em uma bandeja de 17x27 cm, durante dois dias. Após a coleta os insetos foram transportados para o Laboratório de Ecologia Comportamental (LABECO), na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) para confirmação da espécie de acordo com Celli et al. (2015) e realização do

experimento. Os insetos foram mantidos em recipientes plásticos de 1 L no qual na tampa havia um organza medindo 20x10 cm para permitir o fluxo de ar dentro do recipiente e mantidos em sala climatizada a 22 ° C.

Uma criação estoque de moscas da espécie *Chrysomya megacephala* foi mantida para alimentar os besouros, uma vez que *E. azureus* são predadores e se alimentam de larvas de dípteros (Oliveira-Costa 2013). A criação estoque de *C. megacephala* foi feita a partir de adultos selvagens, acondicionados em gaiolas de criação de 40 cm<sup>3</sup> e mantidos em condições controladas na câmara de incubação em Demanda Bioquímica do Oxigênio (BOD) (Fanem, Modelo 347 CD, SP–Brasil), com temperatura constante de 25° C e fotoperíodo 12/12. Para obtenção dos ovos de moscas, as fêmeas tiveram seus ovários maturados durante 5 dias consecutivos por meio de fígado bovino cru, substituído por um novo a cada dia e água *ad libitum*. Após este período foi retirado fígado, com a maturação dos ovários, foi oferecida carne moída crua como substrato de oviposição, como proposto por Paula et al. (2017). Após a oviposição montou-se amostras com a proporção de 0,005 g de ovos para 200 g de carne. E após as larvas atingirem o segundo ínstar, foram separadas aleatoriamente 14 larvas para a realização do experimento. O segundo ínstar foi escolhido baseado no estudo de Caneparo et al. (2017) o qual avaliou que *E. azureus* tem preferência por larvas de segundo estágio de moscas.

Para a realização do experimento utilizamos 14 adultos de *E. azureus* que foram individualizados em recipientes e alimentados com larvas de segundo ínstar de *C. megacephala*, 7 adultos alimentados com larvas de moscas contaminadas com 10µL da solução do inseticida tiametoxam, uma larva para cada adulto de *E. azureus* e os outros 7 receberam uma larva cada, sem contaminação.

O preparo da solução foi realizado a partir dos cálculos recomendados pela bula do inseticida para plantações de cana-de-açúcar, sendo dissolvido 20g em 1L de água. Para a contaminação das larvas foi utilizada uma seringa 10 µL da solução e posteriormente injetado nas larvas e oferecido para os adultos de *E. azureus* se alimentarem. Um dia após consumirem as larvas foram realizadas as extrações dos compostos químicos cuticulares dos espécimes. Em testes realizados anteriormente, os besouros alimentados com larvas contaminadas tiveram uma taxa de mortalidade de 100% em no máximo dois dias de contato com o alimento.

### **Testes realizados com *Dermestes maculatus* (Dermestidae)**

Para a coleta de adultos da espécie *D. maculatus* foi utilizada 1kg de carne suína, a mesma utilizada para a coleta dos histerídeos, só que em estágio de decomposição avançada, principalmente na fase seca e restos. Para a coleta dos indivíduos utilizou-se pinças e recipientes plásticos de 200 mL e, em seguida foram levados para o laboratório para serem mantidos em Câmara de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) (Fanem, Modelo 347 CD, São Paulo – SP – Brasil) com temperatura de 25°C e variação de  $\pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo de claro e escuro de 12:12 h.

Por conta do hábito necrófago e sua preferência por proteína desidratada, foi deixado um pedaço de carne de porco com 1 kg exposto em uma bandeja de 17x27 cm, coberto por organza em uma BOD durante 10 dias para que ocorresse a desidratação da carne. Posteriormente este pedaço de carne foi dividido ao meio de modo que metade foi contaminada com o inseticida tiametoxam e a outra metade não foi contaminada. A solução utilizada para a contaminação foi a mesma do experimento anterior e a aplicação foi realizada com auxílio de um pincel número 4, para que fosse possível a aplicação total e uniforme da toxina.

Os pedaços de carne foram distribuídos em dois recipientes de plástico medindo 45x25x15 de modo que na parte central da tampa continha um pedaço de organza medindo 20x10 cm para permitir o fluxo de ar dentro do pote. Sete indivíduos adultos de *D. maculatus* foram distribuídos em cada pote, sendo um grupo contaminado pelo inseticida e outro denominado controle, não. Um dia após a exposição aos alimentos foram coletados para a realização das extrações dos compostos químicos cuticulares.

