



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Júlia da Costa Hillmann

**Detecção de DNA humano em mosquitos (Diptera: Culicidae) após alimentação
sanguínea**

Florianópolis

2025

Júlia da Costa Hillmann

**Detecção de DNA humano em mosquitos (Diptera: Culicidae) após alimentação
sanguínea**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Carlos José de Carvalho Pinto, Dr.
Coorientadora: Prof^ª. Norma Machado da Silva, Dr^ª.

Florianópolis

2025

Hillmann, Júlia da Costa

Detecção de DNA humano em mosquitos (Diptera: Culicidae) após alimentação sanguínea / Júlia da Costa Hillmann ; orientador, Carlos José de Carvalho Pinto, coorientadora, Norma Machado da Silva, 2025.

44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Entomologia Forense. I. Pinto, Carlos José de Carvalho. II. Silva, Norma Machado da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Júlia da Costa Hillmann

**Detecção de DNA humano em mosquitos (Diptera: Culicidae) após alimentação
sanguínea**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 28 de novembro de 2025.

Profª. Daniela Cristina de Toni, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca examinadora

Prof. Carlos José de Carvalho Pinto, Dr.
Orientador

Profª. Luísa Damazio Rona Pitaluga, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Thiago Jacomasso, Dr.
Polícia Científica de Santa Catarina

Mariana Maraschin da Rocha, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2025.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Beno e Patrícia, por todo o incentivo e apoio ao longo desses anos de faculdade. Sou imensamente grata por sempre estarem ao meu lado, inclusive nos momentos mais difíceis, e por se dedicarem tanto para que eu tivesse uma boa educação. À minha irmã, Gabrielle, obrigada por me ouvir falar incansavelmente sobre tudo o que eu aprendia e por compartilhar comigo tantos momentos dessa jornada. Eu amo vocês!

Ao meu namorado, André Luiz, deixo meu carinho e gratidão pela paciência, compreensão e companheirismo durante essa reta final. Obrigada por atender todos os meus telefonemas desesperados sobre os meus experimentos, por me acalmar e me incentivar a seguir confiante no meu caminho como bióloga. Agradeço também por ter lido tantas vezes meu TCC, por acreditar em mim e apoiar meus estudos. Sua presença tornou essa jornada mais leve. Eu te amo infinitamente!

Agradeço especialmente ao meu orientador, Carlos Pinto, pela orientação dedicada e constante. Agradeço por acreditar no meu potencial e por se empenhar para que esta pesquisa se concretizasse. Foi uma grande oportunidade concluir o curso com um trabalho com o qual tanto me identifico. Também agradeço por ter proporcionado experiências tão significativas ao longo do meu tempo no laboratório, como a participação em congressos que marcaram minha trajetória acadêmica.

À minha coorientadora, Norma Machado, agradeço pela paciência em ensinar e esclarecer toda a parte molecular do trabalho. Reconheço e admiro sua dedicação, o apoio constante nas PCRs e eletroforeses, e a disponibilidade até mesmo aos sábados para me auxiliar no laboratório. Obrigada por ter sido uma verdadeira parceira e por sempre encontrar alternativas que tornaram a pesquisa possível. Você é uma professora inspiradora!

Agradeço à Mariana Maraschin e à Marianna Rezende por me acolherem tão bem no Laboratório de Imunologia (LIDI) e pela paciência em me ensinar todo o processo de criação de *Aedes aegypti*. Sou muito grata por me permitirem utilizar o insetário e por toda ajuda durante essa etapa. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento do meu TCC.

Às minhas grandes amigas, Larissa Boff e Natália Borges, agradeço pela parceria ao longo de toda a graduação, pelas conversas, pelo apoio e pela presença

constante, mesmo à distância. Sou imensamente grata por ouvirem meus áudios intermináveis e pelos conselhos sempre certos. Admiro e me inspiro em vocês!

À minha amiga Lívia Caroline, obrigada por compartilhar comigo o entusiasmo de aprender algo novo, por estar presente em toda a minha trajetória na biologia e por dividir tantos cafés nos quais desabafei sobre o TCC. Agradeço pelo incentivo, pelas risadas e pela leveza que trouxe a essa caminhada.

Às queridas Stefana Baumgarten e Fernanda Peverari, minhas primeiras amigas na UFSC, agradeço por todos os momentos especiais que vivemos ao longo da graduação. Ter vocês por perto fez toda a diferença.

Sou também muito grata à amiga Paola Neves pela parceria nas aulas e trabalhos e por todas as conversas e momentos de descontração. À Manuela Veiga, agradeço por acompanhar cada etapa do meu TCC, pelas dicas valiosas, por sempre me ouvir e pela presença até mesmo nos experimentos de sexta-feira à noite. Seu apoio foi essencial nesse momento tão importante para mim.

À minha parceira de laboratório, Natália Dantas, agradeço pelos almoços, trocas de conhecimento e pelos congressos que vivenciamos juntas. Levarei comigo todas essas boas lembranças.

Aos peritos do Setor de Vestígios Biológicos — Thiago Jacomasso, Rodrigo Hipólito, Vinícius Bica e Diego Cabral — e à agente Priscilla Nunes, da Polícia Científica de Santa Catarina, agradeço por me acolherem tão bem como estagiária e por todos os ensinamentos que levarei para o resto da vida. Admiro cada um de vocês. Vocês são divos!

Agradeço também ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e ao corpo técnico pelo suporte na parte molecular deste trabalho.

Sou igualmente grata ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) e à Professora Patrícia Quaresma, do Laboratório de Protozoologia, pela disponibilização das alíquotas dos *primers* utilizados nos experimentos.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por me proporcionar ensino gratuito e de qualidade no curso que tanto amo!

