UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ANÁLISE QUALITATIVA DE COCAÍNA EM IMATUROS DE *HEMILUCILIA SEGMENTARIA* (FABRICIUS) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) CRIADOS EM TECIDOS DE COELHOS INTOXICADOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Bolsista: Ananda da Silva Antonio, FAPEAM

MANAUS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-E/0095/2012

ANÁLISE QUALITATIVA DE COCAÍNA EM IMATUROS DE *HEMILUCILIA SEGMENTARIA* (FABRICIUS) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) CRIADOS EM TECIDOS DE COELHOS INTOXICADOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Bolsista: Ananda da Silva Antonio, FAPEAM
Orientadora: Profª. Drª. Karime Rita de Souza Bentes

MANAUS
2013

Resumo

Este trabalho teve por objetivo aplicar a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) a analises dentro da área de entomotoxicologia, visando a detecção de cocaína presente em imaturos de *Chrysomya megacephala* criados em tecido inoculado com duas diferentes concentrações desta droga visando a utilização desta técnica em analises criminais relacionadas a cadáveres em avançado estagio de putefração. A metodologia de extração utilizada foi uma modificação das metodologias de CHASIN (1991) e CARVALHO (2012) sendo empregado a também o procedimento operacional padrão da Policia Federal para analise de cocaína por CCD. A técnica empregada mostrou-se efetiva para detecção de cocaína em imaturos de insetos necrófagos, mesmo sendo este um estudo pioneiro quanto sua aplicação na entomotoxicologia forense os resultados obtidos foram satisfatórios demonstrando inclusive que a técnica de CCD apresentou maior sensibilidade para detecção de cocaína em imaturos que a técnica atualmente empregada de imunohistoquímica, sendo possível realizar a detecção de baixas concentrações de cocaína, o que indica sua possível utilização em laudos periciais. Além disso também foi constatado que a presença de cocaína em tecido *post-mortem* apresenta grande influencia no desenvolvimento de imaturos, o que também pode ser utilizado como indicativo de casos envolvendo abuso de drogas.

Palavras-chave: entomotoxicologia, cromatografia em camada delgada, insetos necrófagos.

Sumário

INTRODUÇÃO 5
FUNDAMENTAÇÃO TEORICA 7
Cocaína 7
Situação atual da presença de cocaína no Brasil 8
Entomotoxicologia forense 9
Cromatografia em camada delgada 10
MATERIAS E MÉTODOS 12
Análises de peso, comprimento e largura 12
Análise toxicológica por CCD 13
RESULTADOS E DISCUSSÃO 14
Análises de peso, comprimento e largura 14
Análise toxicológica por CCD 16
CONCLUSÃO 19
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 20

INTRODUÇÃO

Segundo a United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) [1], foi observado um crescimento mundial no consumo de drogas de abuso na ultima década criando uma situação alarmante quanto à saúde pública, uma vez que o consumo desta geralmente leva o usuário ao vicio e em alguns casos a óbito. Ainda de acordo com a UNODC e com dados obtidos pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD) [2] a droga de abuso de maior consumo no Brasil é a cocaína, a qual foi consumida por aproximadamente 6 milhões de brasileiros no ultimo ano, garantindo ao Brasil a posição como o segundo maior país consumidor de cocaína. [3]

Com o aumento no consumo também foi observado um aumento nos casos de óbito relacionados ao consumo de cocaína entre brasileiros [1], que em determinadas ocasiões ocorrem na ausência de testemunhas ou em situações na qual estas não possibilitam que o corpo do usuário seja encontrado por estarem ligadas ao óbito direta ou indiretamente [4]. Nestes casos o cadáver pode permanecer oculto por longos períodos de tempo impossibilitando a determinação da causa da morte devido a degradação das amostras biológicas tais como, tecido, urina e sangue [5], tornando assim impossível afirmar se a morte estava relacionada com o consumo de alguma droga de abuso e/ou toxina, se ocorrerá de maneira natural ou se foi ocasionada por uma agressão.

Devido isto, novas técnicas para a determinação da causa *mortis* em cadáveres em estagio de putrefação avançado passaram a ser desenvolvidas, e neste contexto, a entomotoxicologia forense ganhou bastante destaque, uma vez que utiliza insetos necrófagos para determinar a causa *mortis*, baseando-se no fato de que as larvas criadas sobre o tecido do cadáver associam a seu metabolismo e composição todas as substancias presentes do tecido, além de que estes são um analito abundante nas ocasiões de ocultamento de cadáver.[4,6]

Para determinar a composição destes insetos podem ser utilizadas técnicas como a imunohistoquimica e a cromatografia em suas diversas variações, entretanto vale ressaltar que estes insetos também sofrem influencias metabólicas pela ingestão de drogas de abuso ocasionando uma alteração no seu desenvolvimento impossibilitando a determinação do intervalo *pos-mortem* (IPM) que é outro fator importante em casos judiciais que determina a hora da morte.[4,6]

Neste contexto este trabalho teve por objetivo realizar uma determinação qualitativa de cocaína presente em larvas da espécie *Chrysomya megacephala* criadas em tecido animal inoculado com cocaína através da técnica de cromatografia em camada delgada e determinar a influencia da presença de cocaína no desenvolvimento destas larvas.

FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

Cocaína

A cocaína ou benzoilmetilecgonina pertence a classe dos alcaloides, apresentando a estrutura evidenciada na Figura 1, sendo encontrada principalmente nas plantas do gênero *Erythroxylum* na qual esta representa aproximadamente 80% da composição total de alcaloides, dependendo da espécie.

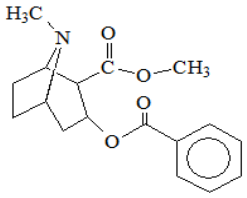


Figura 1. Estrutura molecular da cocaína

Este alcaloide apresenta como principal característica biológica sua atividade como anestésico local e estimulante do sistema nervoso central. Estas propriedades se devem a presença de um grupo lipofílico e um grupo hidrofílico na estrutura da cocaína que permitem sua interação com as células de organismos vivos.

Enquanto o grupo lipofílico, constituído de um anel benzênico, interage com as membranas celulares fixando a cocaína no exterior das células, o grupo hidrofílico, constituído de uma amina terciaria, interage com os canais de sódio e potássio impossibilitando a geração e condução de impulsos nervosos, conferindo a propriedade de anestésico local. Além de interagir com os canais de sódio e potássio a cocaína também interfere na recaptação da dopamina ocasionando a maior produção de adrenalina, classificando a cocaína como um estimulante do sistema nervoso central. Além disso, após ingerida a cocaína pode interagir com outras proteínas, associando-se temporariamente a uma serie de tecidos.

A basicidade intrínseca (K_b = $2{,}6 \times 10^{-6}$, à 25ºC) da cocaína é uma característica de grande relevância uma vez que esta é utilizada para realizar sua extração e purificação. Na presença de água e bases ou ácidos fortes, a cocaína pode sofrer hidrolise parcial ou total sendo transformada em outros alcaloides conforme mostra a Figura 2 [2]. Este processo é a principal reação de degradação da cocaína [1].

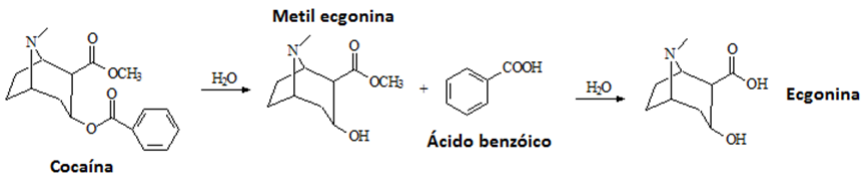


Figura 2. Hidrolise da cocaína

Esta droga de abuso também pode sofrer degradação por outros processos após ser ingerida, sendo que estes dependentes da forma de ingestão, conforme mostra a Figura 3, na qual destaca-se como os principais metabólicos formados a benzoilecgonina e o éster metil ecgonina.

