

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

ELIZABETE DA SILVA VIEIRA

**ENTOMOLOGIA FORENSE E PRÁTICAS APLICADAS A  
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE INSETOS EM INVESTIGAÇÕES  
CRIMINAIS - UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

LONDRINA

2019

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

ELIZABETE DA SILVA VIEIRA

**ENTOMOLOGIA FORENSE E PRÁTICAS APLICADAS A  
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE INSETOS EM INVESTIGAÇÕES  
CRIMINAIS - UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade  
Revisão Bibliográfica, apresentado ao curso  
Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino  
Médio do Instituto Federal do Paraná.

LONDRINA

2019

# FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIZABETE DA SILVA VIEIRA

## ENTOMOLOGIA FORENSE E PRÁTICAS APLICADAS A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE INSETOS EM INVESTIGAÇÕES CRIMINAIS - UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade Revisão Bibliográfica, apresentado ao Curso Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio do Instituto Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Técnico em Biotecnologia.

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof(a). Orientador(a)

\_\_\_\_\_

Prof(a). Componente de Banca 1

\_\_\_\_\_

Prof(a). Componente de Banca 2

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Instituto Federal do Paraná (IFPR) - Campus Londrina e ao corpo docente pela oportunidade de realizar diversos trabalhos como este, que contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

A minha orientadora Luciana Fernandes de Oliveira e meu coorientador Daniel Meneguello Limeira pela orientação, paciência, apoio, incentivos, confiança e principalmente pela oportunidade de orientação.

A minha família, pelo apoio psicológico, sustento, incentivo, paciência e por ter me proporcionado o ingresso ao (IFPR).

Ao meu pai que infelizmente não está mais entre nós, porém é o responsável pelo incentivo à minha formação acadêmica e profissional, pelos valores que me foram ensinados e pela disciplina.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo do curso, pelos trabalhos e pela amizade, as vivências e experiências.

Agradeço a todo que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho.

*“Devemos sempre supor uma igualdade exata entre os elementos do corpo examinado e aqueles dos produtos de sua análise”.*

*(Lavoisier, 1790)*



## **RESUMO**

O tema Entomologia Forense e práticas aplicadas a identificação molecular de insetos em investigações criminais, é uma revisão bibliográfica que visa a abordagem das contribuições da entomologia, como na identificação e análise da entomofauna em locais de morte, insetos associados à cadáveres, e na extração do DNA a partir de técnicas tradicionais e promissoras. A Entomologia Forense é o estudo de insetos e outros artrópodes, através de suas interações com os seres humanos. Estes insetos podem estar associados a questões jurídicas, na área urbana, na deterioração de construções, móveis e produtos estocados, ou associados a investigações criminais, auxiliando na identificação de vítimas de morte violenta. O emprego de técnicas moleculares facilitam a identificação de espécies, bem como suas relações filogenéticas entre sua população, família, classe, ordem e etc. O objetivo desta revisão bibliográfica é demonstrar as relações, a importância e a aplicação da entomologia forense em diferentes áreas, além de descrever a composição da fauna e determinar os fatores bióticos e abióticos na inter-relação entre seres vivos e ecossistemas. Neste contexto, o trabalho visa apresentar métodos moleculares para a aplicação na entomologia forense e determinação das causas e tempo de morte, como na determinação do Intervalo pós-morte (IPM).

**Palavras-chave:** Entomologia Forense. Insetos. DNA. Investigações criminais. Intervalo pós-morte.

## ABSTRACT

*The theme forensic entomology and practices applied to molecular identification of insects in criminal investigations, is a bibliographic review that aims to address the contributions of entomology, such as the identification and analysis of entomofauna in places of death, insects associated with corpses and DNA extraction from traditional and promising techniques. Forensic Entomology is the study of insects and other arthropods through their interactions with human beings. These insects may be associated with legal issues in the area of deterioration of buildings, furniture and stocked products, or associated with criminal investigations, helping to identify victims that had violent deaths. The use of molecular techniques facilitates the identification of species, as well as their phylogenetic relationships between their population, family, class, order and etc. The purpose of this literature review is to demonstrate the relationships, the importance and the application of forensic entomology in different areas, as well as describing the fauna composition and determine the biotic and abiotic factors in the interrelation between living beings and ecosystems. In this context, the work aims to present molecular methods for application in forensic entomology and determination of causes and time of death, as in determining Postmortem Interval (MPI).*

**Key-words:** *Forensic Entomology. insects. DNA. Criminal investigations. Postmortem Interval.*



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Cladograma da classificação em ordem de insetos	16
FIGURA 2 – Ciclo de desenvolvimento das moscas	17
FIGURA 3 – Dípteros de importância forense	19
FIGURA 4 – Besouros rola-bostas (Coleoptera: família Scarabaeidae: Scarabaeinae) de pastagens brasileiras	21
FIGURA 5 – Besouro <i>Dynastes hercules</i> , “rola-bosta”	21
FIGURA 6 – DNA mitocondrial animal	27
FIGURA 7 – Ciclo da PCR	29
FIGURA 8 – Extração de RNA através do método de Trizol	32
FIGURA 9 – Extração de DNA através do método de Trizol	33
FIGURA 10 – Extração de proteínas através do método de Trizol	33
FIGURA 11 – Sequenciamento de Sanger	35
FIGURA 12 – DNA Barcoding	36

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COI - Citocromo oxidase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAmt - DNA mitocondrial

DNA Barcode – Código de barras de DNA

IPM – Intervalo Pós-Morte

nm - Nanômetros

pb – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

RNAr – Ácido ribonucleico ribossômico

RNAt – Ácido ribonucleico transferência

SDS - Dodecilsulfato de sódio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 TEMA	11
1.2 PROBLEMA	11
1.3 OBJETIVOS	11
1.3.1 Objetivos Geral	11
1.3.2 Objetivos Específicos	11
1.4 JUSTIFICATIVA	12
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b>	13
2.1 ENTOMOLOGIA FORENSE	13
2.1.1 Diptera	17
2.1.2 Coleoptera	19
2.1.3 Estudos Precursores da Entomologia	22
2.2 ENTOMOLOGIA MÉDICO-LEGAL	22
2.3 IPM ESTIMATIVA INTERVALO PÓS-MORTE	26
2.3.1 PCR – Reação em Cadeia de Polimerase	28
2.3.2 DNA Barcoding	30
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	37
<b>REFERÊNCIAS</b>	38

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TEMA

Neste estudo de revisão bibliográfica, que visa o aprofundamento na área de entomologia forense e suas aplicações, serão abordadas as suas contribuições em diversas áreas com enfoque na médico-legal, além de serem tratadas as questões criminais, como estágios de morte, desenvolvimento de espécies em carcaças já analisadas em outros estudos e o emprego de técnicas moleculares para a identificação do DNA de espécies no local de morte.

## 1.2 PROBLEMA

O conhecimento entomológico está relacionado diretamente com o conhecimento da entomofauna presente no local de morte, portanto, torna-se necessário a coleta de informações ecológicas, bem como a distribuição geográfica das espécies encontradas e principalmente, a coleta de materiais biológicos, para a detecção de especificidades entre determinadas espécies com o cadáver e suas variações. Desta forma, como a técnica de extração do DNA pode auxiliar na identificação de insetos de importância forense? E qual a relação entre o ciclo de desenvolvimento dos insetos e o tempo de morte do cadáver?

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Demonstrar as relações, a importância e a aplicação da entomologia forense em diferentes áreas, como na área urbana e principalmente médico-legal e analisar através de artigos a presença de espécies de maior importância da fauna brasileira.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Demonstrar e conhecer métodos moleculares para a aplicação na entomologia forense e determinação das causas e tempo de morte;
- Descrever as relações entre a identificação da composição da entomofauna presente em cadáveres e o espaço geográfico onde se encontram, bem como o tempo de morte;
- Citar quais fatores bióticos e abióticos são considerados nos estudos da entomofauna brasileira.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

A Entomologia Forense é o estudo de insetos e outros artrópodes associados a diversas questões criminais, que serve como uma ferramenta auxiliar, na investigação de crimes contra pessoas vítimas de morte violenta e em alguns casos pode estar presente em disputas judiciais em casos de danos a produtos armazenados ou estruturas (ROCHA; SANTOS, 2015). É uma área da perícia criminal, que consiste na utilização de insetos que podem servir como evidências para a resolução de casos de morte, além da identificação de presença de substâncias tóxicas presente na carcaça, e nos insetos encontrados no local. Esses estudos iniciaram-se no Brasil em 1908, com os trabalhos pioneiros de Edgard Roquette Pinto e Oscar Freire, respectivamente, nos Estados do Rio de Janeiro e da Bahia e, atualmente, é um estudo que vem crescendo e sendo explorado (PUJOL-LUZ; ARANTES; CONSTANTINO, 2012).

Contudo Sandoval (2011) afirma que insetos que se encontram em estágio imaturo, apresentam dificuldades para serem identificados por meio de técnicas tradicionais, por isso, é necessária a implementação de outros métodos, que geram novos estudos importantes para a área de investigações criminais. Portanto, a utilização de métodos convencionais, bem como a coleta destes insetos e algumas análises iniciais do material coletado, e aplicação de práticas moleculares pode auxiliar na determinação da espécie, bem como na identificação do cadáver, uma vez que o material genético humano, pode ser encontrado no trato digestório de espécies necrófagos (SANDOVAL, 2011). Neste caso é necessário que haja a produção de pesquisas e a elaboração de trabalhos que abordem a diversidade de

condições e espécies encontradas nas cenas de crimes, para o levantamento de dados principalmente no Brasil.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 ENTOMOLOGIA FORENSE

A entomologia forense é a ciência que se aplica ao estudo da taxonomia, biologia e ecologia dos insetos (grego: *éntomon*, - que significa cortado, dividido, uma vez que a maioria dos insetos apresenta o corpo dividido por anéis ou segmentos e metamerizados e *logos* - fala, discurso, estudo de algo) (PRESTES 2008). De acordo com Figueira e Souto (2015, p. 461 apud Lord; Stevenson, p. 42, 1986), a entomologia forense pode ser dividida em três tipos: a entomologia urbana, que estuda a interação entre entomofauna e o ambiente urbano, envolvendo insetos que danificam móveis e construções; a entomologia de produtos estocados, que estuda as relações entre os insetos e a infestação em produtos armazenados, podendo causar prejuízos e riscos à saúde; e a entomologia médico-legal: a qual estuda os insetos, principalmente, necrófagos, que são úteis na elucidação de casos de morte. Na esfera criminal, os insetos são empregados na investigação de casos voltados para procedimentos médico-legais associados a cadáveres, para a determinação do intervalo pós-morte (IPM) (FIGUEIRA; SOUTO, 2015 apud CATTS; GOFF, 1992), além da aplicação genética e molecular na identificação da vítima e suas causas de morte para assim deduzir as circunstâncias envolvidas nos fatos do crime.

Os insetos estão presentes em diversos ecossistemas naturais e modificados, desempenhando várias funções na natureza devido a sua grande biodiversidade. Várias espécies podem ser encontradas tanto em ambientes terrestres, quanto aquáticos, exercendo funções importantes em diversas cadeias alimentares, como na herbivoria, na decomposição de materiais, filtração aquática, incluindo sucção de seiva, predação e parasitismo, o que possibilita a utilização destes como bioindicadores das condições de determinado ambiente (GULLAN; CRANSTON, 2017). Além da importância ecológica, os insetos desempenham um

papel considerável na pesquisa científica como em ciências médicas, veterinárias e agrícolas, na economia como na produção industrial e florestal. Os insetos também estão presentes no controle biológico de pragas em lavouras, na polinização, na dispersão de sementes, na auto-regulação das populações e na produção de produtos de valor comercial, como mel, produzido por abelhas ou algumas formigas, e a seda produzida pela lagarta *Bombyx mori* do filo Arthropoda.