"Todo contato deixa uma marca" - Edmond Locard

RESUMO

Os mosquitos podem ser utilizados na entomologia forense por armazenar DNA humano em seu trato gastrointestinal após a hematofagia, tornando-se uma importante ferramenta na obtenção de perfis genéticos, sendo possível a identificação de uma vítima, de um possível criminoso e/ou a exclusão de um suspeito, o que pode auxiliar em investigações criminais. O objetivo deste trabalho foi determinar o intervalo máximo de tempo em que o DNA humano permanece detectável no aparelho digestivo de mosquitos e o número mínimo de indivíduos necessário para a recuperação eficaz desse material genético. Para isso, analisou-se o conteúdo genético presente no trato gastrointestinal de 72 fêmeas de *Aedes aegypti* após 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h e 96h do repasto sanguíneo, em *pools* de 1, 3 e 5 indivíduos em cada tempo de coleta. O DNA foi extraído utilizando o Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Cellco®) e amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) com o uso de um marcador mitocondrial (fragmento do gene citocromo B). A visualização dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose, com registro das bandas sob transiluminador de luz UV. Os resultados demonstraram a possibilidade da recuperação de DNA humano em *A. aegypti* com amplificação bem-sucedida nos tempos de 0h, 12h, 24h, 36h e 48h. Não houve detecção nos tempos de 60h e 72h. Observou-se ainda amplificação positiva em um *pool* de 3 mosquitos no tempo de 96h, indicando que, embora menos provável, ainda é possível recuperar moléculas de DNA mitocondrial nesse intervalo de digestão sanguínea. Esses resultados reforçam o potencial forense dos mosquitos como fontes complementares de evidências biológicas em investigações criminais.

Palavras-chave: DNA humano; entomologia forense; mosquito.

ABSTRACT

Mosquitoes can be used in forensic entomology because they store human DNA in their gastrointestinal tract after hematophagy, becoming an important tool for obtaining genetic profiles and enabling the identification of a victim, a possible perpetrator, and/or the exclusion of a suspect, thereby assisting criminal investigations. The aim of this study was to determine the maximum time interval during which human DNA remains detectable in the digestive tract of mosquitoes and the minimum number of individuals required for the efficient recovery of this genetic material. For this purpose, the genetic content present in the gastrointestinal tract of 72 *Aedes aegypti* females was analyzed at 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, and 96h after the blood meal, in pools of 1, 3, and 5 individuals at each collection time. DNA was extracted using the Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Cellco®) and amplified by polymerase chain reaction (PCR) with a mitochondrial marker (fragment of the cytochrome B gene). Visualization of the PCR products was performed by agarose gel electrophoresis, with band recording under a UV transilluminator. The results demonstrated the possibility of recovering human DNA from *A. aegypti*, with successful amplification observed at 0h, 12h, 24h, 36h, and 48h, while no amplification was detected at 60h and 72h. A positive amplification was also observed in one pool of three mosquitoes at 96h, indicating that, although less likely, it is still possible to recover amplifiable mitochondrial DNA molecules at this stage of blood digestion. These findings reinforce the forensic potential of mosquitoes as complementary sources of biological evidence in criminal investigations.

Keywords: forensic entomology; human DNA; mosquito.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 2 - Fêmea de <i>A. aegypti</i> ingurgitada	19
Figura 3 - Eclosão dos ovos da cepa <i>Red Eyes</i>	23
Figura 4 - Larvas e pupas de <i>A. aegypti</i>	24
Figura 5 - Gaiola de criação dos mosquitos	24
Figura 6 - Troca de solução com sacarose dentro da gaiola de criação	25
Figura 7 - Alimentação artificial dos mosquitos com sangue.....	26
Figura 8 - Sugador manual	27
Figura 9 - Separação das fêmeas ingurgitadas.....	27
Figura 10 - Copo de papel utilizado para acondicionamento das fêmeas de <i>A. aegypti</i> após o repasto sanguíneo	28
Figura 11 - Fêmeas de <i>A. aegypti</i> separadas em <i>pools</i> de 1, 3 e 5 indivíduos	28
Figura 12 - Gel de agarose mostrando a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial citocromo B em amostras com diferentes quantidades de fêmeas alimentadas com sangue, e coletadas em diferentes intervalos de tempo após o repasto sanguíneo (de 0 a 96h)	33
Figura 13 - Organização do genoma mitocondrial humano.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Eficiência na amplificação do gene citocromo B em diferentes tempos e quantidades de fêmeas ingurgitadas de *Aedes aegypti*37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do fragmento do gene citocromo B	30
Tabela 2 - Concentração dos componentes do mix de PCR.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEPSH Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

DNA Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs Desoxirribonucleotídeos fosfatados (A,T,C,G)

pb Pares de base

PCR Reação em cadeia da polimerase

Taq Taq DNA polimerase

U Unidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	INSETOS	16
1.2	ENTOMOLOGIA FORENSE	19
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS	23
3.2	REPASTO SANGUÍNEO	25
3.3	COLETA E FIXAÇÃO DOS MOSQUITOS	28
3.4	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	29
3.5	PCR E ELETROFORESE	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	38
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 INSETOS

Dentro do Reino Animalia, o filo Arthropoda representa 81,5% de todas as espécies vivas descritas (Brusca; Moore; Shuster, 2018). O corpo dos artrópodes é revestido por placas quitinosas e a presença de membranas intersegmentares e articulações conferem flexibilidade ao corpo (Tavares, 2017).

Entre os artrópodes, os insetos, agrupados na classe Insecta, representam cerca de 70% da diversidade de espécies do planeta (Instituto Butantan, 2024b; Zhang, 2011), sendo o grupo de animais mais abundante. Seu grande sucesso evolutivo está relacionado a fatores como seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto e grande capacidade de dispersão propiciada pela presença de asas (Gomes *et al.*, 2010; Gullan; Cranston, 2017), o que possibilitou sua colonização nos mais variados tipos de *habitats*, desde o ambiente terrestre até o aquático.