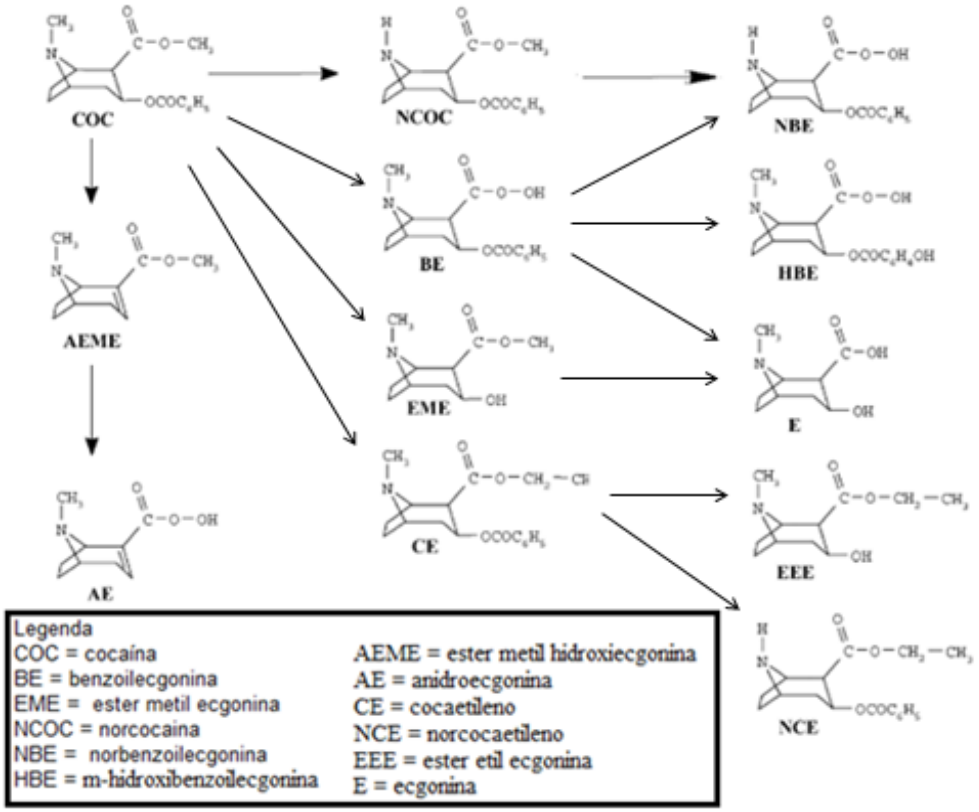


Figura 3. Metabólicos da cocaína no corpo humano

Situação atual da presença de cocaína no Brasil

De acordo com os dados disponibilizados pela SENAD, nos últimos 12 anos houve um grande aumento na comercialização e consumo de cocaína, fato evidenciado pelo grande aumento na quantidade de cocaína apreendida, conforme apresentando na Tabela 1. Vale ressaltar também que a cocaína é droga de maior consumo no Brasil, o qual realiza fronteira com os três países considerados os maiores produtores mundiais de cocaína, a Colômbia, o Peru e a Bolívia.

Tabela 1. Apreensões de cocaína (kg) estado do Amazonas entre os anos de 2001 e 2007

Apreensões de cloridrato de cocaína (kg) entre os anos de 2001 e 2007								
Estado	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Total
Amazonas	347,7	334,8	216,2	731,3	1951,3	2221,7	2.455,3	8.258,3
Apreensões de pasta base de cocaína (kg) entre os anos de 2001 e 2007								
Estado	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Total
Amazonas	16,2	68,4	158,9	62,5	53,8	23,6	240,5	650,9

Dados mais recentes fornecidos pela Policia Civil do Amazonas mostram também que entre janeiro e setembro de 2011 foram apreendidos cerca de 117.903,4 kg de cocaína. Como o Amazonas é um dos primeiros estados por onde a cocaína produzida em outros países é transportada e/ou vendida, este se apresenta como o estado como maior índice de apreensão no Brasil.

Segundo dados do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD), em 2012 aproximadamente 6 milhões de brasileiros assumiram já ter consumido em algum momento cocaína. Além disso, segundo dados da UNODC, a cocaína compreende a droga mais letal no Brasil apresentando uma taxa de óbito relacionado ao seu consumo entre 12,2 e 31,1 mortes por milhão de pessoa no país.

Entomotoxicologia forense

Com o aumento de casos em que o cadáver permanece oculto houve um grande desenvolvimento das pesquisas relacionadas a entomologia forense, que consiste de uma área de pesquisa destinada ao estudo de insetos e outros tipos de artrópodes necrófagos para obter informações necessárias para o andamento de investigações judiciais, como por exemplo, a causa *mortis* e o intervalo *post-mortem* em casos relacionados ao óbito de determinado individuo no qual tenha ocorrido degradação de todo o tecido, sangue e outras amostras biológicas que são comumente utilizadas para determinação destes parâmetros.

Dentro da entomologia forense existe uma subárea denominada entomotoxicologia forense que se destina a utilização de insetos necrófagos para realizar detecção de drogas de abuso e toxinas que estivessem presentes no tecido do cadáver no momento do óbito e que possam ter ocasionado a morte do individuo.

Os insetos usados comumente como amostras para testes entomotoxicológicos são moscas pertencentes às famílias Calliphoridae e Sarcophagidae com destaca para as espécies *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *Hemilucilia segmentaria*, *Lucilia eximia* e *Paralucilia paraensis*.

Vale ressaltar que a entomotoxicologia forense utilizada insetos baseando-se no fato de que quando um inseto alcança um cadáver este deposita seus ovos, iniciando um novo ciclo de reprodução. Quando estes ovos se desenvolvem para larvas estas consomem o tecido no qual foram depositadas para se desenvolverem associando assim todas as substancias presentes neste tecido para seu metabolismo e composição, sendo esta a única forma de ingestão de substancias incomuns a composição do inseto.

Em estudos anteriores envolvendo a determinação de drogas de abusos em larvas de moscas necrófagas foi observado também que a associação destas substancias ao metabolismo da larva altera seu desenvolvimento, o que pode influenciar a estimativa do IPM do cadáver, sendo assim necessário também realizar um estudo a cerca do crescimento de larvas expostas a drogas de abuso para que possa ser determinado o IPM em casos de morte relacionadas ao consumo de drogas.

Cromatografia em camada delgada

A cromatografia consiste de uma técnica físico-química de separação de componentes em uma matriz composto, na qual o processo de separação se deve a interação diferencial que cada componente da matriz apresenta quando submetida ao contato intimo com duas fases imiscíveis entre si.

Dentre as diversas variações da cromatografia atualmente utilizadas a que apresenta menor custo por analise e facilidade de execução/implementação é a cromatografia em camada delgada, na qual se utiliza um suporte sólido no qual a fase estacionaria é depositada e um eluente como fase móvel. O processo de separação ocorre após ser injetada uma alíquota da amostra no suporte contendo a fase estacionaria e este ser parcialmente imerso na fase móvel de modo a permitir que esta percorra a fase estacionaria por capilaridade. Dependendo da afinidade de cada composto pela fase móvel ou estacionaria estes irão percorrer diferentes distancias nas placas cromatográficas.