Segundo Gomes (2010), os estudos científicos relacionados a insetos começam no século XVI, o que contribui para avanços tecnológicos a respeito da diversidade ecológica, e a produção de alimentos com os avanços na agricultura e erradicação de pragas no cultivo. Neste contexto, também estavam sendo descobertas as influências dos insetos na transmissão de doenças, como por exemplo, a peste bubônica na Idade Média.

O avanço da entomologia forense e o uso de práticas médico-legais se caracterizam pelo registro da primeira estimativa do intervalo pós-morte, feito pelo médico Louis François Étienne Bergeret em 1855, e o primeiro livro com a abordagem do tema, publicado por Jean Pierre Mégnin em 1894, *La faune des Cadavres* que contém a descrição de insetos e relatos de casos reais, bem como a descrição da fauna e da flora presente em cadáveres em estágios de putrefação (FIGUEIRA; SOUTO, 2015). Com a redescoberta de literaturas clássicas, os avanços na microscopia e os estudos de insetos colecionados por entomólogos amadores, surgem no início do século XVIII. Ademais, têm-se o aparecimento de vários textos entomológicos, na descrição de insetos. Dentre os de maior destaque, a obra *Metamorphosis Insectorum Surinamenis* (1705) de Maria von Merian, que descreve e classifica os insetos conhecidos, em seguida em 1734 houve a publicação de trabalhos envolvendo o desenvolvimento biológico, ciclos, anatomia e fisiologia dos insetos na obra *René Antoine Ferchault de Réaumur's Mémoires pour Servir a L'Histoire des Insectes*, e posteriormente em 1758, uma outra forma de classificação foi publicada, o *Systema Naturae* de Carl Von Linné que conta com 10 volumes publicados durante o século. Este período foi marcado pelo surgimento de entomólogos e os estudos aplicados à entomologia moderna, que permitiram a elaboração de estudos futuros.

O século XIX foi marcado pela formação da *Société Entomologique de*

*France* em Paris em 1832, com o objetivo de aprofundar os estudos a respeito da fauna francesa e estrangeira, as relações dos insetos com o ambiente natural, e as aplicações na medicina e agricultura. Posteriormente houve a formação da *Society of Entomologists of London* em 1833, fundada com o objetivo de promoção e desenvolvimento da ciência entomológica, cujos principais membros eram os naturalistas Charles Darwin e Alfred Russel Wallace, que contribuíram para a formação de bibliotecas e estudos relacionados aos insetos. Em destaque, temos o estudo da evolução realizado por Charles Darwin, a partir de sua coleção de besouros que é considerada uma das principais obras do século.

No Brasil, segundo os autores Pujol-Luz, Arantes e Constantino (2012), os estudos entomológicos, tomaram força no Século XX. Em 1908, com os trabalhos pioneiros de Edgard Roquette Pinto e Oscar Freire, respectivamente nos estados do Rio de Janeiro e da Bahia, foram registradas diversas espécies necrófagas na região da Mata Atlântica, e assim se iniciavam estudos acerca da decomposição e sucessão ecológica de insetos. Estes estudos facilitaram o conhecimento de insetos da ordem Diptera, que de acordo com Gullan e Cranston (2017), compreendem por volta de 150 mil espécies, sendo os maiores representantes as moscas e mosquitos; e de acordo com Pereira e Almeida (2001), a ordem Coleoptera que compreende majoritariamente espécies de besouros, com aproximadamente 370.000 espécies descritas.

As espécies de insetos atualmente são identificadas, descritas e classificadas conforme sua taxonomia e divididos em ordens. De acordo com Leite e Sá (2010), a taxonomia consiste no estudo teórico da classificação, incluindo bases, princípios, procedimentos e regras para identificação de espécies. Os táxons são dispostos em níveis, que são as categorias como:

Filo → Subfilo

Classe → Subclasse

Ordem → Subordem

Superfamília → Família → Subfamília → Tribo → Subtribo (animais)

Gênero → Subgênero

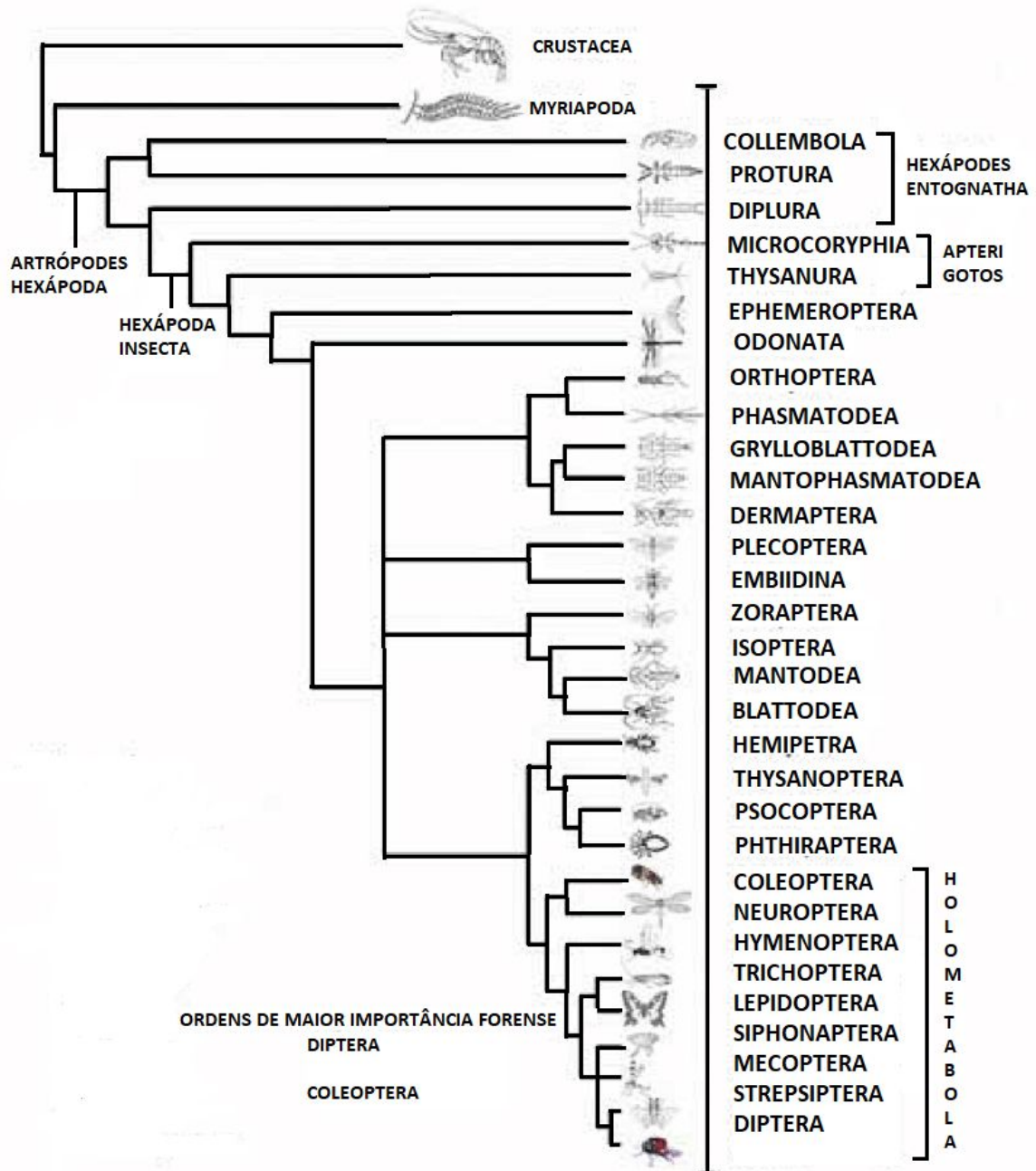
Espécie → Subespécie



Conforme Gullan e Cranston (2017) as ordens principais, com o maior índice de espécies descritas são: os besouros (Coleoptera) com  $\pm$  350.000 espécies descritas; moscas e mosquitos (Diptera); vespas, abelhas e formigas (Hymenoptera) com e  $\pm$  150.000 espécies descritas; borboletas e mariposas (Lepidoptera), e percevejos (Hemiptera) com 100.000 espécies descritas.

De acordo com Beutel et al. (2017), o subfiló Hexapoda inclui os artrópodes com divisões em 3 (três) tagmas: cabeça, tórax trisegmentado e abdômen; sistema traqueal; perda do 2<sup>a</sup> par de antenas; perda de órgãos nefridiais (excretadores); perda de glândulas do intestino médio; transferência de espermatozoides via espermatóforos etc. Atualmente inclui classes Entognatha e Insecta, como demonstra a Figura 1.

FIGURA 1 - Cladograma da classificação em ordem de insetos

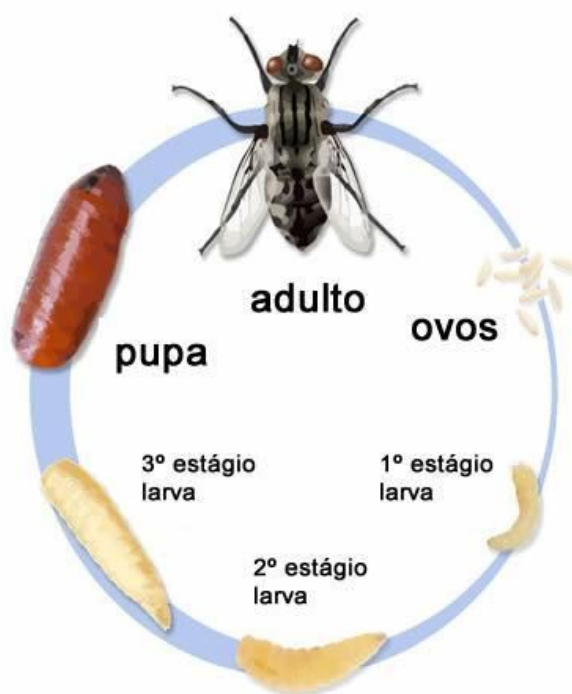


FONTE: Adaptado de (GOMES, 2010)

Os insetos que estão ligados a matéria orgânica e cadáveres em decomposição são classificados em: necrófagos, estes por sua vez, são os de maior importância forense, que colonizam e decompõem tecidos animais, e podem ser encontrados tanto no estágio larval (imaturo) ou adulto (FIGURA 2), cujo os principais representantes são moscas (Diptera) e besouros (Coleoptera); os onívoros

são colonizadores de carcaças em decomposição, são eles as formigas e vespas; os parasitas são aqueles utilizam a entomofauna presente no local de morte, para o seu desenvolvimento, ou seja como fonte de recursos; os predadores se alimentam de larvas e insetos no estágio adulto, são eles, os himenópteros (vespas, abelhas, formigas), coleópteros, dípteros muscóides e dermápteros (tesourinhas). Ademais são encontrados insetos denominados de acidentais que são os que encontram o cadáver por acaso, neste caso incluem ácaros, aranhas e outros organismos (STAMATO; COSTA; PRÉVIDE, 2014).

Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento das moscas



Fonte: (MOSCAS..., 2019)

### 2.1.1 Diptera

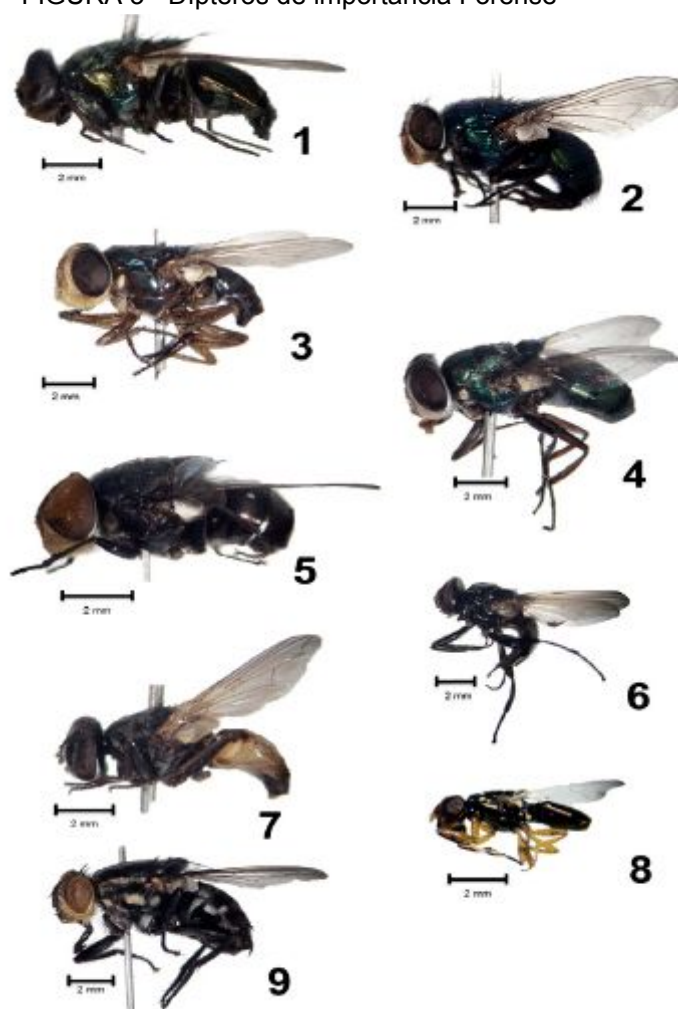
Diptera (*di* = duas e *ptero* = asa) é uma ordem que compreende moscas, mosquitos, varejeiras, mutucas, pernilongos e borrachudos, e é um dos grupos de insetos mais diversos ecologicamente. Estes insetos estão distribuídos por todo o mundo, e colonizam praticamente qualquer tipo de hábitat, sobretudo em ambiente aquático como em zonas marinhas, costeiras e estuários, lagos, rios e riachos,

águas estagnadas, águas termais, poços de petróleo e fitotelmos (tanques biológicos vivos), no qual se encontram em estágio larval. Este grupo ocupa diversos nichos alimentares, podendo ser parasitas, hematófagos (se alimentam de sangue), predadores e os que se alimentam de folhas, frutos, flores, néctar e substâncias açucaradas (CAMARGO, 2015).

Pinho (2008) cita que única característica comum a todos os Diptera em estágio adulto, é a completa ausência de pernas torácicas, característica também comum em ordens como Siphonaptera (pulgas) e alguns Hymenoptera e Coleoptera. Portanto, a variação morfológica das larvas em Diptera é tão grande, que não existe um caráter que as diferenciam das outras ordens de insetos.

Além da importância ecológica, os dípteros desempenham funções que favorecem estudos forenses na entomologia, na veterinária, na medicina e na economia. Os insetos de maior importância forense, em sua maioria são moscas e mosquitos que se alimentam de matéria orgânica em decomposição, ou da matéria vegetal (GULLAN; CRANSTON, 2017).

De acordo com Brito *et al.* (2008) os Muscídeos, representam uma família de Dípteros (FIGURA 3), que são moscas caracterizadas por serem cosmopolitas, ou seja, é um grupo que possui grande dispersão e distribuição, pela sua capacidade de se adaptar em diferentes ambientes naturais rurais e urbanos, independente das transformações do local. Um exemplo é a *Musca domestica*, uma espécie de grande interesse forense e médico-sanitário, que possui grande capacidade de voo e tem hábitos diurnos, e é caracterizada pela sua alta capacidade de se instalar nos povoadamentos humanos, e é umas das responsáveis pela transmissão de mais de 60 categorias de patógenos para o homem, animais domésticos e silvestres. Em zonas rurais, se encontram em fezes de equinos, bovinos e suínos, restos e etc.; em zonas urbanas, se encontram principalmente em aterros sanitários (BRITO *et al.*, 2008).

FIGURA 3 - Dípteros de importância Forense<sup>1</sup>

FONTE: (RODRÍGUEZ; SALAZAR; D, 2016)

### 2.1.2 Coleoptera

De acordo com Audino et al. (2007) a Ordem Coleoptera (do grego, *koleos* = estojo; *pteron* = asa) é umas das maiores ordens da classe Insecta e agrupa os insetos comumente chamados de besouros, que correspondem a  $\pm$  350.000 espécies, o equivalente a 40% da classe Insecta. A maioria dos besouros possui grande importância forense, sendo estes os terrestres, e essas espécies agrupam aproximadamente dois terços de todas as espécies de besouros existentes no Planeta Terra, enquanto os aquáticos equivalem a 10% desta ordem.

<sup>1</sup> Família Calliphoridae: 1 - *L. cuprina*; 2 - *L. eximia*; 3 - *Co. macellaria*; 4 - *C. albiceps*; 5 - *C. megacephala*; Família Muscidae: 6 - *O. aenescens*; 7- *M. domestica*. Família Phiolidade: 8 - *P. casei*. Família Sarcophagidae: 9 - *Sarcophaga sp.*

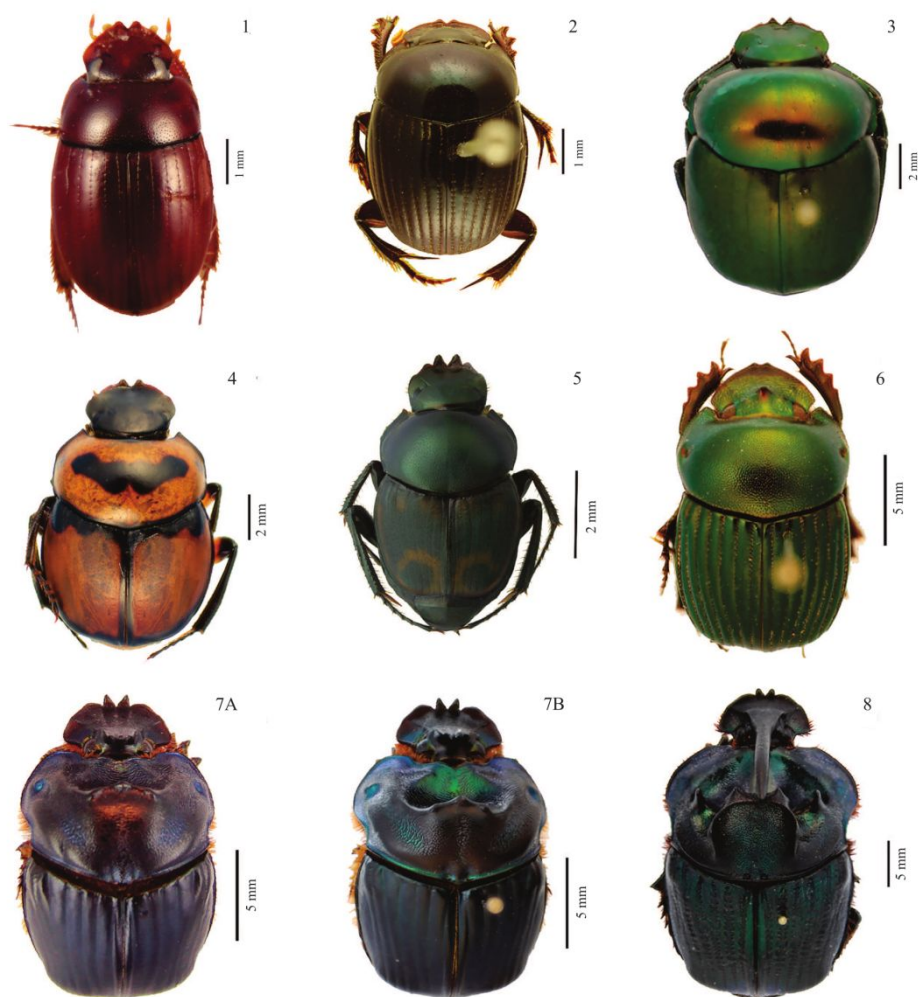
Segundo Magalhães *et al.* (2015), as espécies Coleoptera ocupam diversos nichos ecológicos (matas, florestas tropicais e temperadas, deserto), e possuem variados hábitos alimentares, podendo ser detritívoros, ou seja, que se alimentam de matéria orgânica em decomposição; herbívoros, que se alimentam de material vegetal; frugívoros, que se alimentam de frutos; ou predadores os que se alimentam de outros insetos e contribuem para o controle biológico. Os besouros necrófagos, são aqueles que se alimentam de matéria orgânica de animais em decomposição; os micetófagos se alimentam de fungos e bolor e os coprófagos, se alimentam de excrementos de grandes animais.

Entre as famílias mais comuns desta ordem estão os besouros rolabosta (família Scarabaeidae), os serra-paus (família Cerambycidae), os vaga-lumes (família Lampyridae), os pirilampos (família Elateridae), os gorgulhos (família Curculionidae), as joaninhas (família Coccinellidae), entre outros. As famílias mais numerosas com números aproximados de espécies descritas em todo o mundo são: Curculionidae (50.000), Chrysomelidae (35.000), Staphylinidae (30.000), Cerambycidae (26.000), Carabidae (25.000), Scarabaeidae (20.500), Tenebrionidae (20.000) e Buprestidae (13.000) (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

A Família Scarabaeidae é representada por besouros comumente chamados “rola-bosta” (FIGURA 4). Estes besouros são de grande importância para a ciclagem de nutrientes dos ecossistemas, pois processam a matéria orgânica em decomposição, e recebem o nome por utilizarem fezes e outros detritos orgânicos, carcaça e frutos em decomposição como recurso alimentar, tanto no estágio adulto como no larval, localizando a matéria através do odor (AUDINO *et al.*, 2007).

Por exemplo, um dos principais representantes dessa família é o besouro Hércules (*Dynastes hercules*), que possui 17 cm de comprimento, com o corpo estreito e alongado, sendo considerado o inseto mais pesado e volumoso, conforme mostrado na (FIGURA 5) (GULLAN; CRANSTON, 2017).

FIGURA 4: Besouros rola-bostas (Coleoptera: família Scarabaeidae: Scarabaeinae) de pastagens brasileiras<sup>2</sup>



FONTE: (TISSIANI; VAZ-DE-MELLO; CAMPELO-JÚNIOR, 2017)

FIGURA 5 - Besouro *Dynastes hercules*, “rola-bosta”.



FONTE: (KELLER; CAVE 2006)

<sup>21</sup> - *Agamopus unguicularis*; 2 - *Canthidium barbaticum*; 3 - *Canthon corpulentus*; 4 - *Canthon histrio*; 5 - *Canthon lituratus*; 6 - *Chalcocoprins hesperus*; 7A e 7B - *Coprophanaeus cyanescens* ; 8 - *Coprophanaeus ensifer*.