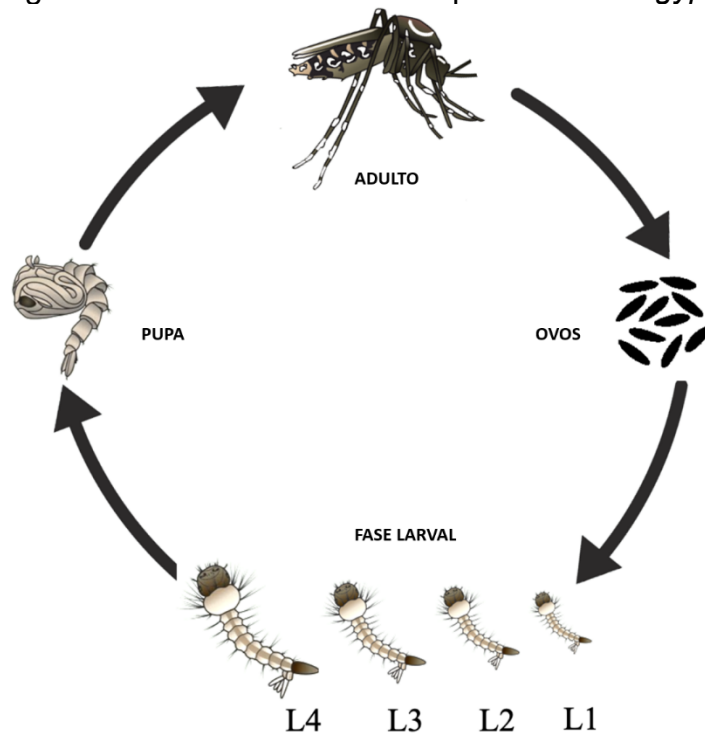
O corpo dos insetos é composto por cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça se encontram os órgãos sensoriais e peças bucais, como mandíbulas, maxilas e lábio, as quais são usadas para alimentação (Almeida; Melo, 2024). No tórax estão inseridas as pernas e asas (quando presentes) e o abdômen abriga os órgãos digestivos e reprodutivos (Brusca; Moore; Shuster, 2018, Consoli; Oliveira, 1998).

Dentre os insetos mais relacionados ao homem e, portanto, com maior importância médica e econômica, destaca-se a ordem Diptera, representada por moscas e mosquitos, cujas espécies têm relevância médica e veterinária como vetores de doenças; de interesse agrícola, sendo pragas ou polinizadores de plantas; e ambiental, ao atuarem como decompositores (Botteon, 2025; Schneider; Cella, 2010). O desenvolvimento desses insetos é do tipo holometábolo, ou seja, o inseto passa por uma metamorfose com quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto (Botteon, 2025). Os dípteros adultos possuem tórax dividido em pró, meso e metatórax, sendo o mesotórax mais desenvolvido pois abriga os músculos do voo, enquanto o metatórax abriga o halter, estrutura que garante equilíbrio durante o voo. Outra característica marcante são os olhos compostos e a probóscide, órgão de sucção que pode ser do tipo sugador-lambedor ou sugador-pungitivo, este último adaptado para sucção encontrado em grupos como os mosquitos (Carvalho *et al.*, 2024; Gullan; Cranston, 2017).

Os mosquitos, também conhecidos como pernilongos, muriçocas e carapanãs, pertencem a família Culicidae e são insetos de corpo delgado e pernas longas, variando de 3 a 9 mm de comprimento, com probóscide fina e mais longa que a cabeça (Carvalho *et al.*, 2024; Lozovei, 2011). Esses insetos são cosmopolitas, estando presentes em diferentes *habitats* florestais, rurais e urbanos (Lozovei, 2011), sendo, no Brasil, descritas 545 espécies em 23 gêneros (Hutchings *et al.*, 2025). Uma das espécies mais relevantes do ponto de vista médico é o *Aedes aegypti*, por ser vetor de agentes infecciosos que causam doenças em humanos, como dengue, ciclo urbano da febre amarela, chikungunya e Zika (Ahebwa *et al.*, 2023).

Além de seu papel importante como vetor de várias doenças infecciosas, uma característica curiosa sobre o *A. aegypti* é que sua dispersão acompanha a migração dos seres humanos, facilitada pela dispersão passiva por meio de transportes aéreos, marítimos e terrestres (Instituto Butantan, 2024a; Lozovei, 2011). Considerada uma espécie sinantrópica, esta espécie se reproduz em ambientes urbanos populosos aproveitando recipientes artificiais como pneus, garrafas, copos plásticos, caixas d'água e similares, que mantenham um mínimo de água para deposição de seus ovos (Braga; Vale, 2007; Consoli; Oliveira, 1998; Instituto Butantan, 2024a). Quando encontram um ambiente propício, as fêmeas depositam seus ovos nas superfícies de recipientes inundáveis, os quais ficam aderidos nas paredes úmidas. Uma vez em contato com a água, as larvas eclodem e nadam ativamente, respirando através de um sifão (Eiras, 2005). Após se desenvolverem, transformam-se em pupas e, em poucos dias, emerge o adulto, o qual é caracterizado pela coloração escura e uma mancha no tórax que se assemelha a imagem de uma lira, além das pernas mais longas traseiras serem listradas em preto e branco (Benchimol; Sá, 2006; Eiras, 2005). Este ciclo é muito rápido (Figura 1), ocorrendo em torno de 8 a 10 dias (Byerly, 2024) e os adultos vivem cerca de 30 dias (Lozovei, 2011), permanecendo próximos ao local onde nasceram, geralmente não se afastando mais de 800 metros de seu criadouro (Honório *et al.*, 2003).

Figura 1 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de Hossain *et al.* (2022).

Tanto os machos quanto as fêmeas de mosquitos se alimentam de néctar e outros líquidos vegetais, entretanto somente as fêmeas são hematófagas e necessitam obter o ferro contido no sangue e aminoácidos derivados das proteínas sanguíneas para o amadurecimento de seus ovos (Carvalho *et al.*, 2024; Eiras, 2005). As fêmeas são atraídas pelos humanos por uma combinação de estímulos que incluem o odor e a temperatura corporal, o gás carbônico emitido durante a respiração e a visão para localizar partes do corpo humano que não estejam em movimento (Eiras, 2005). Seus hábitos hematófagos são predominantemente crepusculares, entretanto, as picadas podem ocorrer a qualquer momento do dia (Consoli; Oliveira, 1998). De acordo com o Instituto Butantan (2024a), ao encontrar uma área do corpo humano para picar, a fêmea rapidamente inicia o processo de alimentação, durante o qual seu abdômen se expande visivelmente. À medida que o sangue é ingerido, a coloração avermelhada torna-se cada vez mais evidente, indicando o acúmulo de sangue em seu corpo (Figura 2). Após a alimentação, os mosquitos permanecem próximo ao local onde fizeram a hematofagia para se alimentarem novamente após digerirem o sangue (Ahmed *et al.*, 2023).