Devido a variedade de fases moveis e estacionarias que podem ser utilizadas as técnicas cromatográficas podem ser empregada em diversos tipos de estudos de forma a possibilitar a realização de analises qualitativas e quantitativas de diversas

matrizes. Em geral a cromatografia em camada delgada é utilizada principalmente para analises qualitativas premiliminares nas quais são utilizados tipos específicos de reveladores para evidenciar a presença de uma dada substancia que foi separada na placa.

MATERIAS E MÉTODOS

Durante a realização do projeto não foi possível estabelecer culturas correspondentes a larvas da espécie *Hemilucilia segmentaria*, que havia sido proposta inicialmente, o que levou a utilização da espécie *Chrysomya megacephala*, pertencente a mesma família de dípteros.

Inicialmente as larvas de *Chrysomya megacephala* foram cultivadas em 18 criações diferentes cujos substratos de alimentação correspondia ao tecido de diferentes coelhos que haviam sido inoculados com três concentrações diferentes de cocaína.

A partir dos três grupos formados foram criadas 6 colônias de imaturos para cada concentração de cocaína em estudo, que foram:

- Grupo DL_{50} - 50% da dose letal em humanos (111,15 mg/kg).
- Grupo DL_{100} – 100% da dose letal em humanos (222,3 mg/kg).
- Grupo Controle – o tecido não foi submetido a cocaína.

Vale resaltar que o cultivo das larvas, coleta e fornecimento das amostras de tecido e de imaturos foi realizado pelo grupo de pesquisa do INPA sob a responsabilidade do pesquisador doutor José Albertino Rafael e consenso do Comitê de Ética em Pesquisa com o Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (CEUA-INPA protocolo nº011/2012).

Após estabelecidas as colônias de imaturos, estes foram periodicamente coletados para realizar analise de peso, comprimento, largura e presença de cocaína através da técnica de cromatografia em camada delgada.

Análises de peso, comprimento e largura

Após o estabelecimento de colônias de *Chrysomya megacephala* e eclosão dos ovos destas como larvas, foram coletadas 10 larvas de cada grupo em intervalos de 12 horas até que se completassem 96 horas após eclosão. Assim que eram retiradas as larvas foram imediatamente pesadas individualmente em balança de precisão, sendo em seguida fixadas em KAAD (querosene, álcool etílico P.A, ácido acético glacial e dioxina) por 24 horas para então serem transferidas para recipientes com álcool 80% para posterior mensuração do comprimento e largura com auxilio de uma lupa graduada.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o teste ANOVA de analise de variância com dois fatores.

Análise toxicológica por CCD

Este procedimento foi utilizado para realizar a análise das larvas cultivadas e dos tecidos utilizados no cultivo, sendo utilizadas 30 larvas cultivadas em cada um dos três grupos indicados anteriormente e uma amostra de tecido de cada cultura.

As larvas foram coletadas ao atingir o terceiro estádio de desenvolvimento, sendo então retiradas dos seus respectivos substratos de alimentação, lavadas e conservadas em formol até o momento da extração e análise. As amostras de tecidos foram coletadas antes de se iniciar a exposição destes aos insetos de forma a gerar uma amostra composta contendo tecidos do rim, fígado, cérebro e pulmão de cada coelho utilizado para as culturas.

Ambas as amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração exibido na Figura 4, que consiste de uma adaptação dos métodos de extração de CARVALHO (2012) e CHASIN (1991).

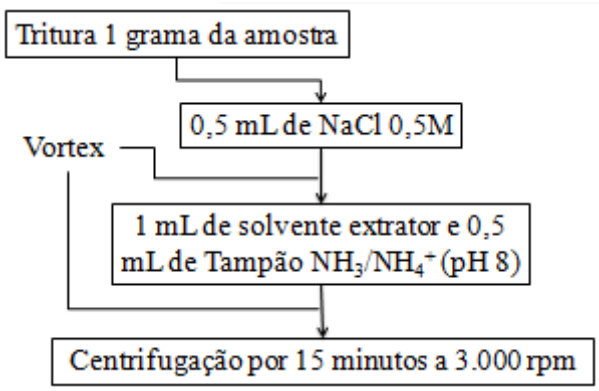


Figura 4. Método de extração empregado

Os extratos obtidos por este método foram então submetidos a análise por cromatografia em camada delgada utilizando uma placa cromatográfica de Sílica e o sistema de solvente clorofórmio-metanol (1:1), com revelador de iodo platinado fortemente ácido, conforme descrito por CHASIN (1998) e CLARKE (2011) para analise de cocaína em tecido inoculado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por ser um estudo pioneiro na área tanto quanto a espécie estudada de mosca necrófaga quanto a técnica empregada para esta finalidade, não foram encontrados na literatura muitos dados específicos que explicassem alguns efeitos indesejados durante a execução do projeto, entretanto a partir de conhecimento mais geral pode-se fazer determinadas ponderações a cerca do método empregado.