### 2.1.3 Estudos Precursores da Entomologia

Um estudo importante para a Entomologia Forense foi a descoberta do ácido desoxirribonucleico (DNA), por Friedrich Miescher em 1868, um bioquímico suíço, e posteriormente Rosalind Franklin, em 1952 descobre a estrutura do material genético, o que leva a uma nova revisão de metodologias no estudo da taxonomia dos insetos (ARIAS, 2004). Segundo Santos (2018), no Brasil, a primeira análise do material genético, ocorreu em 1994, no Laboratório da Polícia Civil no Distrito Federal.

Dentre as principais obras brasileiras, se destacam respectivamente os livros, Entomologia Forense - quando os insetos são vestígios, 3<sup>o</sup> edição, de Janyra Oliveira Costa, publicado em 2011, e o Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais de Leonardo Gomes, publicado em 2010, utilizado na elaboração deste artigo.

O Brasil apresenta uma ampla diversidade biológica de insetos, e os índices de criminalidades cada vez mais evidentes, conseqüentemente, torna-se necessária a expansão de estudos entomológicos para a resolução de crimes e aprimoramento de técnicas elaboradas por peritos e médicos-legistas na identificação do cadáver, das causas de morte e do conhecimento fauna cadavéricos presente no local. Como principal base teórica, utilizam-se estudos como os citados neste artigo, que são primordiais para novas descobertas e o avanço das áreas envolvidas para o conhecimento da entomofauna e a as relações desta com os tipos e as causas da morte.

## 2.2 ENTOMOLOGIA MÉDICO-LEGAL

Segundo Santos (2018), a ciência forense é uma área ampla que tem como principal objetivo auxiliar nas investigações na justiça, principalmente a criminal, e há várias subáreas como a Toxicologia Forense, Química Forense, Genética Forense, Entomologia Forense. Os profissionais entomólogos forenses utilizam técnicas como, por exemplo, análises microscópicas da fauna local, que sucedem a decomposição do cadáver, possibilitando o cálculo entre o tempo decorrido entre a

morte e a decomposição, através da observação das condições ambientais do local (GULLAN; CRANSTON, 2017). Ademais, a medicina legal é a responsável pela observação do desenvolvimento, controle e manipulação do habitat de insetos, empregados na elucidação de casos de morte violenta, como crimes contra pessoas, acidentes de massa, genocídios e etc. (SANTANA; BOAS, 2012). Sendo neste caso, uma especialidade jurídica, baseada em conhecimentos científicos que são aplicados na análise de provas e elucidação de crimes, como na criminalística, contribuindo para a cronologia e estimativa do intervalo post-mortem (IPM).

Maia (2012) diz que, a criminalística é considerada uma disciplina nascida da Medicina Legal, e que busca a materializar o crime para a elucidação dele. No Brasil, surge através de investigações realizadas em universidades, em sua maioria por Médicos Legistas. De acordo com Garrido (2008), estudos relacionados a esta área teriam seu início quando Hans Gross, um criminologista austríaco e jurista criminal, no final do século XIX, propôs que os métodos da Ciência moderna fossem utilizados para solucionar casos criminais. Neste contexto, ciência forense e a criminalística, começa a ter destaque em meados dos anos 80, com os avanços de técnicas de identificação e análises através do DNA (SANTOS, 2018). Portanto, além de coletas físicas realizadas pela perícia, torna-se necessária a coleta de amostras biológicas, os quais são coletados fios de cabelo, pele, fluídos, substâncias ou fibras microscópicas que contenham material genético, para a obtenção de evidências.

Maia (2012) comenta que:

Exames de natureza técnico-científica são comumente realizados quando formalmente são solicitados pelas autoridades policiais ou judiciais, em decorrência da necessidade de esclarecimento de um fato delituoso, através de uma sistemática norteada por padronizações e regras científicas e jurídicas.

Nos locais de morte por crimes violentos, homicídios ou suicídios, é necessário à presença de um perito, que é um profissional capacitado para a análise superficial do corpo e do local de morte, onde serão realizados exames perinecroscópicos, que consiste na coleta de dados e vestígios para a avaliação. Bina (2009, apud JUNIOR; CASTRO, 2014, p. 188), define que o “O vocábulo *‘peri’*”

vem de periferia, logo, tal exame é realizado sobre a região periférica do cadáver, em outras palavras, o local a volta desse”.

O artigo 164, decreto Lei nº 3.689 de 03 de Outubro de 1941, do Código de Processo Penal, prevê a figura do exame perinecropsóptico através da necessidade de se fotografar o cadáver na posição em que for encontrado, assim como todas as lesões externas e os vestígios que forem deixados no local, para que possa ser realizada minuciosamente a análise do local em volta do cadáver (JUNIOR; CASTRO, 2014).

Áreas como a de medicina legal, a química forense, a crono-tanatologia juntamente com a tanatologia, contribuem para estimativas, sobretudo das causas e o tempo da morte. Maia (2012) diz que, o estudo das reações físico-químicas e fenômenos biológicos são ferramentas para avaliação da hora da morte. Parâmetros como temperatura local e umidade relativa do ar podem ser decisivos na busca pela verdade de como ocorrera o óbito.

Segundo Marinoski (2016, p. 49 apud OLIVEIRA-COSTA, 2011), logo após a morte, se inicia o processo de putrefação, que se resume em um evento de destruição e alterações físicas, químicas e biológicas, que consistem na decomposição e degradação da matéria orgânica, realizado por bactérias aeróbicas e anaeróbicas e por organismos microscópicos. As bactérias que participam deste processo, em sua grande maioria, são provindas da microbiota intestinal do indivíduo.

Fatores como, por exemplo, os climáticos, promovem as primeiras transformações físicas e biológicas, que consistem na perda de líquido, provocando a perda de peso, o dessecamento e o endurecimento da pele. Assim inicia-se a desidratação muscular, em aproximadamente 48 horas que acarretam na rigidez cadavérica. Outros fatores como os bióticos, causam o resfriamento e inchamento do corpo, com o aparecimento de manchas vermelho-violáceas formadas pela falta de circulação sanguínea, os chamados, livores hipostáticos. Posterior a isto, ocasiona as transformações químicas tardias de deterioramento, que ocorrem em dias ou semanas após a morte. Como o processo de autólise, que é a desintegração de tecidos que ocasiona o processo de putrefação, que consiste na ação de microrganismos. A autólise é um fenômeno abiótico que se inicia em poucas horas após a morte, e se estende até a fase de fenômenos transformativos destrutivos,

que causam alterações na estrutura tecidual. Com a morte celular, proteínas armazenadas nos lisossomos da própria célula, iniciam este processo denominado como autólise (BANDARRA; SEQUEIRA, 1999).

De acordo com Sakuma (2015) os fatores que contribuem para as transformações e degradação de tecidos e da matéria orgânicas, também chamadas de fatores abióticos, avitais ou tanatognósticos, e podem ser divididos em:

- Imediatos: que consistem na cessação das funções vitais, como, perda da consciência, perda da sensibilidade, abolição da motilidade e do tono muscular, cessação da respiração, cessação da circulação, cessação da atividade cerebral.
- Consecutivos, como, desidratação cadavérica, esfriamento cadavérico (algor mortis), manchas de hipóstases cutâneas, rigidez cadavérica, e espasmos cadavéricos.

Em seus estudos acerca do calendário tanatológico, Sakuma (2015) realizou um compilado de estudos de outros autores sobre as variações dos fenômenos de resfriamento corporal.

Para Dantas Filho et al. (1998), a análise da sistematização tradicional dos sinais abióticos leva os profissionais a três importantes conclusões: ausência de sinal patognomônico de morte, ou seja, não há sinais de morte por doenças; em segundo lugar evidencia que a morte não é um evento único e sim uma sequência de eventos; e, por último, esse diagnóstico é tanto mais difícil quanto mais recente é a morte.

Em seu estudo Dantas Filho *et al.* (1998), comenta que “o próprio Código do Processo Penal Brasileiro só autoriza a realização de autópsias após 6 horas da constatação da morte para diminuir o risco desse tipo de erro (Art. 162 CPP)”.

Insetos e larvas aceleram o processo de degradação da matéria orgânica e auxiliam na estimativa do tempo de morte. Os artrópodes, em sua maioria os de ordem Diptera e Coleoptera, podem auxiliar na estimativa do IPM - Intervalo post-mortem através de sua coleta no local de morte. A técnica de identificação baseia-se na comparação de dados sobre o desenvolvimento de insetos, desde o ovo até a fase adulta, obtidos em análises laboratoriais de material coletado no corpo ou próximo deste logo após sua descoberta.

### 2.3 IPM (ESTIMATIVA INTERVALO PÓS-MORTE)

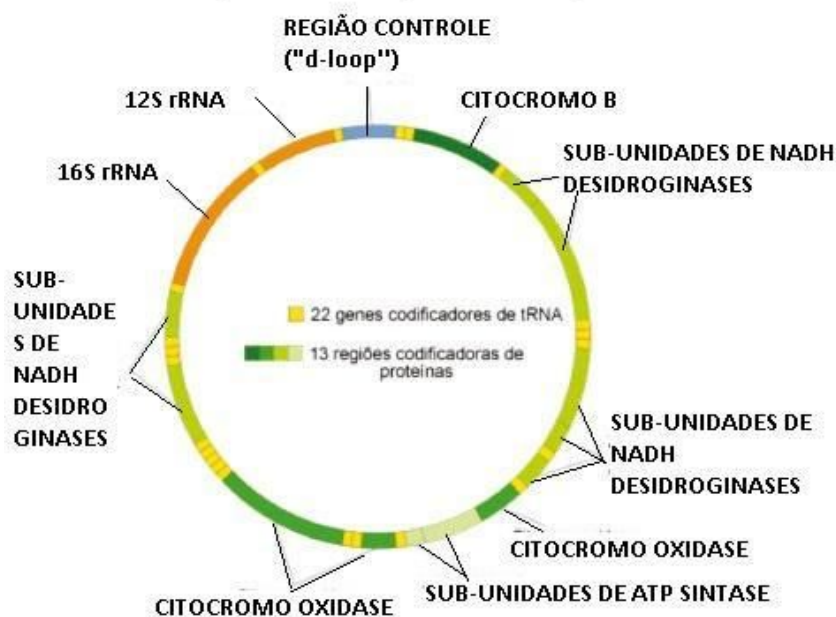
A Entomologia Forense utiliza de dados do desenvolvimento e relações ecológicas e biológicas de insetos que se alimentam de corpos em decomposição, para investigações criminais. De acordo com Pinheiro, Reis e Silva (2012) o intervalo pós-morte (IPM), corresponde ao período de tempo entre a ocorrência da morte e o momento em que o corpo é encontrado, ou seja, a cronologia da morte auxiliando na reconstrução dos eventos do crime. Apesar do processo de decomposição ser um processo contínuo, ele é constituído de uma série de eventos e estágios. Para a realização do IPM, é necessária a presença de espécies necrófagas, que se alimentam da matéria orgânica em decomposição, e que aceleram o processo de desintegração do corpo com o ato de oviposição facilitando o estudo do caso de morte (SANTANA; BOAS, 2012). Porquanto, o processo de identificação, varia conforme o grau de desenvolvimento destas espécies, que podem ser encontradas em estágios imaturos, pupários ou apenas fragmentos corporais, o que pode dificultar o processo de identificação.

