



# Iniciação Científica

## Efeito da contaminação por inseticida tiametoxam sobre o comportamento da mosca de interesse forense *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae)

Letícia da Silva Reginaldo<sup>1</sup>, Antonio Carlos Stradiotto Melo<sup>1</sup>, Michele Castro de Paula<sup>2</sup>, Poliana Galvão dos Santos<sup>3</sup>, Ingrid de Carvalho Guimarães<sup>3</sup> & William Fernando Antonialli-Junior<sup>3</sup>

1. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados – MS, Brasil. 2. Laboratório de Pesquisa em Óleos e Extratos, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Naviraí – MS, Brasil. 3. Laboratório de Ecologia Comportamental, Centro de Estudos em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados – MS, Brasil.

### *Entomology Beginners, vol. 2: e018 (2021)*

**Resumo:** Muitos fatores podem interferir na estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) que é o tempo entre a morte e o achado de corpo, dentre eles substâncias que alteram os padrões de desenvolvimento dos insetos colonizadores de carcaças. Neste estudo testamos a hipótese de que, se um recurso simulando um cadáver estiver contaminado pelo inseticida tiametoxam, moscas varejeiras da espécie *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) irão evitar explorá-lo e consumi-lo. Foram feitos testes de dupla escolha nos quais as moscas podiam optar por recurso contaminado ou não contaminado. Os resultados mostraram que estas moscas varejeiras não evitam carne contaminada com inseticida e, além disso consomem o recurso, contudo, ao fazerem isso executam comportamentos atípicos, como expor o ovipositor, e limpar-se frequentemente. Estes resultados sugerem que caso um cadáver seja contaminado com o inseticida tiametoxam, as moscas irão explorá-lo como recurso, no entanto, como esse produto altera o seu comportamento, seu ciclo de vida possivelmente será alterado, bem como a ordem de chegada das espécies, o que poderá afetar a estimativa do IPM, tendo importante impacto sobre as perícias forenses.

**Palavras-chave:** Entomologia Forense; Entomotoxicologia; Moscas varejeiras.

### Effect of thiamethoxam insecticide contamination on the behavior of the fly of forensic interest *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae)

**Abstract:** Many factors can interfere in the estimation of the Post-Death Interval (PMI), which is the time between death and finding the body, including substances that alter the development patterns of carcass colonizing insects. In this study, we tested the hypothesis that if a resource simulating a cadaver is contaminated by insecticide thiamethoxam, blowflies *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae) will avoid exploring and consuming it. Dual-choice tests were carried out in which flies could opt for a contaminated or non-contaminated resource. The results show that these blowflies do not avoid insecticide-contaminated meat and, in addition, consume the resource, however, in doing so, they performed atypical behavior, such as exposing the ovipositor and cleaning themselves frequently. These results suggest that if a cadaver is contaminated with the insecticide thiamethoxam, flies will exploit it as a resource, however, as this compound changes its behavior, its life cycle will possibly be changed, as well as the order of arrival of the species, this can affect the estimate of the IPM having a major impact on forensic expertise.

**Keywords:** Forensic Entomology; Entomotoxicology; Blow fly.

A Entomologia Forense é a ciência que utiliza insetos presentes em cenas de crime para auxiliar em investigações criminais (OLIVEIRA-COSTA, 2013). A ocorrência natural desses insetos em carcaças fornece evidências que permitem estimar o intervalo pós-morte (IPM), seja pela idade dos insetos necrófagos que chegam primeiro no cadáver e são usados para estimar o IPM mínimo, ou pela composição de espécies encontradas no cadáver usadas para estimar o IPM máximo. A ordem Diptera é considerada a de maior importância na Entomologia Forense, isso porque as moscas são as primeiras e mais frequentes colonizadoras de cadáveres, sobretudo as moscas varejeiras da família Calliphoridae (AMENDT et al., 2010). Neste contexto, as moscas também podem fornecer evidências sobre o local onde

a morte ocorreu, se houve realocação do cadáver, se o indivíduo usou ou foi contaminado por algum tipo de substância antes ou mesmo depois da morte, e qual tipo de substância foi utilizada (INTRONA et al., 2001).

Várias substâncias podem influenciar no desenvolvimento dos insetos que colonizam carcaças, podendo retardá-lo ou acelerá-lo e isso pode causar interferências na estimativa do IPM (AMENDT et al., 2010), uma vez que a contaminação da carcaça com substâncias tóxicas pode levar a uma colonização tardia ou, em alguns casos, pode impedir que ocorra a colonização (GOFF e LORD, 1994; OLIVEIRA-COSTA, 2013).