Foi observado que tanto a adição de NaCl quanto a manutenção do pH da solução apresentaram grande influência. Quanto a adição de sal foi visto a aplicação do efeito salting out, tendo em vista que a cocaína é solúvel tanto em água como em clorofórmio este efeito demonstrou-se necessário para uma extração simplificada porem eficiente. Entretanto a adição de grandes quantidades também acarretou a formação de emulsões.

A manutenção do pH também mostrou-se fundamental uma vez que em pH ácido a cocaína sofre degradação por hidrolise ácida o que acarretaria a perda do analito de cocaína para ecgonina, a qual apresenta um resultado diferente em frente ao sistema cromatográfico utilizado.

Análises de peso, comprimento e largura

A análise de peso, comprimento e largura nos intervalos de 12 horas ate conclusão das 96 horas demonstrou ocorrer uma variação significativa de peso e comprimento das larvas, evidenciada pela realização do teste estatístico ANOVA, que demonstra a influencia que a cocaína apresenta no metabolismo destes dípteros. Os dados médios de peso, comprimento e largura de cada grupo de analise são evidenciados na Tabela 2.

Tabela 2. Média das medidas de peso, comprimento e largura das 6 criações de cada grupo de estudo.

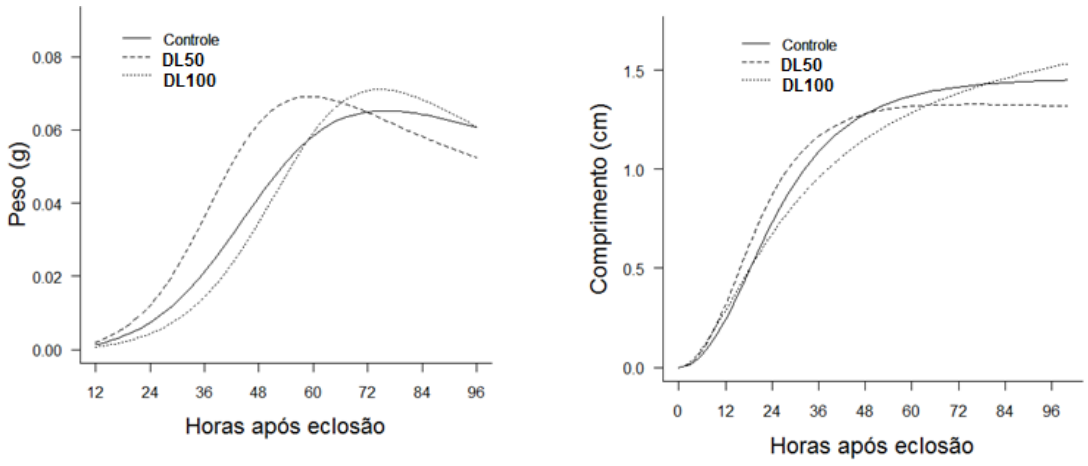
	Grupo										
	Controle				DL100				DL50		
Tempo (hora)	M. peso (g)	M.comp. (cm)	M.lar. (cm)		M. peso (g)	M.comp. (cm)	M.lar. (cm)		M. peso (g)	M.comp. (cm)	M.lar. (cm)
12	0,000805	0,3775	0,074625		0,0007	0,362375	0,0663335		0,00196	0,4374445	0,083111
24	0,00635	0,701	0,149		0,003625	0,676722	0,125		0,01126	0,7735	0,167
36	0,0146035	0,926875	0,1958335		0,0117915	0,809	0,172		0,024875	1,12361	0,2455555
48	0,0598	1,472	0,299		0,03729	1,3025	0,266889		0,067235	1,4035	0,2985
60	0,056315	1,454	0,316		0,078744	1,4194445	0,2895		0,066465	1,363	0,3075
72	0,071535	1,4545	0,3245		0,07127	1,483	0,2985		0,06936	1,334	0,302
84	0,069995	1,411	0,3285		0,0684	1,424	0,303		0,063885	1,3025	0,2805
96	0,063535	1,422	0,322		0,06717	1,4055	0,296722		0,05348	1,2395	0,291

Legenda: Comp. = comprimento; Lar. = largura

O peso dos dípteros pertencentes ao grupo DL_{50} apresentou uma variação positiva durante grande parte das 96 horas de análise, conforme consta na Figura 5.A, enquanto que as larvas pertences ao grupo DL_{100} apresentaram uma variação negativa de peso em relação ao grupo controle, o que nos leva a constatar que até determinada concentração de cocaína no substrato de alimentação dos imaturos esta droga possa atuar ainda como um estimulante, tornando a atividade biológica destes mais acelerada. A variação negativa de peso no grupo DL_{100} pode ser um indicativo da saturação das larvas com cocaína a ponto desta atuar como um veneno ao seu desenvolvimento.