### **Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)**

Para avaliar se a contaminação pelo inseticida pode alterar a composição química cuticular dos besouros, os extratos da cutícula foram extraídos de todos os indivíduos envolvidos nos experimentos. Para cada extração foi utilizado 1 indivíduo inteiro, que foi então colocado em um recipiente de vidro com 2 mL de hexano por 3 minutos para extração de seus HCs. Após a retirada do indivíduo as amostras foram secas em capela de exaustão e congeladas até as análises por no máximo 15 dias. Para as análises, cada extrato foi solubilizado em 200  $\mu\text{L}$  de hexano.

As amostras foram analisadas empregando um Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (GC-MS Ultra 2010), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura).

As condições de análise foram: volume de injeção de 1 µL, injeção splitless; rampa de aquecimento com temperatura inicial de 150 °C alcançando 300 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> e permanecendo na temperatura final por 10 minutos; temperatura do injetor de 220 °C. As temperaturas do detector e da linha de transferência foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. Os parâmetros de varredura do espectrômetro de massas incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 e V, faixa de massa de m/z 45 a 600 e intervalo de varredura de 0.3s.

As identificações dos compostos foram realizadas empregando o índice de retenção calculado, usando uma mistura de alcanos lineares (C7-C40, Sigma Aldrich com pureza ≥ 95%) como referência externa em relação ao índice de retenção da literatura (Brown et al. 1991, Zhu et al. 2006, 2013, 2017, Moore et al. 2014, Weiss et al. 2014, Bonelli et al. 2015) e associado à interpretação dos espectros de massas obtidos com as amostras e comparados com as bases de dados (NIST21 e WILEY229).

### **Análises Estatísticas**

Para avaliar se a composição química cuticular das amostras contaminadas é significativamente diferentes daquelas não contaminadas foi aplicado um teste T, utilizando a média da área percentual relativa dos compostos provenientes da cutícula dos besouros. Consideramos resultado significativo quando o nível de significância foi menor ou igual a 0,05%.

## **RESULTADOS**

Na cutícula de *E. azureus* foram identificados 17 compostos, sendo que 15 destes ocorreram nas amostras controle e 7 nos tratamentos (Tabela 1). O comprimento de cadeia carbônica variou do C<sub>16</sub> ao C<sub>34</sub> nas amostras controle e do C<sub>25</sub> ao C<sub>32</sub> nas amostras do grupo tratamento. Os compostos encontrados são alcenos, alcanos ramificados e alcanos lineares (Fig. 1). Nas amostras de *E. azureus* ocorreram 5 compostos compartilhados em ambos os grupos, o n-heneicosane, nonacosane, 2-metiloctacosane, tetracontane e 2-metiltriacontane. Nas amostras controle ocorreram 10 compostos

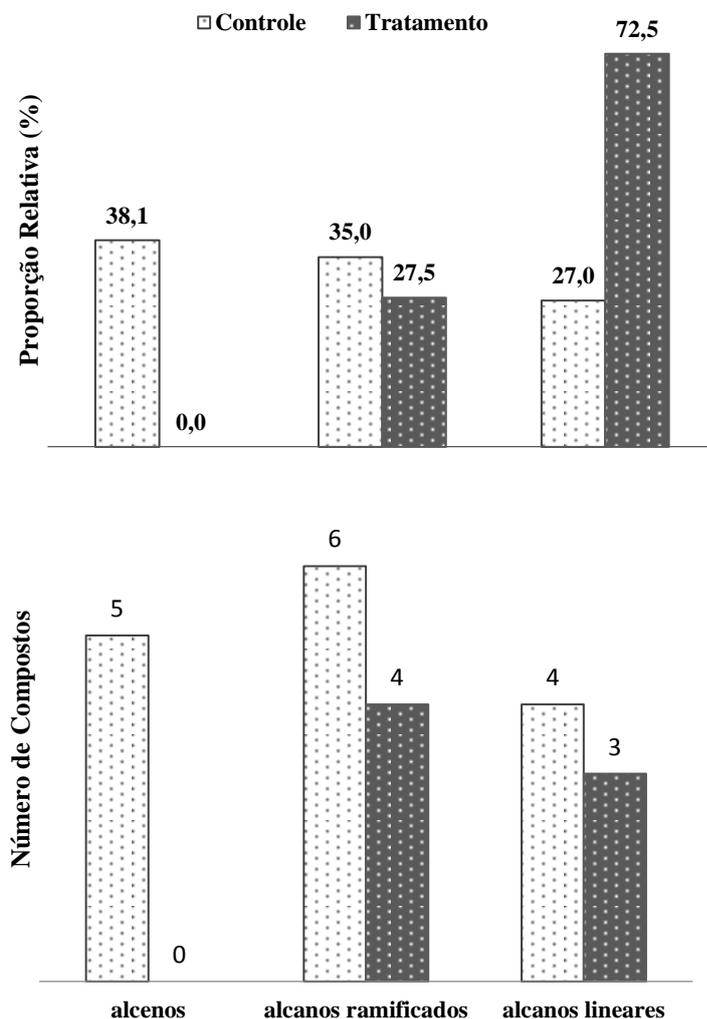
exclusivos, 6 alcenos e 3 alcanos ramificados. Nas amostras contaminadas ocorreram 2 compostos exclusivos da classe dos alcanos ramificados.