Atualmente, o emprego de marcadores moleculares facilita a identificação e separação taxonômica de insetos presentes em carcaças, desde o estágio imaturo até o estágio adulto, auxiliando na caracterização da variabilidade genética de espécies, e também na identificação do cadáver (SANDOVAL, 2011). Denominam-se marcadores moleculares, sequências ou fragmentos específicos de DNA, que fornecem alta diversidade de polimorfismos, ou seja, apresenta capacidade alotrópica, de assumir diferentes formas, o que permite a distinção genética de indivíduos e espécies (SEGATTO, *et al.*, 2017). Os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, e geralmente são herdados co-dominantemente (interação entre alelos), raramente exibem interações pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos, portanto, exercem vantagens em relação aos marcadores morfológicos (BRAMMER, 2000). Os marcadores de sequências podem ser isolados a partir de genomas nucleares e citoplasmáticos (mitocôndria e cloroplasto), dependendo do objetivo do estudo; e de diferentes regiões, tanto DNA codificador como não codificador

(SEGATTO, *et al.*, 2017). De acordo com Kosmann (2009), devido a combinação de características, o emprego do DNA mitocondrial (DNAmt) possibilita a caracterização de populações, subespécies e espécies, evolução e filogenia de insetos.

O DNAmt, é um composto orgânico presente nas mitocôndrias, que são organelas responsáveis pela fosforilação oxidativa. Este processo ocorre por meio da canalização de elétrons complexos (cadeia transportadora de elétrons), em uma etapa metabólica da cadeia respiratória, para a formação da molécula de ATP (adenosina trifosfato), um nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia nas ligações químicas do processo de respiração celular (BIANCO; MONTAGNA, 2016). Conforme Goveia (2010), o DNAmt possui várias características singulares e distintas em relação ao genoma nuclear, pois é uma sequência bastante curta, em relação ao genoma inteiro e poucas proteínas são codificadas pelo genoma mitocondrial. Portanto, possui seu próprio genoma distintos e componentes básicos que conferem informação genética extra-nuclear. Desta forma, o DNAmt é uma molécula circular dupla e fechada, que contém (16.569 pb) e possui seu próprio código genético. Contendo 37 genes que codificam 13 RNAs mensageiros (RNAm), 22 RNAs de transferência (RNAt) e 2 RNAs ribossomais (RNAr) (FIGURA 6). O DNAmt não contém íntrons, que são regiões não codificadoras, mas tem vários genes sobrepostos e códons de terminação incompleta (BIANCO; MONTAGNA, 2016).

FIGURA 6 - DNA mitocondrial animal



Fonte: Adaptado de (REIS; SILVA; RODRIGUES, 2013)

Técnicas como a de PCR - Reação em Cadeia de Polimerase, Método de Sanger e principalmente a de DNA Barcoding, que inclui as duas técnicas anteriores, são empregadas no sequenciamento genômico de insetos e artrópodes colonizadores de carcaças em decomposição, a partir da utilização do genoma mitocondrial.

### 2.3.1 PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

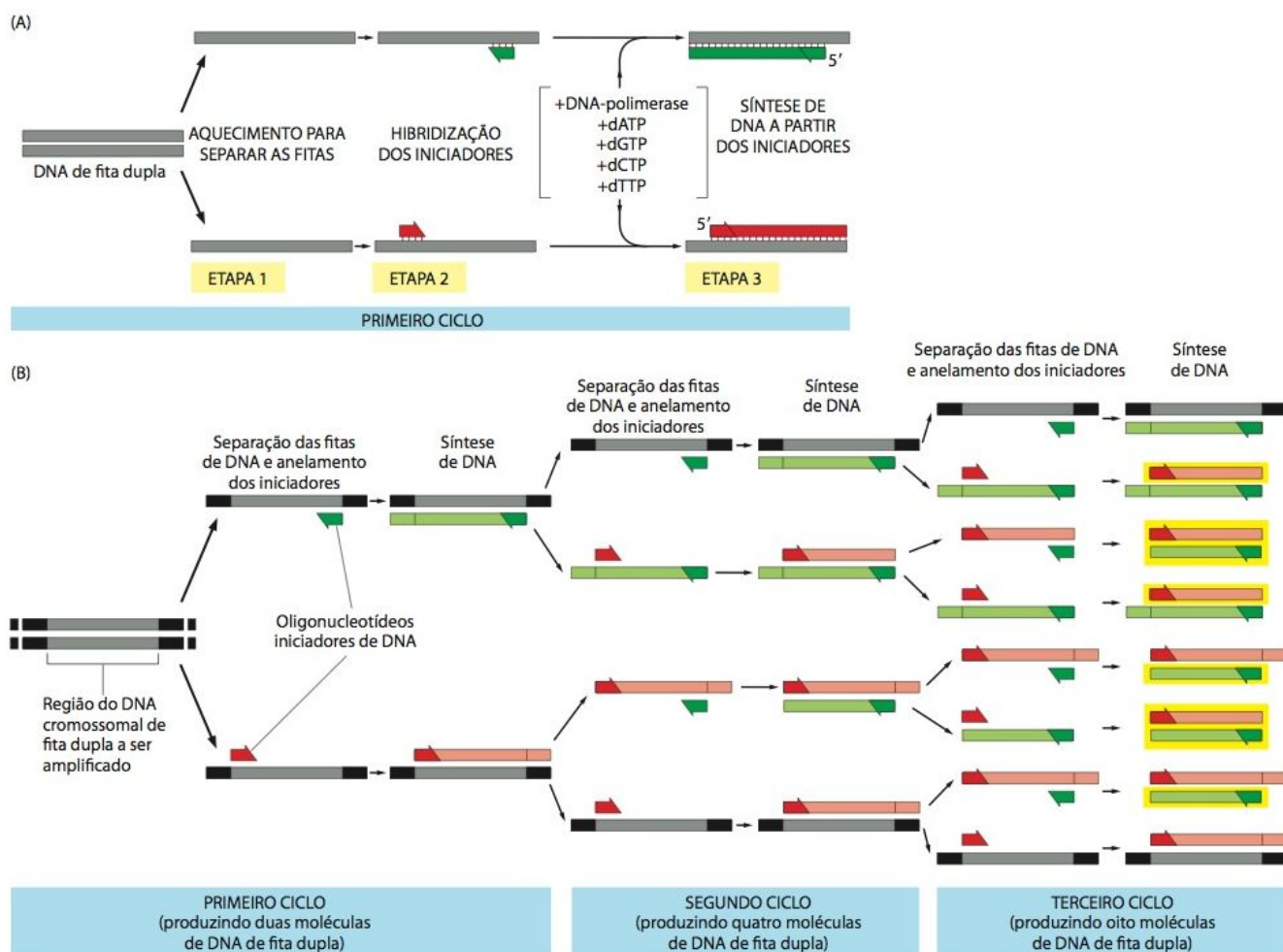
Os marcadores de DNA são divididos em três categorias principais: os baseados em hibridização, os baseados em PCR (Reação em cadeia da Polimerase – Polymerase Chain Reaction) e por fim, marcadores baseados em sequenciamento (TURCHETTO *et al.*, 2017).

A Polymerase Chain Reaction ou Reação em cadeia da polimerase é uma técnica desenvolvida por Kary Banks Mullis, um bioquímico estadunidense, que recebeu o prêmio Nobel de química de 1993 pela sua contribuição no desenvolvimento da técnica (KARY, 2019). A PCR é uma técnica de polimerização e duplicação *in vitro* do DNA. De acordo com Camargo (2011) a técnica envolve a utilização quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras (*primers*) e uma enzima, a DNA polimerase termoestável, e consiste em três etapas com

variação de temperatura (FIGURA 7):



FIGURA 7 - Ciclo da PCR



FONTE: (CONHEÇA..., 2018)

- 1) **Desnaturação:** a sequência a ser amplificada, a fita molde de DNA, é desnaturada por aquecimento entre 92°C a 96°C por cerca de 30 segundos. Por conseguinte, a dupla fita desnaturada, é aberta, tornando-se uma fita única.
- 2) **Hibridização ou pareamento:** Após a abertura e separação das fitas, dois iniciadores sintéticos (*primers*) ligam-se à região complementar da fita de DNA molde. Um dos primers é complementar à sequência em uma de fita do DNA genômico e o outro é complementar à outra sequência da outra fita. Essa etapa ocorre em temperatura de  $\pm 60^\circ\text{C}$ .
- 3) **Polimerização:** Nesta etapa ocorre a extensão e amplificação da fita molde, a enzima Taq DNA polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita, utilizando os quatro dNTP's como substrato da reação de polimerização. Essa etapa ocorre a temperatura de 72°C e dura em média de

45 s a 1 min.

O ciclo é repetido em torno de 30 vezes, e os produtos do primeiro ciclo de replicação são desnaturados, hibridizados e replicados com a Taq DNA polimerase novamente para maior amplificação do genoma (CAMARGO, 2011). Entre os marcadores baseados em PCR, que permitem a amplificação de uma sequência específica de DNA sem necessidade de clonagem, apenas com a utilização de algumas moléculas da sequência alvo, podemos citar: RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), ISSR (Inter-simple sequence repeats), SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (TURCHETTO *et al.*, 2017).

### 2.3.2 DNA Barcoding

Para Gullan e Cranston (2017) a técnica molecular denominada “DNA barcoding”, funciona como um sistema bioindicador. A técnica permite o conhecimento do potencial de diversas espécies, proporcionando estimativas mais confiáveis sobre a temporização da evolução de insetos nos últimos 400 milhões de anos, modelando sua fisiologia e morfologia (Figura 4).

De acordo com Carvalho, Cândido e Queiroz (2013), esta metodologia surge como um projeto intitulado “Barcode of life” (Barras da Vida), largamente utilizada para a identificação de espécies eucarióticas, que conta com a colaboração internacional, principalmente de bibliotecas de mamíferos, insetos e peixes. A técnica consiste no sequenciamento da região do genoma que possui 648 pb (pares de bases) do gene mitocondrial na subunidade I da citocromo oxidase c (cytochrome c oxidase) (COI) (relacionada ao terminal 5') contido no material genético (KOSMANN, 2009). Esta sequência por sua vez, é padronizada internacionalmente em plataformas e bancos de dados, funcionando como uma etiqueta molecular, com um código de barras que identifica a espécie, sendo específica para cada organismo analisado.

A coleta de larvas necrófagas ou artrópodes em variados estágios precede o início da técnica, que deve ser adequada, coletando as larvas na superfície do

material orgânico em decomposição, de tal forma que não influencie no material e no local de coleta. De acordo com Camargo *et al.* (2015) se a coleta é destinada à pesquisa científica do material biológico e documentação, torna-se necessária a concessão de autorização e licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), instituído pelo Ibama, por meio da Instrução Normativa (IN) nº 154, de 1º de março de 2007.

Conforme Kosmann (2009), após a coleta, deve ser realizada a identificação do material coletado, acondicionado e, no caso das larvas, preservadas em tubos com soluções de etanol 96%, nitrogênio líquido e ou álcool 70% e refrigerados. Os insetos adultos serão coletados e introduzidos em frascos com éter, clorofórmio ou acetato de etila e retirados após a morte.