O comprimento das larvas em estudou apresentou menor variação que o peso das mesmas, sendo que a maior variação ocorreu entre o grupo controle e o grupo DL_{50} a partir de 24 horas passada a eclosão, conforme consta na Figura 5.B. O modo como a concentração de cocaína influencia no desenvolvimento destes dípteros ainda não foi elucidado mas é visível além da bioacumulação desta droga a sua atuação como estimulante ou toxica em função da quantidade ingerida.

De acordo com o teste ANOVA as medidas de largura entre os grupos de estudo não apresentou variância significativa, entretanto, deve se ressaltar que houveram grandes dificuldades em realizar esta medida devido ao equipamento utilizado, o que pode ter acarretado erros a mesma que impediram a interpretação precisa dos dados reais.



A B

Figura 5. Variação de peso e comprimento das larvas entre os 3 grupos de estudos.

Análise toxicológica por CCD

A análise toxicológica por CCD das amostras de tecido correspondentes a cada um dos substratos utilizados para o estabelecimento das colônias apresentou resultado positivo tanto para as amostras do grupo DL_{50} quanto o grupo DL_{100} onde foi observado que o valor de R_f(%) nas placas cromatográficas correspondentes ao padrão de cloridrato de cocaína e as amostras apresentaram-se iguais variando entre R_f(%) 57,7 e 68,8. Além dos valores similares de R_f(%) também foi observado a coloração das manchas do padrão e dos extratos de tecido, as quais corresponderam a coloração especificada pelo procedimento operacional padrão utilizado pela Policia Federal, que corresponde a uma coloração vermelho-escuro/bordô para confirmação de cocaína no sistema de solvente e revelador utilizado.

Para as amostras de larva e tecido correspondente ao grupo controle não foi observado resultado positivo para presença de cocaína nos sistema cromatográfico.

As amostras de larvas correspondentes ao grupo DL_{50} e DL_{100} apresentaram colorações similares a cor que o padrão demonstrou em todas as analises, sendo os resultados de R_f(%) apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de R_f(%) para analise toxicológica por CCD das larvas expostas a cocaína.

Valores de R*f*												
	DL_{100}						DL_{50}					
Nº das amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Padrão (%)	60	64,4	60	62,2	57,7	68,8	60	62,2	64,4	64,4	64,4	60
Larva (%)	60	62,2	60	62,2	57,7	68,8	53,3	53,3	51,1	51,1	48,9	48,9

As larvas pertencentes ao grupo DL_{100}, o qual recebeu 100% da dosagem letal apresentou resultados sem grandes variações em relação ao padrão utilizado demonstrando a eficiência da técnica quando se trata de grandes concentrações. Entretanto a variação entre os resultados do padrão e do grupo DL_{50} apresentaram discrepâncias significativas mas ainda pode-se afirmar a efetividade da técnica, apesar da mesma ter sido empregada pela primeira vez com a finalidade de servir a área de

entomotoxicologia forense, segundo dados divulgados pela UNODC em apostila destinada à analise pericia de drogas de abuso, a interpretação de analises de cocaína em material biológico pela técnica de CCD deve ser feita considerando tanto a coloração quanto os valores de R_f(%) devido a grande dificuldade em se reproduzir os resultados obtidos com os padrões de drogas de abuso utilizando amostras biológicas reais.

Sendo assim, podemos afirmar que a técnica de CCD também foi efetiva para determinação de concentrações até metade da dosagem letal. Como alternativa para melhorar os resultados obtidos poderia se optar por uma otimização do método de extração utilizado, o qual se sabe que por ser simplificado, pode ter ocorrido a extração de outros compostos orgânicos como proteínas juntamente a cocaína, sendo que quando esta droga de abuso entra em sistemas biológicos esta se associa a uma serie de proteínas, que quando não separadas adequadamente poderiam ter diminuído sua polaridade tornando os valores de R_f(%) menores que o esperado. Especula-se que conforme a concentração de cocaína diminui este efeito pode se tornar mais visível.

Nas Figuras 6 e 7 podem ser observados os resultados das análises por CCD dos grupos controle, DL_{50} e DL_{100}, respectivamente.