**Tabela 1.** Percentual de hidrocarbonetos cuticulares presentes em amostras controle e tratamento de adultos de *Euspilotus azureus* e os valores de p do teste T entre eles.

<i>Euspilotus azureus</i>				
Compostos	Índice de retenção	Controle	Tratamento	Test t
1-Heptadeceno•	1674	12,8±20,4	ND	N.S
Heptadecano•	1700	1,9±4,0	ND	N.S
5-Octadeceno•	1789	0,1±0,3	ND	N.S
9-Nonadeceno•	1875	20,3±35,9	ND	N.S
n-Heneicosano#	2500	19,8±30,7	50,4±7,8	N.S
Nonacosano#	2700	3,3±5,9	15,4±2,4	p< 0,05
2-Metiloctacosano#	2870	2,3±3,7	6,9±4,2	p< 0,05
Tetratetracontano#	2900	2,0±3,1	6,7±2,4	p< 0,05
2-Metiltriacontano#	3067	3,6±6,2	17,8±4,6	p< 0,05
15-Metiltritriacontano°	3097	ND	1,3±0,7	p< 0,05
2,6-;2,8-;2,10-diMetiltriacontano°	3270	ND	1,5±1,6	p< 0,05
9-Tritriacontene•	3322	4,7±5,6	ND	p< 0,05
11,21-diMetiltritriacontano•	3361	3,7±4,6	ND	p< 0,05
13,17-diMetiltetracontano•	3457	0,8±1,4	ND	p< 0,05
9-Pentatriaconteno•	3470	0,2±0,4	ND	N.S
11-13,15-Metilpentatriacontano•	3535	3,9±7,2	ND	N.S
11,21-; 13,23-diMetilpentatriacontano•	3555	20,7±29,3	ND	N.S

N.D= Não detectado; N.S= Não significativo. •Compostos exclusivos do controle; ° Compostos exclusivos do tratamento; #Compostos compartilhados entre controle e tratamento.

## *Euspilotus azureus*



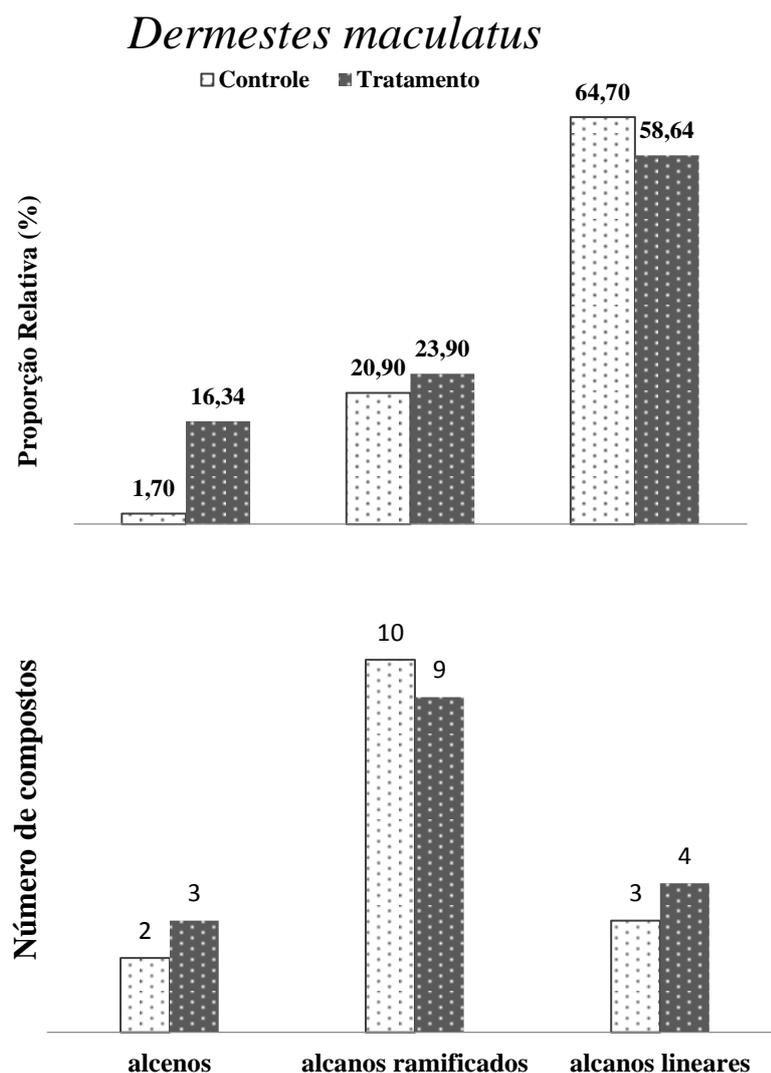
**Fig. 1.** Proporção relativa e número de compostos presentes na cutícula de adultos das espécies dos besouros *Euspilotus azureus* em amostras dos grupos controle e tratamento.