Os primeiros passos são dedicados à identificação do material coletado, e a seleção apropriada do DNA com o marcador barcode, ou seja, a seleção da região da COI no genoma mitocondrial. A identificação será realizada a partir de referências anatômicas, fisiológicas e morfológicas, em plataformas. Os passos desde a coleta de espécimes até a validação estão contidos na plataforma National Center for Biotechnology Information - Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), e na plataforma de bioinformática, Barcode of Life Data Systems - Código de barras dos sistemas de dados da vida (BOLD), que integra a elaboração completa da técnica (KOSMANN, 2009).

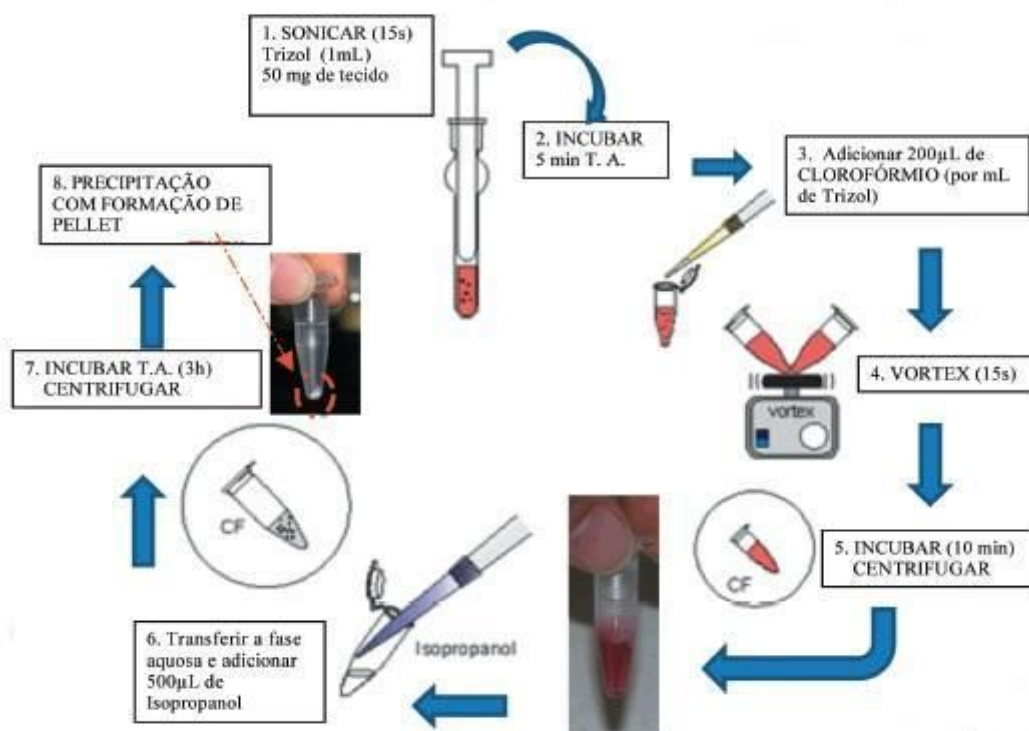
De acordo com Kosmann (2009), na técnica de extração do DNA são utilizadas partes dos insetos coletados, no caso de insetos no estágio adulto, podem ser utilizadas asas, tórax, cabeças, pernas e outras. A extração do DNA inicia-se com a lise (ruptura) das membranas celulares com a finalidade de liberar os componentes citoplasmáticos, ou nucleares intracelulares, ou seja, que estão contidos no núcleo e citoplasma da célula. Nesta etapa podem ser empregadas metodologias diversas, dependendo do tipo de amostra e ou célula utilizada, técnicas como: a digestão enzimática com a proteinase K e lisozima confere pureza ao material extraído; a dodecilsulfato de sódio (SDS) que são detergentes comuns, não iônicos, com propriedades hemolíticas e emulsificante que permeabiliza membranas celulares vivas; ou com detergentes não iônicos; a ruptura mecânica na homogeneização; a sonificação com uso de ondas sonoras; soluções como a salina

hipotônica ou outras (SCORSATO; TELLES, 2011).

Para o procedimento de extração deve ser escolhida a metodologia adequada, os autores Kosmann (2009) e Gonçalves (2009), utilizam o método de digestão com proteinase K, dodecilsulfato de sódio (SDS) e purificação com fenol-clorofórmio, que são métodos que resultam em um material extraído puro.

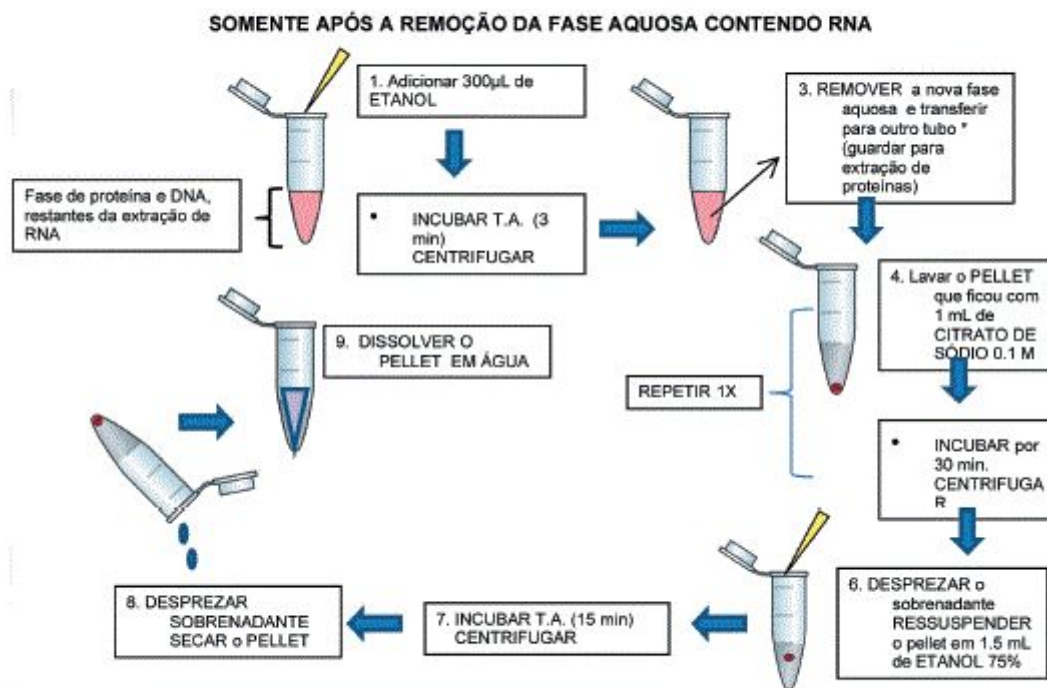
Roselino (2008) diz que, para a extração do RNA da amostra, o método de fenol-clorofórmio ou o método do reagente trizol, permitem a extração inicial do RNA, seguida pela extração de DNA e de proteínas de uma mesma amostra, conforme as Figuras 8, 9 e 10.

FIGURA 8 - Extração de RNA através do método de Trizol



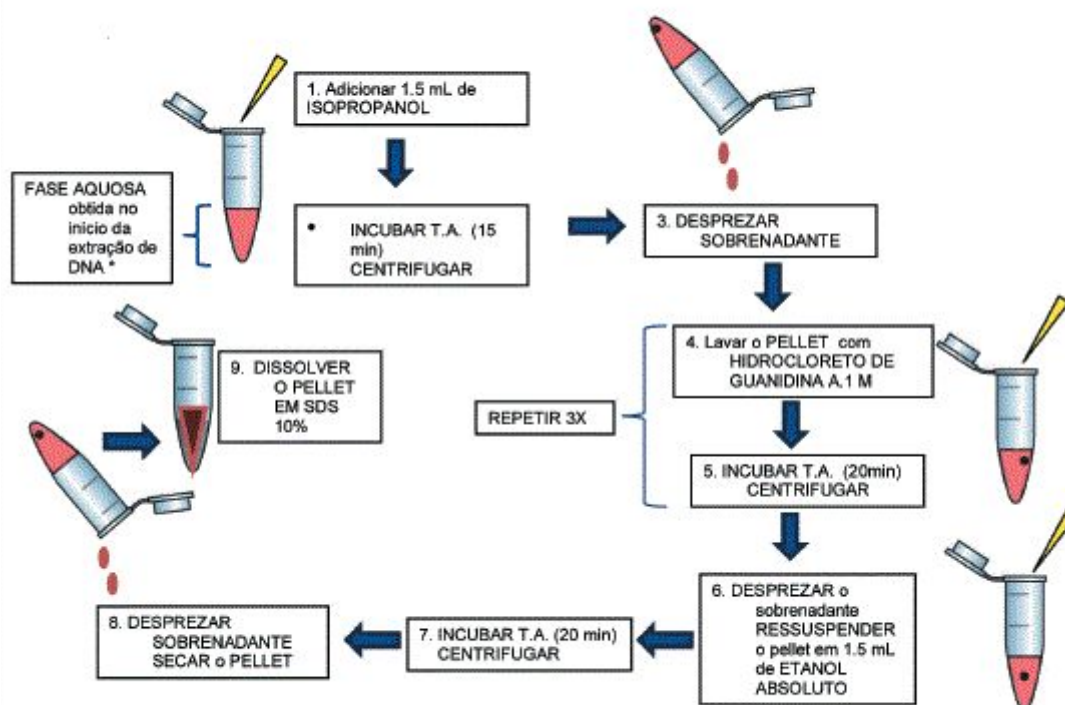
FONTE: (ROSELINO, 2008)

FIGURA 9 - Extração de DNA através do método de Trizol



FONTE: (ROSELINO, 2008)

FIGURA 10 - Extração de proteínas pelo método de Trizol



FONTE: (ROSELINO, 2008)

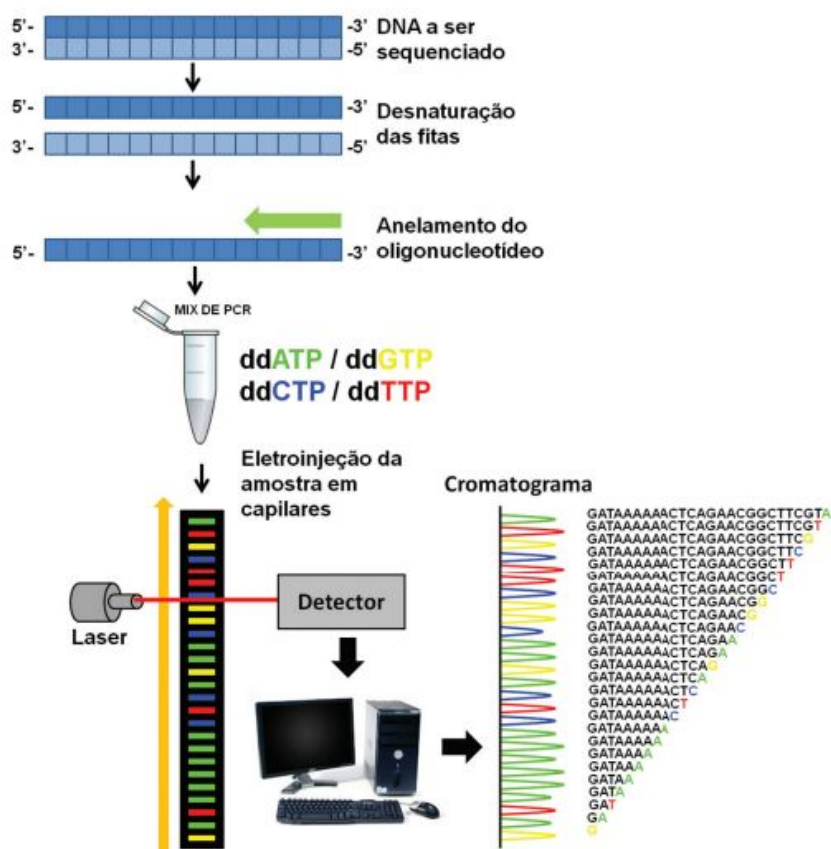
A purificação é um processo de separação do material genético (DNA) de outras moléculas, como membranas, proteínas, RNA, lipídios e impurezas. O procedimento de separação e purificação possui diversas metodologias que podem variar conforme o experimento. A metodologia utilizada por Gonçalves (2009) de purificação com fenol-clorofórmio é a mais utilizada, de acordo com Scorsato e Telles (2011), o princípio da técnica de separação, é a diferença de solubilidade de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios nesses solventes orgânicos, formando uma fase aquosa, uma vez que fenol-clorofórmio utilizado após o rompimento da membrana celular auxilia na desnaturação das proteínas, removidas posteriormente na etapa de centrifugação, a etapa de isolamento. Após a purificação do material extraído, é realizada a quantificação no equipamento de espectrofotometria, através da medição da quantidade de luz absorvida pelo material presente em solução, que será determinado seu grau de pureza e sua concentração, no comprimento de onda de 260 nanômetros (nm). Para a obtenção de determinada região da molécula-alvo, neste caso, a porção de citocromo c oxidase subunidade I (COI) do genoma mitocondrial, é realizada a amplificação do DNA, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A técnica de PCR utilizada por Mesquita *et al.* (2001) consiste em três etapas: a desnaturação onde o DNA é aquecido a 95°C durante 30 segundos; o anelamento ou hibridização, na qual o molde se anela a fita complementar a temperatura de 60°C; e a extensão ou polimerização, um processo que ocorre a 72°C, onde a enzima DNA polimerase forma uma nova fita, através da duplicação do DNA.