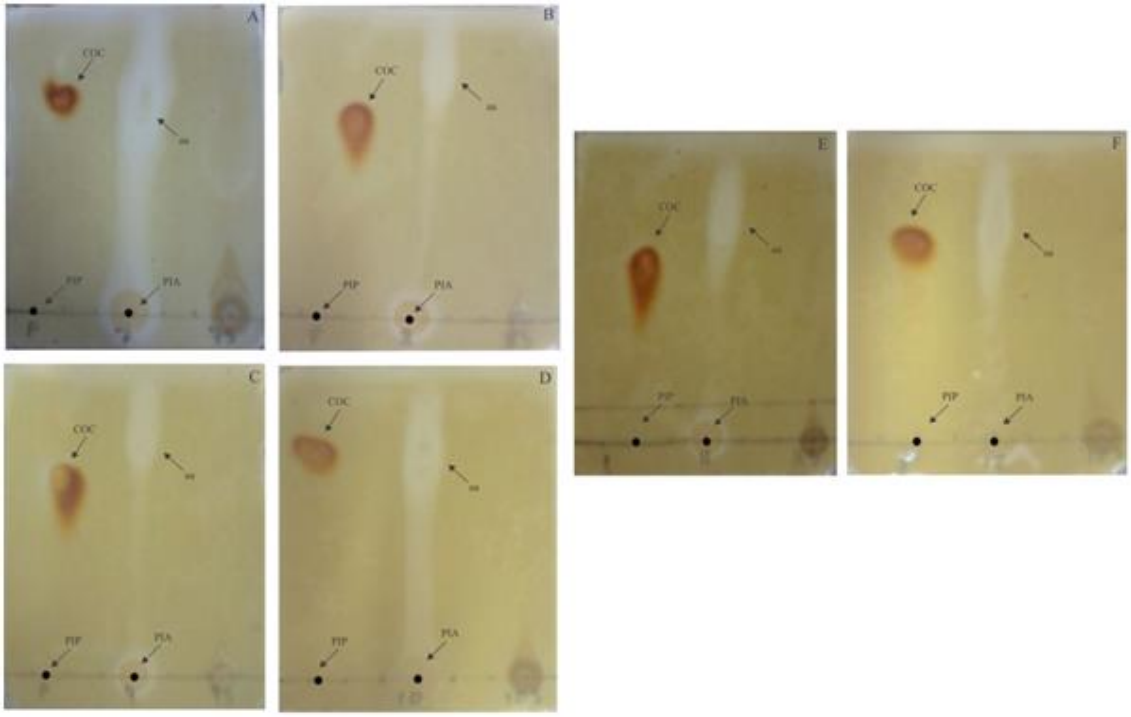
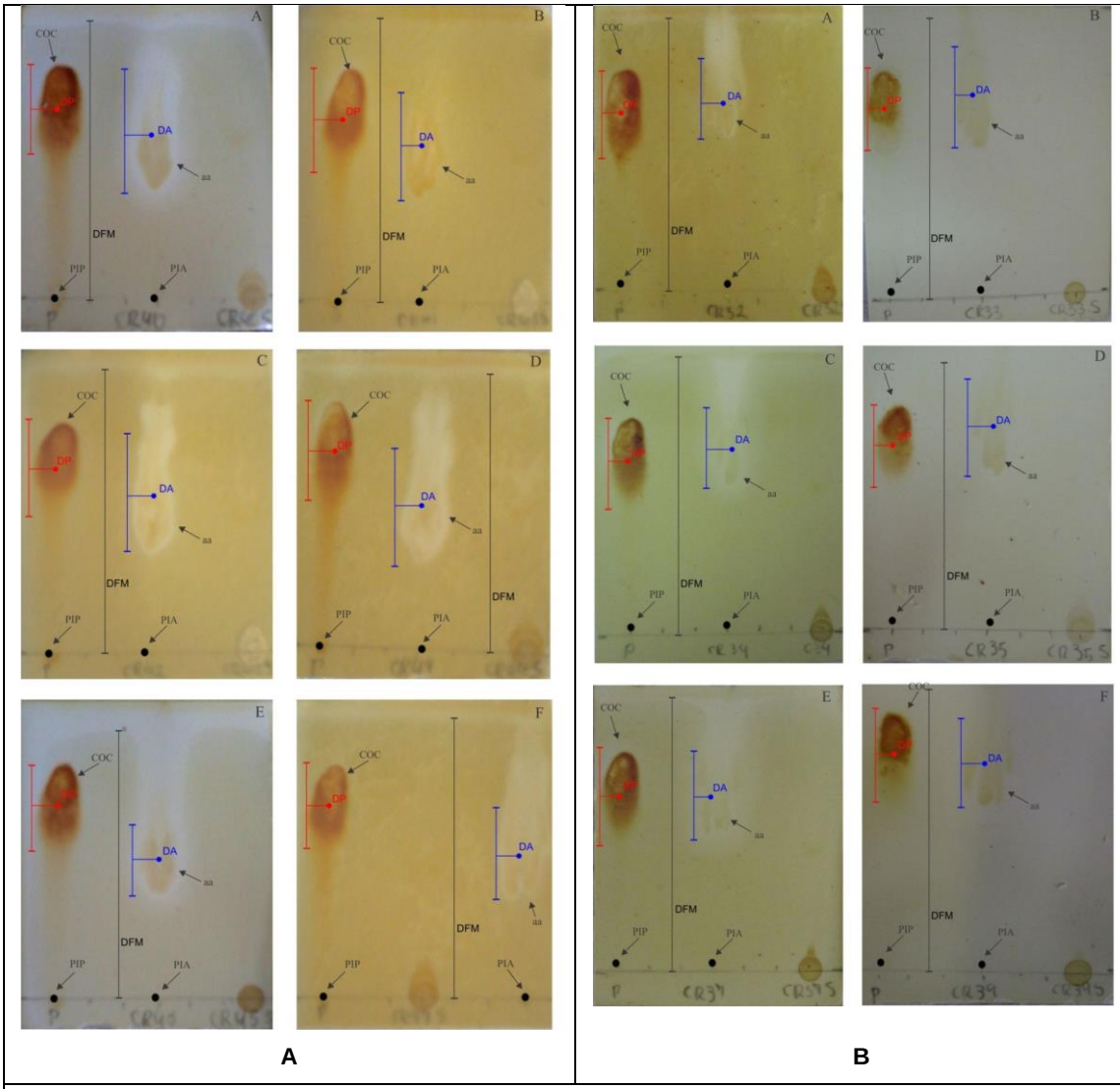