Figura 2 - Fêmea de *A. aegypti* ingurgitada



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2006). Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=9260>. Acesso em: 15 out. 2025.

1.2 ENTOMOLOGIA FORENSE

A entomologia é o estudo científico dos insetos e os entomólogos são os responsáveis por esses estudos (Gomes *et al.*, 2010; Marcondes, 2011). As pesquisas desenvolvidas por esses profissionais abrangem diversas áreas dentro das Ciências Biológicas, incluindo evolução, ecologia, comportamento, anatomia, fisiologia e genética (Gullan; Cranston, 2017). Como os insetos estão presentes tanto na natureza quanto em ambientes antrópicos, suas interações com outras formas de vida podem ser benéficas ou danosas, sendo essas relações o principal foco da entomologia aplicada, que se divide em subáreas como entomologia forense, veterinária, médica e econômica (Gomes *et al.*, 2010).

No âmbito da entomologia forense, o estudo de insetos e outros artrópodes, em conjunto com os demais métodos periciais, tem como principal objetivo obter informações e evidências que contribuam para investigações (Thyssen, 2011). De acordo com Botteon (2025) e Catts e Goff (1992), a entomologia forense é dividida em três categorias, incluindo a entomologia urbana, que trata da presença de insetos em imóveis; a entomologia de produtos armazenados, focada na análise de insetos relacionados à contaminação de alimentos; e a entomologia médico-legal, voltada para o estudo de insetos relacionados a crimes, como homicídios, suicídios, estupros, abuso físico, tráfico de contrabando, situações de abandono e maus tratos à crianças e tráfico de drogas.

Embora a entomologia forense tenha ganhado destaque nas últimas décadas por sua aplicação em investigações criminais, suas raízes remontam a séculos atrás. O primeiro registro conhecido de sua utilização data de 1235, quando Sung Tz'u, em

sua obra *The Washing Away of Wrongs*, descreveu como insetos ajudaram a identificar uma arma do crime em um caso de homicídio na China (Catts; Goff, 1992). Entretanto, somente séculos depois, em 1894, foi destacado o papel médico-legal dos insetos por Mégnin no livro *La faune de cadavres*, difundindo a entomologia forense como ciência (Pujol-Luz; Arantes; Constantino, 2008; Thyssen, 2011). Segundo Pujol-Luz, Arantes e Constantino (2008), no Brasil, o marco inicial do estudo da entomofauna cadavérica se deu em 1908 com o trabalho de Oscar Freire, seguido de diversos outros estudos nessa área em diferentes estados brasileiros, contribuindo para as questões médico-legais.

Os insetos, sobretudo os necrófagos, desempenham um papel crucial nos estudos forenses, pois são os primeiros a colonizar um cadáver em decomposição (Catts; Goff, 1992; Gomes *et al.*, 2010). Isso porque, após a morte, os tecidos de animais, incluindo os humanos, atraem diversas espécies que buscam esse substrato como fonte alimentar ou para assegurar a sobrevivência de sua prole (Thyssen, 2011). Dentre os principais insetos que compõem a fauna cadavérica estão os representantes das ordens Diptera (moscas), Coleoptera (besouros), Formicidae (formigas) e Hymenoptera (abelhas e vespas), dependendo de suas preferências biológicas e do estado de decomposição do corpo, tendo Diptera um destaque ainda maior por chegar em questão de minutos após a morte, iniciando rapidamente o processo de colonização do cadáver (El-Gawad *et al.*, 2019).

A composição da fauna cadavérica varia conforme fatores como clima, acessibilidade ao corpo e localização geográfica, com algumas espécies sendo restritas a regiões específicas (Gomes *et al.*, 2010; Horenstein; Rosso; García, 2012). No contexto forense, essas variações são cruciais para identificar o local da morte, enquanto o estudo detalhado de ovos, larvas e pupas de moscas é amplamente utilizado para estimar o intervalo pós-morte (IPM) - tempo entre o óbito e a descoberta do corpo - e detectar movimentações do cadáver (Catts; Goff, 1992; Oliveira-Costa, 2024; Thyssen, 2011). Além disso, espécies hematófagas de Diptera, como os mosquitos, têm relevância adicional por permitir a análise do DNA humano encontrado em seu trato digestivo, contribuindo para a identificação de autores ou vítimas em investigações criminais (Ahmed *et al.*, 2023; Suwannakart *et al.*, 2024).

Fêmeas do mosquito *A. aegypti* podem desempenhar um papel relevante em investigações criminais devido à sua capacidade de armazenar DNA humano no trato digestivo após se alimentarem de sangue (Rabêlo *et al.*, 2015). Esse comportamento,

aliado ao hábito de permanecerem próximas ao local da alimentação, facilita a coleta de indivíduos (Rabêlo *et al.*, 2015; Spitaleri *et al.*, 2006). Estudos mostram que mosquitos encontrados em cenas de crime podem fornecer perfis de DNA humano, auxiliando na identificação de vítimas ou suspeitos (Byrd; Castner, 2010; Curic *et al.*, 2014). Uma exemplificação disso é o estudo realizado por Spitaleri *et al.* (2006), que descreveu um caso ocorrido na Sicília (Itália), no qual a análise de DNA extraído de um mosquito esmagado na parede da casa de um suspeito revelou uma correspondência com o perfil genético da vítima, o que contribuiu para a resolução de um caso envolvendo um corpo encontrado em uma praia próxima.

Estudos sobre mosquitos hematófagos têm se mostrado importantes na área forense para a identificação de DNA humano em investigações criminais. Pesquisas, como a de Curic *et al.* (2014), demonstraram que é possível obter perfis genéticos completos de DNA humano até 48 horas após a alimentação sanguínea através de mosquitos da família Culicidae. Esses perfis fornecem dados espaciais e temporais essenciais para entender eventos no local do crime, o que indica que os mosquitos podem ser uma peça chave no processo investigativo (Byrd; Castner, 2010; Curic *et al.*, 2014). No entanto, mesmo que a espécie *A. aegypti* seja amplamente encontrada em todas as regiões do Brasil, há uma escassez de estudos sobre esse mosquito no contexto forense.