Apesar de existirem estudos sobre o efeito de substâncias

#### Editado por:

Mateus Aparecido Clemente

#### Histórico Editorial:

Recebido em: 20.07.2021

Aceito em: 22.09.2021

Publicado em: 18.10.2021

#### ✉ Autor Correspondente:

Poliana Galvão Santos

[polianagalvao.santos@gmail.com](mailto:polianagalvao.santos@gmail.com)

#### Agência(s) de Fomentos:

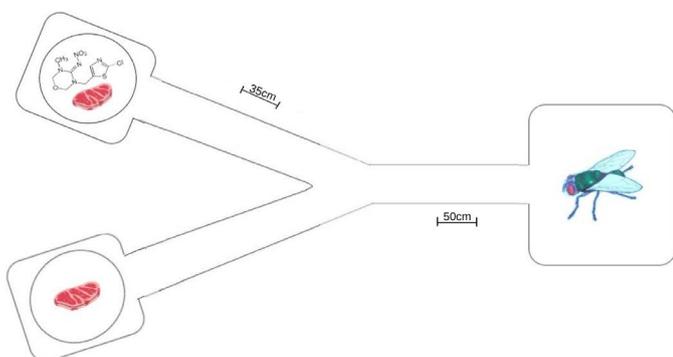
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul

tóxicas no desenvolvimento de espécies necrófagas (GALIL et al., 2021), até o momento não há trabalhos que já tenham avaliado se moscas podem detectar e/ou evitar ovipositar em uma carcaça contaminada. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que se um substrato, como por exemplo um cadáver, estiver contaminado por inseticida, moscas varejeiras [*Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae)] irão evitar explorá-lo e consumi-lo.

Foram coletados indivíduos adultos selvagens de *C. megacephala*, no município de Dourados, Mato Grosso do Sul (22°11' S, 54°55' O). Para atrair os dípteros foi usada carne bovina crua em estado de putrefação avançada (três dias) e, para coletá-los, foi utilizada uma rede entomológica. As moscas foram colocadas em gaiolas de 40 cm<sup>3</sup> e, posteriormente, conduzidas ao laboratório para a triagem e identificação utilizando a chave de Carvalho e Mello-Patiu (2008). As moscas identificadas foram acondicionadas em outra gaiola de criação (40 cm<sup>3</sup>) e mantidas no laboratório em câmara incubadora sob temperatura controlada (25 °C ± 1) e em ciclo claro-escuro de 12:12 h, alimentadas com açúcar e água *ad libitum*.

Uma porção de carne moída (50 g) foi oferecida às fêmeas para estimular a oviposição. Os ovos foram retirados com auxílio de um pincel, pesados e transferidos para recipientes de plástico (500 mL) na proporção de 0,005 g de ovos para 200 g de carne, seguindo o método de Paula et al. (2016). Após a emergência dos adultos (primeira geração), foi oferecido fígado bovino cru durante cinco dias, para promover a maturação dos ovários. Após esse período foi oferecido apenas água e açúcar *ad libitum*. Essas moscas constituíram a criação estoque. No 11º dia as fêmeas estavam com os ovários maturados, haviam copulado e estavam aptas a serem submetidas aos experimentos.

Foram selecionadas aleatoriamente 30 fêmeas da criação estoque, todas com a mesma idade e sem experiência prévia de oviposição, liberadas em uma gaiola de 20 cm<sup>3</sup>, que estava conectada a um tubo de vidro em formato de Y (Y-Maze) (Figura 1). Os tubos tinham 4 cm de diâmetro, o tubo central (braço maior) tinha 50 cm de comprimento e cada braço do Y, 35 cm de comprimento. Cada braço do Y estava conectado a um recipiente plástico de 500 mL, onde foi oferecido, em uma placa de Petri, 100 g de carne moída fresca. Em um dos braços a carne estava contaminada com tiametoxam e no outro não (Figura 1). Este é um dos inseticidas mais utilizados em monoculturas pelo seu amplo espectro de ação. A carne foi contaminada com 3,3 mL do inseticida ACTARA® 250WG, contendo 25% de tiametoxam. A dose indicada no rótulo do inseticida para monocultura é de 1000 g ha<sup>-1</sup>, sendo assim, foi possível determinar a dose de ACTARA® para cada grama de carne em ng g<sup>-1</sup>, levando em consideração a DL50 159 x 10<sup>-9</sup> ng para a fase de ovo desta espécie, determinada em testes prévios.