Nas amostras de *D. maculatus* foram identificados um total de 20 compostos, sendo que 15 foram identificados nas amostras controle e 18 no tratamento (Tabela 2). Estes compostos, tanto nas amostras controle, quanto nas contaminada variam do C<sub>24</sub> ao C<sub>33</sub>. Os compostos representaram, alcenos, alcanos ramificados e alcanos lineares (Fig. 2). Os dois grupos de amostras compartilharam 13 compostos (Tabela 2). As amostras do grupo controle apresentaram 2 compostos exclusivos, ambos alcanos ramificados, enquanto as amostras contaminadas apresentaram 5 exclusivos, 1 alceno linear, 1 alceno e 3 alcanos ramificados.

**Tabela 2.** Percentual de hidrocarbonetos cuticulares presentes em amostras de adultos de *Dermestes maculatus* e os valores de p do teste T entre eles.

<i>Dermestes maculatus</i>				
Compostos	Índice de retenção	Controle	Tratamento	Test t
2-Metiltetracosano <sup>o</sup>	2464	ND	1,93±2,1	p< 0,05
9-Pentacoseno#	2470	1,5±3,1	15,26±16,41	N.S
n-Heneicosano#	2500	24±19,5	24,62±11,23	p< 0,05
13-;11-;9-Metil-heneicosano•	2535	0,2±0,4	ND	N.S
1-Hexacoseno#	2594	0,2±0,4	0,44±0,56	p< 0,05
2-Metilhexacosano#	2665	0,4±1,1	2,8±3,85	N.S
9-Heptacoseno <sup>o</sup>	2670	ND	0,64±0,81	N.S
Nonacosano#	2700	22,6±14,4	21,17±12,98	p< 0,05
13-;11-;9-Metilnonacosano <sup>o</sup>	2735	ND	2,81±2,96	p< 0,05
11 + 13-Metilheptacosano•	2735	1,1±1,7	ND	p< 0,05
3-Metilheptacosano#	2766	0,2±0,3	0,24±0,26	N.S
Octacosano <sup>o</sup>	2800	ND	0,32±0,4	p< 0,05
2-Metiloctacosano#	2870	3,7±6,1	5,95±10,26	N.S
Tetratetracontano#	2900	18,1±10,6	12,54±9,43	p< 0,05
13-;11-;9-Metilnonacosano <sup>o</sup>	2935	ND	1,78±1,8	N.S
2-Metiltriacontano#	3067	2,5±6,3	4,04±8,36	N.S
2,6-;2,8-;2,10- diMetiltriacontano#	3097	7,7±10	1,65±2,41	p< 0,05
15-;13-;11-;9-Metil- hentriacontano#	3127	2,7±3,4	1,99±2,86	p< 0,05
9,12-diMetil-hentriacontano#	3163	1,9±4,7	0,32±0,39	N.S
15-Metiltritriacontano#	3326	0,5±0,8	0,4±0,51	N.S

N.D= Não detectado; N.S= Não significativo. •Compostos exclusivos do controle; <sup>o</sup> Compostos exclusivos do tratamento; #Compostos que ocorreram em controle e tratamento.