A etapa posterior é a de sequenciamento, que pode ser realizada pelo método tradicional de Frederick Sanger para a determinação das sequências de nucleotídeos a partir de fragmentos maiores de DNA. O equipamento ABI 377 é um sequenciador utilizado na realização do método semi-automatizado de Sanger, detectando a fluorescência emitida pelos didesoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) para determinar nucleotídeos do fragmento de interesse. Este equipamento possibilita o sequenciamento de 48 fragmentos de DNA em um intervalo de 5 a 6 horas. Os métodos automatizados apresentam capilares muito finos com gel, estes fragmentos se separam muito rápido, produzindo em média meio milhão de pares de bases (pb) em 24 horas. Atualmente estes métodos, são rápidos, simples e seguros,

sem a utilização de compostos radioativos não apresentando riscos à saúde humana (FIETTO; MACIEL, 2015). Segundo Fietto e Maciel (2015), após a desnaturação (PCR) da dupla fita e as marcações de fluorescência de didesoxinucleotídeos são anexados a cadeia sintetizada pela enzima DNA polimerase.

Para a migração dos fragmentos sintetizados, é incorporado um sistema de eletro injeção, neste sentido, os fragmentos ao correrem se encontram a um feixe de raios de laser excitando compostos da molécula (fluoróforos) que faz com que ela emita uma fluorescência característica, expressando um dos quatro tipos de nucleotídeos. O equipamento ABI 377 registra a intensidade do comprimento de onda da fluorescência emitida pela molécula e transmite software gerando cromatogramas, com os picos que são decodificados na sequência de nucleotídeos do fragmento (FIGURA 11).

FIGURA 11 - Sequenciamento de Sanger



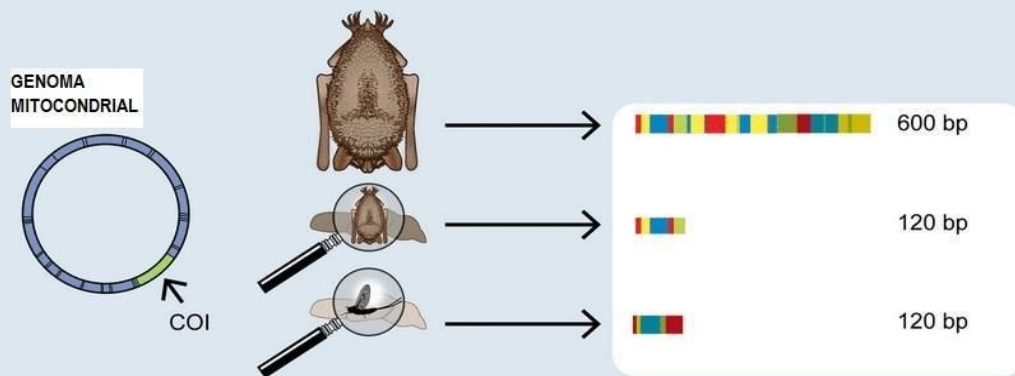
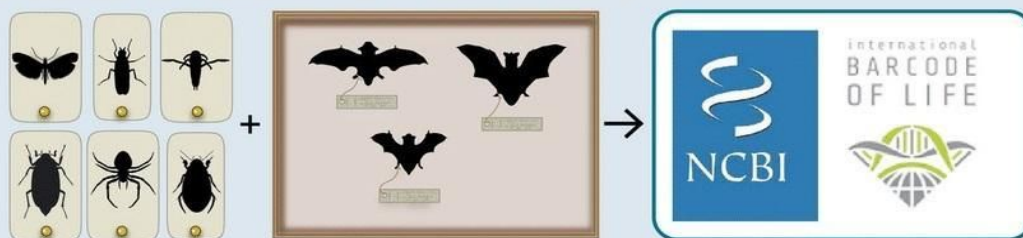
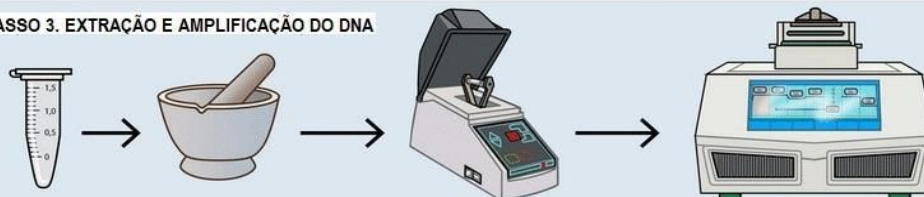
FONTE: (FIETTO; MACIEL, 2015)

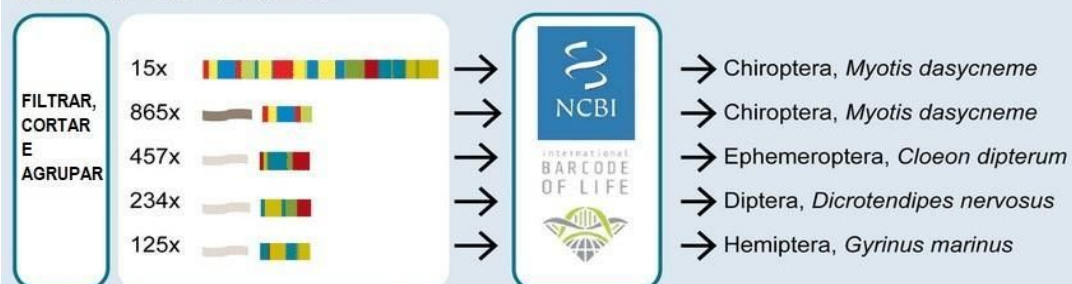
A última etapa consiste na análise dos dados obtidos durante os procedimentos. Os fragmentos de pares de bases obtidos serão filtrados, cortados e

agrupados. Através das análises bioinformática, as bases moleculares serão submetidas a uma plataforma ou banco de dados, como a NCBI. A espécie é identificada e classificada de acordo com sua taxonomia, sendo possível descobrir o nome científico e suas particularidades genômicas já registradas (FIGURA 12).

FIGURA 12 - DNA barcoding



**PASSO 1. SELEÇÃO APROPRIADA DO DNA COM O MARCADOR BARCODE**

**PASSO 2. ENCONTRE O DNA BARCODE NA BASE DE DADOS DE REFERÊNCIA**

**PASSO 3. EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA**

**PASSO 4 E 5. SELECIONE A TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA APROPRIADA**

**PASSO 6. ANÁLISES BIOINFORMÁTICAS**

S. Blankevoort | 2016

FONTE: Adaptado de (HAARSMA, 2016)

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento entomológico objetiva-se no estudo e exploração, principalmente no conhecimento da fauna local. De fato, a entomologia forense é uma área muito ampla, que permite várias formas de aplicações, tanto na área urbana, como médico legal. Desta forma, a identificação de espécies é uma etapa indispensável para a exploração de cenas de crimes, bem como na identificação de cadáveres.

Fatores como os abióticos, que são as influências que os seres vivos recebem em um ecossistema, bem como em aspectos físicos e químicos, influenciam em seu desenvolvimento. Além disso, os fatores bióticos ocasionam efeitos que condicionam a existência de espécies, o que promove a inter-relação entre estas espécies de insetos, e os seres vivos, em locais de morte. As Ordens Diptera e os Coleoptera, apresentadas ao decorrer do trabalho, incluem espécies de maior importância forense, justamente por se adaptarem a diversos habitats e serem cosmopolitas, o que permite sua instalação em povoados humanos.

Uma vez conhecidas as espécies de insetos de maior importância e ocorrência nos locais de crimes, facilita o processo de representação do sistema filogenético destes organismos. A técnica DNA Barcode, surge como uma alternativa para a identificação de espécies, e apresenta vantagens por integrar equipamentos convencionais (PCR, Método de sequenciamento de Sanger), que auxiliam na realização da prática.

Portanto, é evidente a precariedade de estudos acerca de novas tecnologias na entomologia forense, que são empregadas na área criminal, tornando-se necessário o desenvolvimento de técnicas com esta, para a melhor determinação do IPM - Intervalo pós-morte.

## REFERÊNCIAS

ARIAS, Gerald. **Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA: etapas de um grande avanço científico**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. (Documentos Online, v. 44). Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do44.pdf](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do44.pdf). Acesso em: 23 abr. 2019.

AUDINO, Livia Dornelles *et al.* **Identificação dos coleópteros (Insecta: Coleoptera) das regiões de Palmas (município de Bagé) e Santa Barbinha (município de Caçapava do Sul), RS**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2007.

Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/219052/1/DT70.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2019.

BANDARRA, Enio Pedone; SEQUEIRA, Júlio Lopes. Tanatologia: fenômenos cadavéricos transformativos. **Revista de Educação Continuada**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 72-76, 1999. Disponível em:

<https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/3363/2567>.

Acesso em: 18 jul. 2019.

BEUTEL, Rolf G. *et al.* The phylogeny of Hexapoda (Arthropoda) and the evolution of megadiversity. **Proceedings of Arthropodan Embryological Society of Japan, Japão**, p. 1–15 2017. Disponível em: [http://aesj.co-site.jp/Vol51/2017\\_Vol.51\\_1.pdf](http://aesj.co-site.jp/Vol51/2017_Vol.51_1.pdf).

Acesso em: 25 nov. 2019.

BIANCO, Bianca; MONTAGNA, Erik. Avanços e novas tecnologias para o estudo das doenças mitocondriais. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 291-293, abr./jun. 2016. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-45082016000200024&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082016000200024&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 23 out. 2019.

BRAMMER, Sandra Patussi. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. (Documentos online 3). Disponível em:

[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do03\\_4.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03_4.htm). Acesso em: 15 out. 2019.