**Figura 1.** Esquema experimental onde as moscas eram atraídas através de um braço em formato de Y, onde o recurso contaminado (carne bovina) era oferecido em um dos lados, e o recurso não contaminado no outro lado.

No recipiente conectado ao braço maior do Y era liberado uma mosca por vez que, ao chegar no ponto onde os braços menores

se conectam, eram atraídas para um ou outro braço. Os braços do Y foram girados estocasticamente em cada experimento para evitar o viés do dispositivo.

Para avaliar se a contaminação pelo inseticida pode afetar a decisão das moscas, foram realizados três testes. No primeiro experimento (E1), em um dos braços foi oferecida a carne (100 g) contaminada com 3,3 mL da solução com inseticida, e no outro a mesma quantidade de carne, não contaminada. No segundo experimento (E2), foi oferecido no final de um dos braços do Y a carne contaminada, e no outro a mesma quantidade de carne na qual foi aplicada 3,3 mL de água destilada (grupo controle). No terceiro (E3) foi testado se algo no próprio trajeto do Y poderia influenciar a decisão das moscas. Para isto, foi oferecido ao final dos dois braços a mesma quantidade de carne sem qualquer tipo de contaminação. Foram testadas 30 moscas, 10 em cada uma das três situações.

Quando a mosca concluiu sua decisão ela era retirada do circuito o qual era limpo com papel filtro, álcool e água destilada. Os recipientes onde era oferecida a carne eram trocados por novos. Todo o experimento foi realizado a temperatura constante de 25 °C. Todos os comportamentos executados pelas moscas nos experimentos foram anotados.

Para avaliar se houve diferença significativa entre o número de vezes em que as moscas optaram por um dos braços do Y com qualquer uma das possibilidades que foram oferecidas, foi aplicado um teste de sinais, com nível de significância de 0,05%. Também foi aplicado um Teste t comparando os tempos que as moscas levaram para percorrer todo o trajeto até o final do braço onde estava o tipo de recurso que as atraíram.

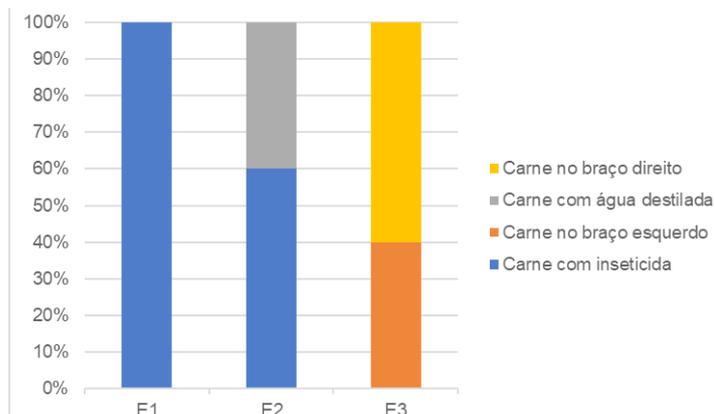
No experimento E1, 100% das moscas optaram pela carne contaminada e levaram em média 9,9 ± 7,30 segundos para chegar ao substrato contaminado. No E2, 60% das moscas optaram pelo braço contendo carne contaminada e 40% optaram pelo braço com carne e água destilada (Figura 2), não havendo diferença significativa entre estes valores pelo teste de sinais ( $p = 0,38$ ). O tempo médio que as moscas levaram para chegar ao substrato contaminado foi de 8,16 ± 2,78s e no substrato com água destilada foi de 7,5 ± 12,76s, não havendo diferença significativa entre estes tempos pelo Teste t ( $p = 0,06$ ).

No experimento E3 (em ambos os braços as carnes não foram contaminadas), o teste de sinais evidenciou que não houve diferença significativa na atratividade entre os braços do Y ( $p = 0,45$ ), indicando que a estrutura por si só não causa viés ao experimento, sendo que 60% das moscas optaram pelo braço direito e 40% optaram pelo braço esquerdo (Figura 2). O tempo médio que as moscas levaram para chegar ao substrato no final do braço direito do Y foi de 13,3 ± 10,14s e para chegar no final do braço esquerdo foi de 10,75 ± 4,5s, não havendo diferença significativa entre estes tempos pelo Teste t ( $p = 0,23$ ), portanto, isso sugere que qualquer fator da própria estrutura do Y não interfere nos resultados dos testes experimentais.