**Fig. 2.** Percentual e número de compostos presentes na cutícula de adultos da espécie de besouro *Dermestes maculatus* em amostras dos grupos controle e tratamento.

As análises estatísticas mostram que há diferenças significativas entre a composição química cuticular das amostras controle e tratamento das duas espécies dos compostos encontrados nos dois tipos de amostras de *E. azureus* 64,7 % deles apresentaram diferenças significativas de seus teores (Tabela 1). Nas amostras de *D. maculatus* 50 % dos compostos apresentaram diferenças significativas entre seus teores (Tabela 2)

## DISCUSSÃO

Os HCs identificados nos dois grupos de amostras das duas espécies variaram qualitativamente e quantitativamente. Isto demonstra que a cutícula dos insetos sofre alteração em sua composição, devido a presença do neonicotinoide, seja com o ganho ou perda de compostos, ou ainda em seus teores. Esta alteração no perfil de HCs pode influenciar diretamente no reconhecimento entre parceiros, interferindo na capacidade de reprodução e prejudicando a capacidade de impermeabilização da cutícula. De fato, sabe-se que os besouros utilizam, este recurso para reconhecimento e para atrair parceiros (Von Hoermann et al. 2011, Booksmythe et al. 2014, Fockink et al. 2015) e para evitar a dessecação (Blomquist e Bagnères 2010).

Foram identificados alcenos de cadeia carbônica longa nas amostras controle de *E. azureus* mas não nas amostras tratadas com tiametoxam. Alcenos com cadeias longas já foram descritos como feromônios sexuais para outros insetos (Uebel et al. 1975). O composto 9 Tritriacontene já foi encontrado na mosca do estábulo *Stomoxys calcitrans*, sendo descrito como um feromônio sexual (Uebel et al. 1975). A perda destes compostos que são importantes para comunicação entre fêmeas e machos, pode influenciar diretamente na capacidade de comunicação e conseqüentemente na reprodução (Martin et al. 2008).

Steiger et. al. (2007) aponta na espécie *Nicrophorus vespilloides*, um besouro também de importância forense que o histórico nutricional imediato é um fator relevante, pois influencia a composição química cuticular, o que demonstra a plasticidade destes compostos. A dieta pode alterar a superfície cuticular e isto pode impactar seu reconhecimento frente às companheiras de ninhos no caso de insetos sociais (Liang e Silverman 2000). Após aplicação do composto  $\beta$ -eudesmol em operárias da formiga *Atta sexdens rubropilosa*, Marinho et al. (2005) observaram que houve uma alteração na capacidade de reconhecimento intranidal, possivelmente causado por uma alteração dos perfis de HCs.

Esta alteração do perfil de HCs pode provocar um retardo no encontro de parceiros para acasalamento e um atraso na produção dos imaturos que também se alimentarão da carcaça. Além disso, o tempo de desenvolvimento de insetos de importância forense contaminados por inseticidas e entorpecentes, pode sofrer influências, seja retardando (Liu et al. 2009) ou acelerando seu ciclo de desenvolvimento (Altunsoy et al. 2014), conseqüentemente, a utilização destes besouros para estimar o

IPM, nestas condições pode estar equivocada. Neste sentido, saber se existe contaminação na carcaça também previne que estimativas errôneas sejam estabelecidas.

Nas amostras de *E. azureus* houve uma perda de compostos mais leves, sendo todos os alcenos e dois alcanos ramificados (Tabela 1). Possivelmente a volatilização destes compostos mais leves tenha ocorrido porque logo após ingerirem larvas contaminadas os indivíduos sofriam um comportamento aparente de paralização de seu corpo. Compostos mais leves provavelmente precisam de uma produção constante, pois são mais facilmente volatilizados e a aparente paralização pode ter interferido na produção do perfil de HCs pelo besouro. O fato de haver um padrão para essa alteração dos compostos cuticulares deve ser levado em conta, pois pode ser utilizado como uma alternativa para se detectar a toxina, pois muitas vezes não há tecidos disponíveis para se detecta-la, ou ainda muitas vezes a dose não é possível de ser detectada nos insetos.