Considerando a aplicação de estudos com *A. aegypti* nas ciências forenses, o objetivo deste trabalho é verificar o tempo máximo pós alimentação sanguínea e a quantidade de mosquitos necessária para identificar o DNA humano em *A. aegypti*, a fim de auxiliar o trabalho pericial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar DNA humano em *A. aegypti* após alimentação sanguínea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

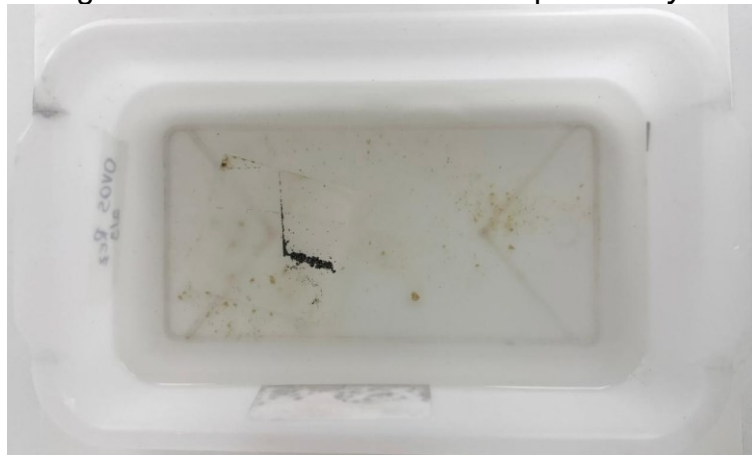
- Determinar o período máximo após a alimentação sanguínea em que ainda é possível detectar DNA humano no trato gastrointestinal de *A. aegypti*;
- Determinar o número mínimo de mosquitos necessário para a recuperação eficaz de DNA humano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS

Para este estudo, foram utilizadas fêmeas de *A. aegypti* da cepa *Red Eyes*, provenientes do Laboratório de Imunologia (LIDI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para a criação desses mosquitos, ovos foram colocados para eclodir em bandejas de plástico brancas (26 x 17 x 6 cm) contendo cerca de 900 ml de água filtrada (Figura 3). À medida que a eclosão avançava, adicionou-se água até alcançar a proporção de aproximadamente 1 litro para cada 100 larvas (Anjolette; Marcoris, 2016).

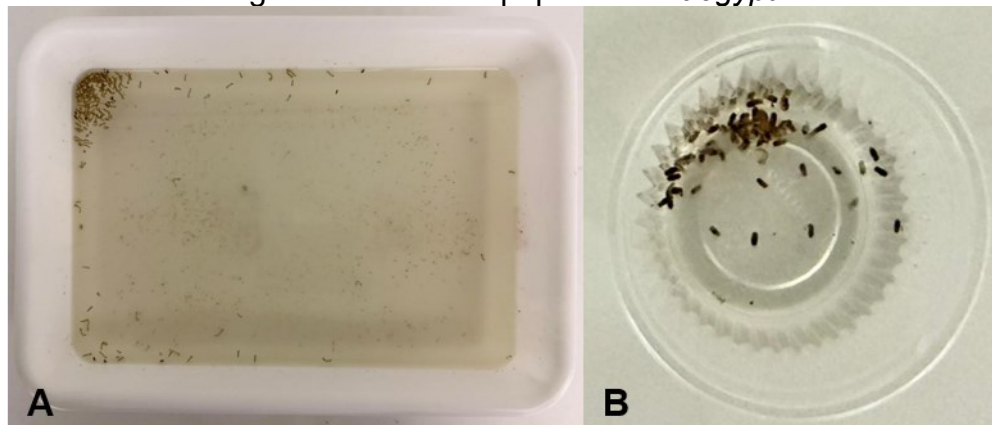
Figura 3 - Eclosão dos ovos da cepa *Red Eyes*



Fonte: arquivo pessoal.

As larvas foram alimentadas a cada dois dias com ração canina (Pedigree®) triturada e a água das bandejas era substituída apenas quando se tornava turva ou apresentava biofilme na superfície. Quando havia perda por evaporação, o volume era repostado.

A partir do sexto dia após a eclosão, iniciou-se o monitoramento diário da presença de pupas (Figura 4A), as quais foram transferidas para copos plásticos de 50 ml (Figura 4B) com o auxílio de uma pipeta plástica. Em seguida, os copos foram colocados em uma gaiola de criação plástica arredondada, de 23 cm de diâmetro e 25 cm de altura, que possuía uma abertura frontal circular com uma manga de tecido para permitir o acesso. A parte superior da gaiola era coberta com tecido *voile*, garantindo a circulação de ar adequada (Figura 5).

Figura 4 - Larvas e pupas de *A. aegypti*

Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A - larvas e pupas de *A. aegypti* na bandeja de criação; B - pupas de *A. aegypti* no copo plástico de 50 ml.

Figura 5 - Gaiola de criação dos mosquitos



Fonte: arquivo pessoal.

Nessas gaiolas ocorreu a emergência dos adultos, que foram alimentados com solução de sacarose a 10% em água filtrada, oferecida *ad libitum* em algodão embebido e acondicionado em copos plásticos de 50 ml (Figura 6). No dia anterior ao repasto sanguíneo, os mosquitos adultos foram submetidos a jejum, recebendo apenas algodão embebido em água.

Figura 6 - Troca de solução com sacarose dentro da gaiola de criação



Fonte: arquivo pessoal.

Tanto as larvas quanto os mosquitos adultos foram mantidos em condições controladas de fotoperíodo (12h claro/12h escuro), umidade relativa entre 70% e 80% e temperatura de 28°C. Todas as fêmeas utilizadas no experimento tinham entre 4 e 9 dias de vida.