Figura 6. Resultados negativos para cocaína em placas de cromatografia de camada delgada de larvas do grupo controle. COC = amostra padrão de cocaína; aa = amostra analisada de

larvas; PIP = ponto de inserção da amostra do padrão; PIA = ponto de inserção da amostra de larvas.



A B

Figura 7. Resultados positivos para cocaína em placas de cromatografia de camada delgada de larvas do (A) grupo DL_{50}/ (B) grupo DL_{100}. COC = amostra padrão de cocaína; DP = distância do ponto da amostra padrão; aa = amostra analisada de larvas; DA = distância da amostra; DFM = distância percorrida pela fase móvel; PIP = ponto de inserção da amostra do padrão; PIA = ponto de inserção da amostra de larvas.

CONCLUSÃO

Apesar de ter sido utilizada uma técnica de extração liquida simplificada está mostrou-se eficiente para a extração de cocaína a partir de material biológico correspondente tanto a tecido *post-mortem* quanto à imaturos de larvas de insetos necrófagos, sendo possível afirmar que a metodologia utilizada poderia ser extrapolada para utilização com outras espécies necrófagas típicas da Amazônia. Vale ressaltar que há necessidade de melhorias no método de extração para que a analise de cocaína torne-se mais eficiente.

A técnica de CCD mostrou eficiente para a detecção qualitativa de cocaína em imaturos da espécie *Chrysomya megacephala* mesmo sendo este o primeiro trabalho a efetuar analise entomotoxicologica por meio desta, a cromatografia em camada delgada apresentou resultados satisfatórios tanto em alta como em baixa concentração, sendo que, atualmente a técnica de imunohistoquímica que geralmente é utilizada para estas analises, não foi capaz de detectar as concentrações de cocaína utilizadas no grupo DL_{50} o que ressalta a efetividade da CCD como técnica entomotoxicologica passível de ser aplicada em grande partes dos laboratórios de analise por não exigir equipamentos sofisticados e apresentar um baixo custo de analise associado.

Também foi observado que a cocaína apresentou grande influência no desenvolvimento dos imaturos em ambas as concentrações atuando de maneira diferenciada em cada concentração a qual ainda não pode ser explicada definitivamente. Entretanto devido as discrepâncias no desenvolvimento que ocorreu entre as larvas expostas a cocaína e as do grupo controle foi observado ser possível pré-determinar se ocorreu ingestão de cocaína a partir da variação de peso e comprimento das larvas estudadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Crime, United Nations Office on Drugs and.** *World Drug Report.* 2012.

2. **Junior, Ronaldo Carneiro da Silva.** *Observatorio Brasileiro de Informações sobre Drogas.* [Online] SENAD, 2007. www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/index.php.

3. **INPAD.** http://inpad.org.br/lenad/cocaina-e-crack/resultados-preliminares/. *Instituto Nacional de Políticas Públicas do Álcool e Drogas.* [Online] 2013.

4. **Carvalho, Lucila Maria de Lopes de, Linhares, Arício Xavier e Palhares, Fortunato Antonio Badan.** The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of Chrysomya albiceps and Chrysomya putoria (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic Science International.* 220, 2012.

5. **Chasin, Alice A. A. M. e Mídio, A. F.** Revisão de metodos analíticos para a identificação e quantificação de cocaína em material biológico. *Brazilian Jorunal of Toxicology.* 1991, Vol. 4.

6. **Fukushima, André Rinaldi.** *Perfil da cocaína comercializada como crack na região metropolitana de São Paulo em período de vinte meses (2008-2009).* Faculdade de ciências farmaceuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo : s.n., 2010.

7. **Almeida, Fernanda Lintomen Azevêdo de.** *ANÁLISE COMPARATIVA DE AMOSTRAS DE COCAÍNA APREENDIDAS.* Instituto de Química, Universidade de Brasilia. Brasilia : s.n., 2003.

8. **Liu, Xiaoshan, et al.** Determination of Malathion levels and its effect on the development of Chrysomya megacephala (Fabricius) in South China. *Forensic Science International.* 2009, Vol. 192.

9. **Oliveira-Costa, J**.. Entomologia Forense e suas Aplicações. In: Oliveira-Costa, J. (Ed.). *Entomologia Forense, Quando os insetos são vestígios*. Campinas, São Paulo, p. 1-15. 2011

10. **Catts, E.P.; Goff, M.L**. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 37: 253-72. 1992.