Os alcanos lineares são uma classe de compostos responsável por criar uma barreira para prevenir a dessecação (Van Wilgenburg et al 2011) e provavelmente como uma barreira contra microrganismos patogênicos. Estas especificidades na função desta classe são provenientes de sua estrutura de cadeias simples e que são mais fortemente aderidas por maior força das ligações de van der Waals. Provavelmente, sob condição de stress, estes besouros deixam de investir em alcanos ramificados e alcenos, que são compostos importantes para comunicação e passam a investir na produção de alcanos lineares que poderiam dar suporte para minimizar as condições de stress (Dani et al. 2001 e Hefetz 2007).

Nas amostras de *D. maculatus* a porcentagem de alcanos lineares foi maior do que a das outras classes de compostos tanto nas amostras do controle como do tratamento. Como os alcanos lineares tem como função principal a impermeabilização da cutícula (Hefetz 2007, Chung e Carroll 2015), o fato de ocorrerem no final da decomposição em ambiente mais seco pode explicar porque há mais alcanos lineares.

O aumento dos alcenos pode estar relacionado à tentativa de sinalização entre indivíduos. Nesse sentido os machos podem sinalizar para fêmeas locais onde o recurso é mais abundante, atraindo assim, uma possível parceira para acasalamento. Além disso, adultos desta espécie podem ser encontrados em aglomerados sendo que estes compostos podem servir para comunicação entre estes indivíduos para evitar a incidência de luz, a exposição a predadores, e a localização de parceiros (Blomquist e Bagnères 2010). O

aumento destes compostos na cutícula, por outro lado, pode ser como no caso da outra espécie uma resposta fisiológica pela contaminação pelo tiametoxam.

Os resultados obtidos mostram que os HCs podem ser afetados pela contaminação pelo inseticida tiametoxam, havendo uma alteração qualitativa e quantitativa da composição química cuticular das amostras de besouros das duas espécies. Isto aponta para o uso de uma nova ferramenta para avaliar se a causa da morte pode ter sido por envenenamento ou, se ainda, se o cadáver estiver em área de cultura, se houve possível contaminação do cadáver, o que pode então afetar o ciclo de desenvolvimento de insetos e com isto dificultar a determinação do IPM usando este tipo de amostras.

## REFERÊNCIAS

**Aballay F.H, G. Arriagada, G.E. Flores e N.D. Centeno. 2012.** An illustrated key to and diagnoses of the species of Histeridae (Coleoptera) associated with decaying carcasses in Argentina. *ZooKeys* 261: 61–84.

**Almeida, L.M. e Mise, K.M. 2009.** Diagnosis and key of the main families and species of South American Coleoptera of forensic importance. *Rev. Bras. Entomol.*, 53(2), p. 227–244.

**Altunsoy, F., F.H. Akay e C. Önsoy. 2014.** Preliminary observations of the effects of lorazepam on the development of *Calliphora vicina* and *Calliphora loewi* (Diptera: Calliphoridae) and PMI estimation. *Anadolu University J. Sci. Technol –C Life Sciences and Biotechnology*, 3(2): 45–52.

**Bajerlein, D., S. Matuszewski e S. Konwerski. 2011.** Insect succession on carrion: seasonality, habitat preference and residency of histerid beetles (Coleoptera: Histeridae) visiting pig carrion exposed in various forests (Western Poland). *Polish J. Ecol* 59(4): 787–797.

**Benecke, M., E. Josephi, e R. Zweihoff. 2004.** Neglect of the elderly: forensic entomology cases and considerations. *Forensic Sci Int* 146: 195–199.

**Blomquist, G. e A.G. Bagnères. 2010.** Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

**Booksmythe, I., K. Fritzsche e G. Arnqvist. 2014.** Sperm competition generates evolution of increased paternal investment in a sex role-reversed seed beetle. *J. Evol. Biol.* 27: 2841–2849