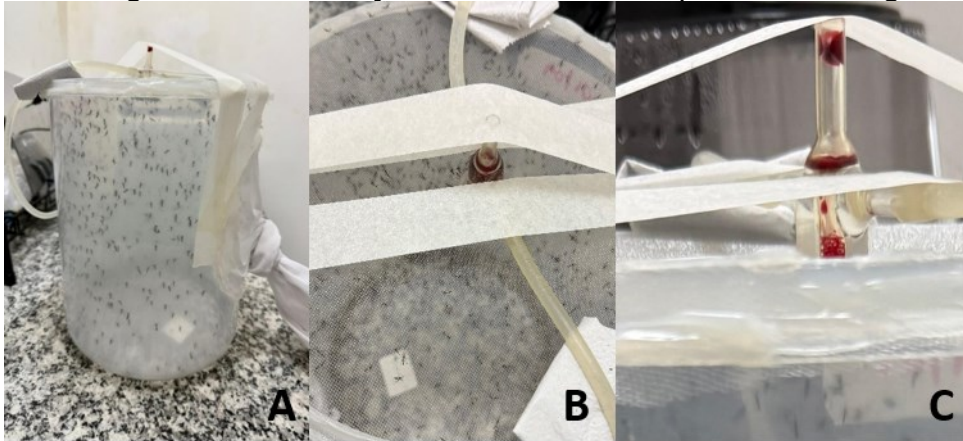
3.2 REPASTO SANGUÍNEO

Os mosquitos foram alimentados com sangue humano de doador saudável, coletado no mesmo dia da alimentação, a fim de garantir a qualidade do material e estimular a ingestão adequada. O sangue foi obtido de uma voluntária do LIDI (número de protocolo aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos - CEPESH/UFSC; CAAE: 89894417.8.0000.0121) e coletado em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Ao sangue foi adicionado o fagoestimulante ATP na concentração de 1 mM, usado na proporção de 1ml de sangue para 10 µl de ATP. Em seguida, o material foi mantido temporariamente em isopor com gelo para garantir sua conservação até o momento do uso.

Para o repasto sanguíneo foi utilizado um alimentador artificial de insetos hematófagos, cuja extremidade circular da base foi coberta com parafilme. Em seguida, duas mangueiras de polietileno foram acopladas às extremidades laterais do alimentador para circulação de água a 37°C oriunda de um banho-maria que mantinha

o sangue aquecido. A estrutura foi posicionada sobre o tecido *voile* da gaiola de criação dos mosquitos e fixada com fita adesiva crepe (Figura 7).

Figura 7 - Alimentação artificial dos mosquitos com sangue



Fonte: arquivo pessoal.

Legenda: A – vista geral da gaiola do repasto sanguíneo; B - vista de cima da gaiola do repasto sanguíneo; C – sangue no alimentador artificial para insetos hematófagos.

Após homogeneizado foi adicionado 1,3 ml de sangue no alimentador. Em seguida, um saco plástico preto foi colocado sobre a gaiola, proporcionando melhores condições e conforto para a alimentação das fêmeas.

O repasto sanguíneo teve duração total de aproximadamente 40 minutos, com monitoramento a cada 10 minutos para verificar se as fêmeas estavam se alimentando adequadamente.

Concluído o período de 40 minutos, o alimentador foi retirado da gaiola e os mosquitos foram anestesiados por resfriamento. Para isso, a gaiola foi colocada no freezer a -20°C por 1 minuto. Em seguida, os indivíduos foram retirados com o auxílio de um sugador manual (Figura 8) e transferidos para um tubo de vidro acondicionado em isopor com gelo, onde permaneceram por aproximadamente 1 minuto e 30 segundos. Logo após, os mosquitos foram depositados em uma placa de Petri, também mantida sobre o gelo, e iniciou-se a separação das fêmeas ingurgitadas com um auxílio de uma pinça metálica (Figura 9).

Figura 8 - Sugador manual



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 9 - Separação das fêmeas ingurgitadas



Fonte: arquivo pessoal.

Posteriormente, copos de papel de 700 ml (Figura 10) foram utilizados para acondicionar cerca de 27 fêmeas ingurgitadas referentes a cada tempo de coleta após a alimentação sanguínea (0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h e 96h). Esses copos foram vedados em sua extremidade superior com tecido *voile*, permitindo a circulação de ar. Nas gaiolas correspondentes aos tempos a partir de 12h, foi oferecido algodão embebido em solução de sacarose a 10% em água filtrada, posicionado na parte superior e protegido por um copo plástico de 50 ml. Essa solução foi substituída a cada dois dias.

Figura 10 - Copo de papel utilizado para acondicionamento das fêmeas de *A. aegypti* após o repasto sanguíneo



Fonte: arquivo pessoal.

3.3 COLETA E FIXAÇÃO DOS MOSQUITOS

A coleta referente ao tempo 0h foi realizada imediatamente após o repasto sanguíneo. Para cada tempo de coleta (0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h e 96h), uma das gaiolas foi colocada no freezer a -20°C por 10 minutos, tempo suficiente para causar a morte dos indivíduos. Em seguida, os mosquitos foram separados em *pools* de 1, 3 e 5 indivíduos, os quais foram acondicionados em microtubos plásticos de 1,5 ml contendo 300 μl de álcool 70% (Figura 11). Os tubos permaneceram armazenados em freezer a -20°C até a realização das análises moleculares.

Figura 11 - Fêmeas de *A. aegypti* separadas em *pools* de 1, 3 e 5 indivíduos



Fonte: arquivo pessoal.

3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit da Cellco®, seguindo o protocolo *DNA preparation from blood* (extração de DNA a partir de sangue) de acordo com as especificações do fabricante. Basicamente, as fêmeas de *A. aegypti* foram transferidas para novos microtubos de 1,5 ml com 200 µl de tampão de lise de sangue, onde foram maceradas com o auxílio de bastões plásticos esterilizados. Em seguida, adicionou-se 300 µl de tampão de lise e 2 µl de RNase A. Após a homogeneização manual, foi acrescentado 8 µl de Proteinase K, e os tubos foram incubados por 10 minutos a 60°C, sendo posteriormente resfriados por 5 minutos em gelo. Na sequência, adicionou-se 300 µl de tampão de ligação, e os tubos foram novamente mantidos em gelo por 5 minutos.

As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante obtido, contendo o DNA, foi transferido para a coluna de centrifugação acoplada a um tubo coletor de 2 ml, enquanto as carcaças dos mosquitos foram descartadas. Uma nova centrifugação foi realizada por 1 minuto a 10.000 x g, e o líquido do tubo coletor foi descartado.