Durante o experimento E1 todas as moscas foram atraídas pela carne contaminada (Figura 2). Portanto, estes resultados sugerem que as moscas podem não ter a capacidade de detectar este tipo de inseticida. Easton e Goulson (2013) demonstraram que o inseticida neonicotinoide imidacloprida repele algumas moscas e besouros polinizadores, no entanto, ressalta que as concentrações irão influenciar estas respostas. Neste trabalho os autores utilizaram concentração maior (0,01 mg), quando comparada à concentração utilizada neste experimento. Mesmo considerando a capacidade olfativa das moscas, concentrações muito baixas podem não ser detectadas. Abelhas, em testes similares com concentrações muito baixas, também consumiram recurso contaminado por tiametoxam (KESSLER et al., 2015), indicando que elas não são capazes de perceber a presença do produto, e por isso não são repelidas por ele.

Em nosso estudo, apesar de 100% dos indivíduos optarem

pela carne contaminada (E1), somente 30% se alimentaram do substrato. Tooming et al. (2017) avaliaram que os besouros quando expostos a diferentes concentrações de tiametoxam reduzem a frequência de sua alimentação, ou seja, o contato com o inseticida já pode ser o suficiente pra alterar os atos comportamentais, o que também foi observado em abelhas por Kessler et al. (2015).



**Figura 2.** Atratividade de moscas *Chrysomya megacephala*. E1= carne contaminada com tiametoxam e não contaminada; E2= carne contaminada com tiametoxam e carne com água destilada; E3= carnes sem inseticida e sem água destilada.

Durante estes testes, os comportamentos observados foram: andar dentro do Y, ficar imóvel, voar no pote, se limpar ao ter contato com a carne, se alimentar, excretar substância do aparelho bucal, além de expor e encolher o ovipositor repetidamente, sem ovipositar. O comportamento mais frequente nos experimentos em que havia carne contaminada foi o de se limpar. Das 82 vezes em que as moscas foram observadas se limpando, 79 foram quando interagiram com o recurso contaminado.

Este comportamento sugere tentativa de retirar o substrato do corpo. De fato, a autolimpeza por moscas é feita com maior frequência quando há contato com bactérias e partículas estranhas aderidas a seu corpo, sendo um comportamento comum em dípteros para manter asas e apêndices livres de detritos, facilitando um melhor movimento e recepção sensorial (JACQUES et al., 2017). O comportamento de expor o ovipositor pode ser influência do neonicotinoide, que pode provocar efeitos neurotóxicos podendo afetar o sistema nervoso do inseto (TOSI e NIEH, 2017).

Durante os experimentos (E1 e E2) outro comportamento observado foi de moscas voando com maior frequência no recipiente onde estava a carne contaminada. Isso pode estar relacionado com o fato de que essas moscas tiveram contato com o inseticida e se tornaram hiperativas. De fato, a exposição direta ao tiametoxam pode causar hiperatividade locomotora de curto prazo nos insetos, o que pode levar à morte depois de algumas horas, e a longo tempo dependendo da concentração ministrada, o inseto também pode apresentar hipoatividade locomotora (TOOMING et al., 2017).

No E2, quando as moscas tinham opção entre a carne contaminada e carne não contaminada com água destilada, um número maior optou pela carne contaminada (60%), destes 40% se alimentaram do recurso. Por outro lado, dos 40% que optaram pela carne não contaminada (água destilada), 20% se alimentaram. Aparentemente a atração pelo braço contaminado no experimento E1, bem como a atração pelo braço com água destilada no E2, pode estar mais relacionada com a umidade do que pelo inseticida em si. É fato que as moscas preferem locais úmidos para a oviposição, como orifícios naturais, desde modo, a umidade no recurso pode ser um fator determinante na hora da escolha de um substrato para postura de ovos e desenvolvimento de seus imaturos (OLIVEIRA-COSTA, 2013). Além disso, sugere-se que a carne

úmida, tanto com o contaminante quanto sem, acelere a ação de bactérias, o que pode exalar um cheiro mais intenso que atraia as moscas até a carne.

No experimento E3, 80% das moscas se alimentaram da carne, sugerindo que o contaminante nos outros dois experimentos reduz o interesse das moscas logo que entram em contato com a carne contaminada com inseticida, ou ainda, pode ser um reflexo da ação do inseticida no sistema nervoso das moscas, como observado em abelhas (KESSLER et al., 2015). Além disso, durante esse experimento as moscas se limpavam com menos frequência do que nos outros dois, o que corrobora o fato de que moscas que entram em contato com o inseticida tendem a retirá-lo de seus corpos.