- Borrór, D.J., D.M. Delong. 1988.** Introdução ao Estudo dos Insetos. São Paulo: Edgard Blücher.
- Buczkowski, G., R. Kumar, S.L. Suib, J. Silverman. 2005.** Diet-Related Modification of Cuticular Hydrocarbon Profiles of the Argentine Ant, *Linepithema humile*, Diminishes Intercolony Aggression. *J. Chem. Ecol.* 31(4): 829–843.
- Caneparo M.F.C., M.L. Fischer, e L.M. Almeida. 2017.** Effect of temperature on the life cycle of *Euspilotus azureus* (Coleoptera: Histeridae), a predator of forensic importance. *Fla. Entomol.* 100–4.
- Catts, E.P. e M.L. Goff. 1992.** Forensic entomology in criminal investigations. *Annu. Rev. Entomol.* 27: 253–272.
- Catts, E.P. e N. H. Haskell. 1991.** Entomology and Death: a procedural guide. Clemson, SC: Joyce's Print Shop.
- Chung, H., e S.B. Carroll. 2015.** Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *BioEssays.* 37: 822–830.
- Collins, C.A., G.L. Braga, e P.S. Bonato. 1997.** Introdução a Métodos Cromatográficos. 7ª ed. Campinas: Editora Unicamp.
- Cruz, A.S., E.C.M. Silva- Zacarin, O.C. Bueno e O. Malaspina. 2010.** Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell. Biol. Toxicol.* 26: 165–179.
- Dani, F.R., G.R. Jones, S. Destri, S.H. Spencer, e S. Turillazzi. 2001.** Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Anim. Behav.* 62: 165–171.
- Degallier, N., G. Arriagada, P. Kanaar, D.P. Moura, A.K. Tishechkin, M.S. Caterino e W.B. Warner. 2012.** Coleoptera Histeridae de Guyane. VII. Compléments au catalogue avec des données sur la faune du Surinam et une contribution à la connaissance des Saprininae. ACOREP-France: Coléoptères de Guyane. 33–52.
- Focknik, D.H., C.B.C Martins e P.H.G. Zarbin. 2015.** Identification and synthesis of the male produced volatiles of the carrion beetle, *Oxelytrum erythrurum* (Coleoptera: Silphidae). *Tetrahedron letters.* 56: 5353–5356.
- Friol P.S., A.F. Catae, D.A. Tavares, O. Malaspina e T.C. Roat. 2017.** Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? *Chemosphere* 185:56–66.

- Gay, F.J. 1938.** “A nutritional of study of larvae of *Dermestes vulpinus*”. J. Exp. Zool., 79: 93–107.
- Gennard, D.E. 2007.** Forensic entomology: an introduction. Lincoln: John Wiley e Sons, 248p.
- Goff, M.L. 1991.** Comparison of insect species associated with decomposing remains recovered inside dwellings and outdoors on the island of Oahu, Hawaii. J. Forensic Sci 36(3): 748–753.
- Hefetz, A., 2007.** The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) – interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. A review. Myrmecol. News. 10: 59–68.
- Howard, R.W., C.A. McDaniel, e C.J. Blomquist. 1978.** Cuticular hydrocarbons of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Chem. Ecol. 4: 233–245.
- Introna, F., C.P. Campobasso e M.L. Goff. 2001.** Entomotoxicology. Forensic Sci. Int. 120: 42–47.
- Kovarik, P.W., M.S. Caterino. 2001.** Histeridae. In: Arnett RH, Thomas MC. (eds.) American Beetles. Vol. 1: Archostemata
- Kulshrestha, P. e D.K. Satpathy. 2001.** “Use of beetles in forensic entomology”. Forensic Sci. Int., 120: 15–17.
- Liang, D. e J. Silverman. 2000.** ‘You are what you eat’: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. Naturwissenschaften, 87: 412–416.
- Liu, Y. Shi, H. Wang e R. Zhang. 2009.** Determination of Malathion levels and its effect on the development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) in South China. Forensic Sci. Int., 192: 14–18.
- Marinho, C.G.S., T.M.C. Della Lucia, R.N.C. Guedes, M.M.R. Ribeiro e E.R. Lima. 2005.**  $\beta$ -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. Entomol Exp Appl. 117: 89–93.
- Martin, S.J., H. Helantera, e F.P. Drijfhout. 2008.** Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in Formica ants. Biol. J. Linn. Soc. 95: 131–140.
- Mazur, S. 2011.** A concise catalogue of the Histeridae (Insecta: Coleoptera). Warsaw: WULS – SGGW Press. 332 pp.