Em seguida, 500 µl de tampão de lavagem foi adicionado sobre a coluna, procedendo-se à centrifugação por 1 minuto a 10.000 x g. O líquido coletado foi descartado e o processo de lavagem foi repetido duas vezes. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação adicional por 1 minuto a 10.000 x g.

Por fim, o tubo coletor foi descartado e a coluna de centrifugação transferida para novos microtubos de 1,5 ml devidamente identificados para a etapa de eluição. Para a eluição do DNA, adicionou-se entre 40-50 µl de água ultrapura (Milli-Q) sobre a coluna, seguida de incubação por 1 minuto à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas por 2 minutos a 10.000 x g.

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop Lite Plus* (Thermo Scientific) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC. Ao final, as amostras foram armazenadas à -20°C.

3.5 PCR E ELETROFORESE

Um fragmento do gene citocromo B do DNA mitocondrial foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), realizada no termociclador *Thermal*

Cycler 2720 (Applied Biosystems), disponibilizado pelo Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM). A amplificação foi conduzida utilizando um par de *primers*, que amplifica uma região do gene do citocromo B em vertebrados, com produto esperado de 359 pares de base (pb) (Tabela 1). Esse par de *primers* foi retirado do trabalho de Steuber, Abdel-Rady e Clausen (2005). As concentrações dos componentes presentes no *mix* de reação estão apresentadas na tabela 2. As reações foram realizadas com um limiar de 20 a 85 ng de DNA total das diferentes amostras. Como controle positivo foi utilizado DNA total humano (40 ng), enquanto o controle negativo consistiu em água ultrapura (Milli-Q). Além disso, DNA total de *A. aegypti* (80 ng) foi empregado como controle adicional para demonstrar que o par de *primers* não amplifica o fragmento do citocromo B nesse inseto. O volume final de cada reação, incluindo o DNA molde, totalizou 25 µl.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do fragmento do gene citocromo B

Primers	Sequência (5´ - 3´)
CYTB1 (<i>forward</i>)	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
CYTB2 (<i>reverse</i>)	CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 2 - Concentração dos componentes do mix de PCR

Componente do mix	Concentração
Tampão	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer CYTB1	0,2 µM
Primer CYTB2	0,2 µM
Taq polimerase	1U

Fonte: elaborado pela autora.

As condições de amplificação foram modificadas a partir do trabalho de Quaresma *et al.* (2012) e consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 58°C por 50 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto. A

reação foi finalizada com uma extensão final a 72 °C por 2 minutos e *hold* contínuo a 15 °C.

A visualização dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A separação dos fragmentos foi conduzida a 95 V e 240 mA por 1 hora. Os produtos de PCR foram corados com GelRed, e utilizou-se um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100 pb para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

Após a eletroforese, os resultados foram visualizados sob transiluminador de luz UV e registrados usando um fotodocumentador (Bio-Rad), disponível no LAMEB.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

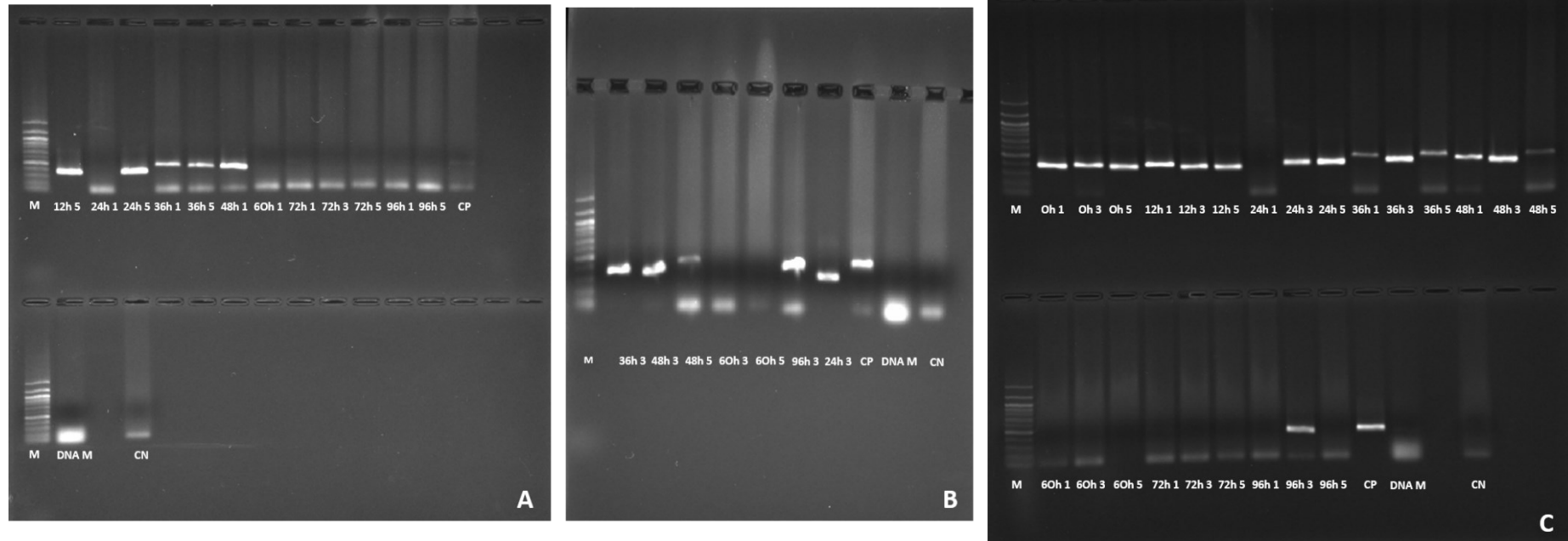
Observou-se amplificação do gene citocromo B do DNA mitocondrial em todos os *pools* de mosquitos referentes aos tempos de 0h, 12h, 36h e 48h, enquanto os *pools* dos tempos de 60h e 72h não apresentaram amplificação (Figura 12). A figura 12 apresenta 3 géis de agarose, pois a amplificação das amostras foi realizada em mais de uma reação de PCR, cada uma acompanhada de seus respectivos controles, o que resultou na visualização dos produtos em géis distintos. No gel 12C, as amostras referentes aos diferentes tempos e quantidades de fêmeas foram agrupadas, juntamente com os controles da terceira PCR realizada.