De forma geral, os resultados mostram que o inseticida nesta concentração possivelmente não é detectado por moscas varejeiras, mas o simples contato altera o padrão de comportamento, inibindo muitas vezes a frequência de alimentação e, quando consumida a carne contaminada com o inseticida, altera diversos atos comportamentais, como extensão frequente do ovipositor e autolimpeza. Os dados do presente estudo corroboram os de Kessler et al. (2015), que encontraram comportamento similar em abelhas, essas não foram capazes de detectar a presença de neonicotinoídeos, e ao se alimentarem do inseticida houve, posteriormente, uma diminuição na frequência de alimentação. Da mesma forma, aranhas quando expostas a recursos contaminados em altas concentrações evitaram a substância, no entanto, quando expostas a baixas concentrações se alimentam deste recurso, indicando que esses artrópodes avaliados não conseguem detectá-los (EASTON e GOULSON, 2013).

A hipótese do estudo não foi confirmada, pois as moscas varejeiras de importância forense *C. megacephala* não evitaram carne contaminada com inseticida. Contudo, ao entrar em contato com o recurso contaminado as moscas expressaram comportamentos atípicos, o que evidencia que o inseticida afeta o padrão de comportamento das moscas ao explorar o recurso. Esses resultados sugerem que, caso um cadáver seja contaminado com produto similar em baixas concentrações, as moscas vão explorá-lo como recurso. Entretanto, seu ciclo possivelmente será alterado, bem como a ordem de chegada das espécies, impactando a sucessão ecológica, o que comprometerá a estimativa do IPM, tanto mínima quanto máxima, tendo importante impacto sobre as perícias forenses. Vale ressaltar que nos experimentos as concentrações testadas foram baixas, sendo necessários estudos futuros para investigar mais detalhadamente os efeitos de diferentes concentrações de inseticidas em espécies de moscas de importância forense.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) por concessão de bolsa de pesquisa a MCP (processo número: 71/700.088/2020). E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por concessão de bolsa de pesquisa a WFAJ (Processo número: 308182/2019-7), e PGS (processo número: 380795/2020-5).

## Referências

AMENDT, J.; GOFF, M. L.; CAMPOBASSO, C. P.; GRASSBERGER, M. (Eds.) **Current concepts in Forensic Entomology**. 1ª ed. Dordrecht: Springer, 2010. 376p.

CARVALHO, J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 390-406, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0085-56262008000300012>

- EASTON, A. H.; GOULSON, D. The neonicotinoid insecticide Imidacloprid repels pollinating flies and beetles at field-realistic concentrations. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54819, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054819>
- GALIL, F. M. A. A.; ZAMBARE, S. P.; MEKHLAFI, F. A. A.; KERIDIS, L. A. A. Effect of dimethoate on the developmental rate of forensic importance Calliphoridae flies. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 1267-1271, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.022>
- GOFF, M. L.; LORD, W. D. Entomotoxicology. A new area for forensic investigation. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 15, n. 1, p. 51-57, 1994.
- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L. Entomotoxicology. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1, p. 42-47, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00418-2](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00418-2)
- JACQUES, B. J.; BOURRET, T. J.; SHAFFER, J. J. Role of fly cleaning behavior on carriage of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 6, p. 1712-1717, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjx124>
- KESSLER, S. C.; TIEDEKEN, E. J.; SIMCOCK, K. L.; DERVEAU, S.; MITCHELL, J.; SOFTLEY, S.; RADCLIFFE, A.; STOUT, J. C.; WRIGHT, G. A. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, v. 521, p. 74-76, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature17177>
- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios**. 3ª ed. Campinas: Millennium, 2013. 520p.
- PAULA, M. C.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; MENDONÇA, A.; MICHELUTTI, K. B.; EULALIO, A. D. M. M.; CARDOSO, C. A. L.; LIMA, T. de; ZUBEN, C. J. V. Chemotaxonomic profile and intraspecific variation in the blow fly of forensic interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 1, p. 14-23, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/jme/tjw142>
- TOOMING, E.; MERIVEE, E.; MUST, A.; MERIVEE, M. I.; SIBUR, I.; NURME, K.; WILLIAMS, I. H. Behavioural effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the predatory insect *Platynus assimilis*. **Ecotoxicology**, v. 26, p. 902-913, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1820-5>
- TOSI, S.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. **Scientific Reports**, v. 7, p. 15132, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15308-6>