BRITO, Luciana Gatto *et al.* **Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2008. 25 p. – (Documentos 125). Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/709719/1/doc125dipteros.pdf>.

Acesso em: 06 nov. 2019.

CAMARGO, Amábilio José Aires de *et al.* **Coleções entomológicas: legislação brasileira, coleta, curadoria e taxonomias para as principais ordens**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2015. Disponível em:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122542/1/amabilio-01.pdf>.

Acesso em: 28 out. 2019.

CAMARGO, Cleyton Florencio de; SILVA, Paulo Roberto Queiroz da. Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular. In: **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, Goiânia: Prope, 2011. p. 2 - 18. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2019

CARVALHO, Nígela Rodrigues; CÂNDIDO, Ian Marques; QUEIROZ, Paulo. Potenciais de uso forense do DNA mitocondrial. In: MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU DA PUC DE GOIÁS, 8., Goiânia. **Anais** [...]. Goiânia: Prope, 2013. p. 1-19. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/8mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGICAS/Potenciais%20de%20uso%20forense%20do%20DNA%20mitocondrial.pdf>. Acesso em: 21 out. 2019.

CONHEÇA a técnica de PCR, suas aplicações e princípios. 19 jan. 2018. Disponível em: <https://kasvi.com.br/3-etapas-pcr/>. Acesso em: 7 nov. 2019.

DANTAS FILHO, Venâncio Pereira *et al.* Dos conceitos de morte aos critérios para o diagnóstico de morte encefálica. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 705-710, dez. 1998. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-282X1996000400025&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X1996000400025&lng=pt&nrm=iso). Acesso em: 8 jul. 2019.

FIETTO, Juliana Lopes Rangel; MACIEL, Talles Eduardo Ferreira. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações: sequenciando genomas**. 2015. Disponível em: <http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Seq%C3%AAnciamdo%20genomas.pdf>. Acesso em: 31 out. 2019.

GOMES, Leonardo. **Entomologia forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010.

GONÇALVES, Priscila Fernanda Mussi. **O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia) – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-11122009-112618/publico/Priscia.pdf>. Acesso em: 29 out. 2019.

GOVEIA, Christiane de Oliveira. **Sequenciamento parcial do DNA mitocondrial de *Biomphalaria straminea* e análise comparativa com *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila***. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: [http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D\\_47.pdf](http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_47.pdf). Acesso em: 23 out. 2019.

GRIGULO, Maria Marta. Entomologia forense: os insetos de maior importância para a ciência criminal. In: JORNADA INTEGRADA EM BIOLOGIA, 3., 2016, Joaçaba. **Anais** [...]. Joaçaba: UNOESC, 2016. p. 47-58. Disponível em: <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/jornadaintegradaembilogia/article/view/10213/5574>. Acesso em: 26 jul. 2019.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos: fundamentos da entomologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. Disponível em: <https://bnous.com/Biblioteca/Ci%C3%A2ncias%20Biologicas/Insetos%20-%20Fundamentos%20da%20Entomologia%20-%20P.J.%20Gullan.pdf?>. Acesso em: 6 ago. 2019.

HAARSMA, Anne-Jifke. **DNA barcoding**. Disponível em: [https://www.researchgate.net/figure/Six-main-steps-of-DNA-barcoding-and-metabarcoding\\_fig4\\_308768457](https://www.researchgate.net/figure/Six-main-steps-of-DNA-barcoding-and-metabarcoding_fig4_308768457). Acesso em: 3 abr. 2016.

KARY Banks Mullis biografia. **Fundação Nobel**. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/lecture/>. Acesso em: 7 nov. 2019.

KELLER, Oliver; CAVE, Ronald D. **Dynastes hercules (Linnaeus, 1758) (Insecta: Coleoptera: Scarabaeidae)**. 2006. Disponível em: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEETLES/Dynastes\\_hercules.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEETLES/Dynastes_hercules.htm). Acesso em: 06 nov. 2019.

KOSMANN, Cecília. **Código de barras (DNA Barcode) de dípteros de interesse forense**. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: [https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/17984/Cecilia%20Kosmann\\_Dissertacao.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/17984/Cecilia%20Kosmann_Dissertacao.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 8 out. 2019.

LEITE, Germano Leão Demolin; SÁ, Veríssimo Gibran Mendes de. **Apostila: taxonomia, nomenclatura e identificação de espécies**. Montes Claros: UFMG, 2010.

MAGALHÃES, Cilene Rejane Inácio de et al. Biodiversidade de Coleópteros predadores em áreas de Caatinga (Fazenda Saco, Serra Talhada - PE). **Enciclopédia Biosfera**: Centro Científico Conhecer, Goiânia - Go, v. 11, n. 21, p.2068-2079, 2015. Semestral. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/biologicas/biodiversidade%20de%20coleopteros.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2019.

MAIA, Francisco Sílvio. **Criminalística geral**. 2012. Disponível em: [http://tmp.mpce.mp.br/esmp/apresentacoes/I\\_Curso\\_de\\_Investigacao\\_Criminal\\_Homic%C3%ADdio/02\\_Criminalistica\\_Geral\\_29\\_11\\_2012.pdf](http://tmp.mpce.mp.br/esmp/apresentacoes/I_Curso_de_Investigacao_Criminal_Homic%C3%ADdio/02_Criminalistica_Geral_29_11_2012.pdf). Acesso em: 28 maio 2019.

MESQUITA, Ricardo Alves et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material embebido em parafina para amplificação do DNA genômico por meio da técnica de PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 4, p.

314-318, dez. 2001. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-74912001000400008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-74912001000400008&lng=en&nrm=iso). Acesso em 31 out. 2019.

MOSCAS: ciclo de vida das moscas. Disponível em: <https://termitek.com.br/pragas-urbanas/moscas/>. Acesso em: 6 nov. 2019.

PINHEIRO, Denise da Silva; REIS, Ângela Adamski da Silva; SILVA, Helder Marques Vieira da. Variáveis na estimativa do intervalo pós-morte por métodos de entomologia forense. **Enciclopédia Biosfera**: Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 14, p.1442-1458, 30 jun. 2012. Disponível em: <https://goo.gl/895PsS>. Acesso em: 19 fev. 2019.

PRESTES, Maria Elice Brzezinski. Definição e classificação de “insetos” por René-Antoine Ferchault de Réaumur. **Revista da ABFHiB**: Filosofia e História da Biologia, Campinas, v. 3, p. 263-284, 2008. Disponível em: <http://www.abfhib.org/FHB/FHB-03/FHB-v03-14-Maria-Elice-Prestes.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2019.

PUJOL-LUZ, José Roberto; ARANTES, Luciano Chaves; CONSTANTINO, Reginaldo. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 485-492, dez. 2008. Disponível em: <https://goo.gl/QdyLMc>. Acesso em: 22 fev. 2019.

REIS JUNIOR, Almir Santos; CASTRO, Mariana de Almeida. Das provas periciais no processo penal brasileiro. **Revista Diálogos & Saberes**, Mandaguari, v. 9, n. 1, p. 181-196, 2013. Disponível em: <http://seer.fafiman.br/index.php/dialogosesaberes/article/viewFile/332/323>. Acesso em: 10 ago. 2019.

REIS, Leonardo Mariano; SILVA, Rodrigo Egídio da; RODRIGUES, Francisco Weliton. Influência do DNA mitocondrial no glaucoma primário de ângulo aberto sob a visão da cienciometria. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 5, p. 301-306, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-72802013000500004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72802013000500004&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 24 out. 2019.

ROCHA, Fernanda Maria de Souza; SANTOS, Samuel Barbosa dos. Entomologia forense: quando os insetos são peritos. In: SIMPÓSIO DE TCC, 1.; SEMINÁRIO DE IC, 1., 2016, Guará. **Anais** [...]. Guará: ICESP, 2016. p. 765-772. Disponível em: [http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais\\_simposio/arquivos\\_up/documentos/artigos/7634e670f45ed07cde5e6323c4624a0b.pdf](http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/7634e670f45ed07cde5e6323c4624a0b.pdf). Acesso em: 27 mar. 2019.

RODRÍGUEZ, José Nuñez; SALAZAR, Jonathan Liria; D, Napoleón Tocci. Dípteros de importancia forense en adyacencias de la morgue del Hospital Adolfo Prince Lara, Puerto Cabello, Edo. Carabobo-Venezuela. **Salus**: Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, Valencia, v. 20, n. 1, p. 22-26, abr. 2016. Disponível em:

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-71382016000100005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382016000100005). Acesso em: 1 out. 2019.

SANTANA, Camila Santos de; VILAS BOAS, Daniel Siquieroli. Entomologia forense: insetos auxiliando a lei. **Revista Ceciliana**, Santos, v. 4, n. 2, p. 31-34, dez. 2012. Disponível em: <http://www.unisanta.br/revistaceciliana>. Acesso em: 27 ago. 2019.

SAKUMA, Sérgio Minoru. **Unificação e padronização do calendário tanatológico**. 2015. 66 f. Monografia (Especialização em Odontologia Legal) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2015. Disponível em: [www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?down=000943893](http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?down=000943893). Acesso em: 8 jul. 2019.

SANDOVAL, Rafael Cedro de Souza. **Marcadores moleculares como ferramentas para a identificação de Dípteros de importância forense (Calliphoridae, Muscidae)**. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011. Disponível em <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/25788/Rafael%20C.%20S.%20Sandoval%202011.%20Marcadores%20moleculares%20como%20fer.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 out. 2019.

SCORSATO, Paulo Anderson; TELLES, José Ederaldo Queiroz. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 5, p. 541-548, out. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n5/v47n5a08.pdf>. Acesso em: 30 out. 2019.

SEGATTO, Ana Lucia Anversa *et al.* Marcadores moleculares baseados na análise de sequências: utilização em filogenia e filogeografia. In: TURCHETTO-ZOLET, Andreia Cristina *et al.* (Org.). **Marcadores moleculares na era genômica: metodologia e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 77-93. *E-book*.

STAMATO, Renata Ribeiro; COSTA, Ariadne de Andrade; PRÉVIDE, Márcia Aparecida. Entomofauna de uma Cabeça de Porco (Mammalia, Suidae) Exposta a um Ambiente Rural da Cidade de Bebedouro-SP. **Brazilian Journal Of Forensic Sciences: Medical Law and Bioethics**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 260-272, 2014. Disponível em: <https://www.ipebj.com.br/bjfs/index.php/bjfs/article/view/568/584>. Acesso em: 5 nov. 2019.

THYSSEN, Patricia J. *et al.* The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 777-783, Sep./Oct. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ne/v34n5/a09v34n5.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2019.

TISSIANI, Ana Silvia de Oliveira; VAZ-DE-MELLO, Fernando Zagury; CAMPELO-JÚNIOR, José Holanda. Besouros rola-bostas das pastagens brasileiras

e chave para identificação dos gêneros (Coleoptera: Scarabaeidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 6, p. 401-418, jun. 2017. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/pab/v52n6/pt\\_1678-3921-pab-52-06-00401.pdf](http://www.scielo.br/pdf/pab/v52n6/pt_1678-3921-pab-52-06-00401.pdf). Acesso em: 1 out. 2019.

TURCHETTO, Caroline *et al.* Marcadores genéticos baseados em DNA. *In*: TURCHETTO-ZOLET, Andreia Cristina *et al.* (Org.). **Marcadores moleculares na era genômica: metodologia e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 12-20. *E-book*.