- Mazur, S. 2011.** A concise catalogue of the Histeridae (Insecta: Coleoptera). Warsaw: WULS – SGGW Press. 332 pp.
- Mise, K.M., A.S.B. Souza, C.M. Campos, R.L.F. Keppler, e L.M. Almeida. 2010.** Coleoptera associated with pig carcass exposed in a forest reserve, Manaus, Amazonas, Brazil. *Biota Neotrop.* 10: 321–324.
- Mise, K.M., L.M. Almeida, M.O. Moura. 2007.** Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. *Rev. Bras. Entomol.* 51: 358–368.
- Moore, H.E.A., D. Craig, B. Adam, e F.P. Drijfhout. 2014.** Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Sci. Int.* 240: 48–53.
- Nondillo, A., O. Zanardi, A.P.S. Afonso, A.J. Benedetti, M. Botton. 2007.** Efeito de inseticidas neonicotinoides sobre a mosca-das-frutas sul-Americanas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na cultura da videira. *BioAssay.* 2:9.
- Oliveira-Costa, J. 2013.** Insetos “peritos”: entomologia Forense no Brasil. 1st ed. Ed. Millenium, Campinas, São Paulo.
- Otte, T.; Hilker, M.; Geiselhardt, S. 2018.** Phenotypic Plasticity of Cuticular Hydrocarbon Profiles in Insects. *J. Chem. Ecol.* 44: 235–247.
- Paula, M. C., W. F. Antonialli-Junior, A. Mendonça, K. B. Michelutti, A. D. Eulalio, C. A. L. Cardoso, T. Lima, and C. J. Von Zuben. 2017.** Chemotaxonomic Profile and Intraspecific Variation in the Blow Fly of Forensic Interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 54: 14–23.
- Payne, J.A. 1965.** A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology.* 46: 853–866.
- Pujol-Luz, J.R., L.C. Arantes e R. Constantino. 2008.** Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Rev. Bras. Entomol.* 52: 485-492.
- Riley, C.V. 1870.** “The larder-beetle. *American Entomology and Botany*”. 2, p. 246.
- Service, P.M., E.W. Hutchinson, M.D. Mackinley, e M.R. Rose. 1985.** Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.* 58: 380–389.
- Singer, T.L., K.E. Espelie e G.J. Gamboa, 1998.** Nest and nestmate discrimination in independent-founding paper wasps. In: *Pheromone Communication in Social Insects*

(R.K. Vander Meer, M.D. Breed, M.L. Winston and K.E. Espelie, Eds.) Westview Press, Oxford. 104–125.

**Steiger, S., K. Peschke, W. Francke e J.K. Müller. 2007.** The smell of parents: breeding status influences cuticular hydrocarbon pattern in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. Proc. R. Soc. B 274: 2211–2220.

**Tomizawa, M e J.E. Casida. 2003.** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. Annu Rev Entomol 48: 339–364.

**Uebel, E.C., R.E. Menzer, P.E. Sonnet e R.W. Miller. 1975.** Identification of the copulatory sex pheromone of the little house fly, *Fannia canicularis* (L.) (Diptera: Muscidae). Journal of the New York Entomological Society, Lawrence, 83(4): 258–259.

**Van Wilgenburg, W.E, A, Felden, D.H, Choe, R., Sulc J., Luo, K.J., Shea , M.A Elgar , N.D Tsutsui. 2011.** Learning and discrimination of cuticular hydrocarbons in a social insect. Biol. Lett. 8(1): 17–20.

**Von Hoermann C., J. Ruther, S. Reibe, B. Madea, e M. Ayasse. 2011.** The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle *Dermestes maculatus* (De Geer). Forensic Sci. Int. 212: 173–179.

**Ye, G.Y., K. Li, J.Y. Zhu, G.H. Zhu, e C. Hu. 2007.** Composition in Pupal Exuviae for Taxonomic Differentiation of Six Necrophagous Flies. J. Med. Entomol. 44: 450–456.

**Zanetti, N.I., A.A. Ferrero, N.D. Centeno. 2016.** Determination of fluoxetine in *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) by a spectrophotometric method. Science e Justice, 56(6): 464–467.

**Zhu, G.H., G.Y. Ye, C. Hu, X.H. Xu, e K. Li. 2006.** Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. Med. Vet. Entomol. 20: 438–444.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo responderam as perguntas iniciais, indicando que as análises químicas da cutícula do besouro *E. azureus* são ferramentas complementares úteis para ajudar a investigar o local onde o crime pode ter acontecido, ou mesmo casos de translocação de cadáveres na tentativa de ocultamento, uma vez que a composição varia significativamente em função sobretudo, de condições locais específicas. Além de que os HCs podem ser afetados pela contaminação pelo inseticida tiametoxam, havendo uma alteração qualitativa e quantitativa da composição química cuticular das amostras de *E. azureus* e *D. maculatus*. Isto aponta para o uso de uma nova ferramenta para avaliar se a causa da morte pode ter sido por envenenamento ou, se ainda, se o cadáver estiver em área de cultura, se houve possível contaminação do cadáver, o que pode então afetar o ciclo de desenvolvimento de insetos e com isto dificultar a determinação do IPM usando este tipo de amostras.