Notou-se ainda uma variação no sucesso da amplificação nas amostras dos tempos de 24h e 96h. No tempo de 24h, os *pools* contendo 3 e 5 mosquitos foram amplificados com sucesso, ao passo que a amostra composta por apenas um indivíduo não apresentou amplificação (Figura 12A), possivelmente devido à menor qualidade do DNA extraído.

Neste trabalho, foi utilizado o Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit da Cellco®, diferindo de outros estudos que empregaram kits comerciais como o DNA IQ™ System (Promega), utilizado por Rabêlo *et al.* (2015); QIAamp® DNA Micro (Qiagen), empregado por Suwannakart *et al.* (2024); e o QIAamp® DNA Investigator (Qiagen) usado por Vieira, Carvalho e Silva (2017). Essas diferenças metodológicas entre os kits podem ter afetado a pureza e o rendimento do DNA obtido, impactando a eficiência da amplificação e contribuindo para as variações observadas entre as amostras do tempo de 24h.

A partir de 48 horas após a alimentação, observou-se uma redução na probabilidade de detecção de DNA humano íntegro, resultado da degradação progressiva do material genético durante o processo digestivo do mosquito. Esse fenômeno está relacionado à atividade das enzimas digestivas, que atuam de forma mais intensa nas primeiras horas após o repasto (O'gower, 1956; Okuda *et al.*, 2002). Mukabana *et al.* (2002) demonstraram que a duração dessa atividade influencia diretamente o sucesso da amplificação de DNA humano em *Anopheles gambiae* (outra espécie de culicídeo), enquanto Okuda *et al.* (2002) observaram que enzimas como a serina protease atingem atividade máxima em torno de 36 horas pós-alimentação, o que explica a redução na eficiência de amplificação após esse período.

Figura 12 - Gel de agarose mostrando a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial citocromo B em amostras com diferentes quantidades de fêmeas alimentadas com sangue, e coletadas em diferentes intervalos de tempo após o repasto sanguíneo (de 0 a 96h)



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: A – primeiro gel parcial; B – segunda parte das amostras; C – gel total. M = marcador molecular de 100 pb; CN = controle negativo; CP = controle positivo (DNA total humano); DNA M = DNA total do mosquito usado como controle. A identificação das amostras segue o padrão: tempo de coleta + número de mosquitos (1, 3 ou 5). Exemplo: 0h 1 = coleta imediatamente após o repasto sanguíneo (0h) e 1 mosquito; 0h 3 = coleta imediatamente após o repasto sanguíneo (0h) e 3 mosquitos; 0h 5 = coleta imediatamente após o repasto sanguíneo (0h) e 5 mosquitos; 12h 1 = coleta 12h após o repasto sanguíneo e 1 mosquito; 12h 3 = coleta 12h após o repasto sanguíneo e 3 mosquitos; 12h 5 = coleta 12h após o repasto sanguíneo e 5 mosquitos e assim sucessivamente até 96h.

Corroborando essa tendência, Suwannakart *et al.* (2024) verificaram que DNA de boa qualidade pôde ser obtido até 24h após a alimentação, apresentando redução gradual a partir de 36h, limite no qual ainda foram observados perfis genéticos completos, isto é, todos os marcadores utilizados foram amplificados. No entanto, após 48h a detecção de DNA humano tornou-se inviável. Resultados semelhantes foram descritos por Ahmed *et al.* (2023), Curic *et al.* (2014) e Ibrahim *et al.* (2015), que também observaram queda acentuada na detecção de DNA humano a partir de 48h, associada à degradação do material genético durante a digestão do sangue. Esses achados, em conjunto com os resultados obtidos nesse estudo, reforçam que a atividade enzimática digestiva exerce papel determinante na integridade e detectabilidade do DNA humano ao longo do tempo pós-alimentação.

Entretanto, a amplificação positiva observada na amostra com 3 indivíduos no tempo de 96h demonstra que, embora menos provável, ainda é possível recuperar moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) amplificáveis após intervalos de tempo maiores que 48h, devido à sua abundância nas células e maior resistência à degradação (Costa; Kortmann; Francez, 2025; Holland; Parsons, 1999). Esse resultado também pode ser explicado pelo fato de que algumas fêmeas apresentam digestão sanguínea mais lenta que o usual, permitindo a permanência de resquícios de sangue no intestino por até 96h, embora isso ocorra com baixa frequência (Kantor *et al.*, 2018).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é um genoma circular de dupla fita, presente em múltiplas cópias em cada mitocôndria, e, conseqüentemente, em um número muito maior de cópias por célula do que o DNA nuclear (nDNA) (Reeves *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 1993). A estrutura circular do mtDNA o torna menos suscetível à degradação por exonucleases, e o fato de estar protegido por duas membranas também contribui para a sua resistência a condições ambientais adversas (Holland; Parsons, 1999). Essa abundância e resistência confere ao mtDNA uma vantagem sobre os marcadores nucleares, especialmente em amostras degradadas ou com baixa concentração de material genético, como sangue parcialmente digerido, ossos, dentes ou cabelos (Wilson *et al.*, 1993, 1995).

Deste modo, a amplificação obtida em 96h pode ser explicada pelo fato do alvo utilizado neste estudo ser uma região do gene mitocondrial. Esse resultado indica que pequenas quantidades de DNA podem permanecer preservadas mesmo em

estágios avançados da digestão, sendo compatível com as observações de Sato *et al.* (1992), que detectaram DNA humano no intestino de mosquitos até 100 horas após a alimentação.

Diversos estudos como Chow-Shaffer *et al.* (2000), Curic *et al.* (2014), Durdle (2019), Ibrahim *et al.* (2015) e Mukabana *et al.* (2002) demonstraram que o sucesso da amplificação diminui com o aumento do tempo pós-alimentação sanguínea, independentemente do alvo ser nuclear ou mitocondrial. Ainda assim, o maior número de cópias do mtDNA aumenta as chances de se encontrar fragmentos amplificáveis em períodos prolongados, como o observado neste estudo em 96h com o *pool* de 3 mosquitos.

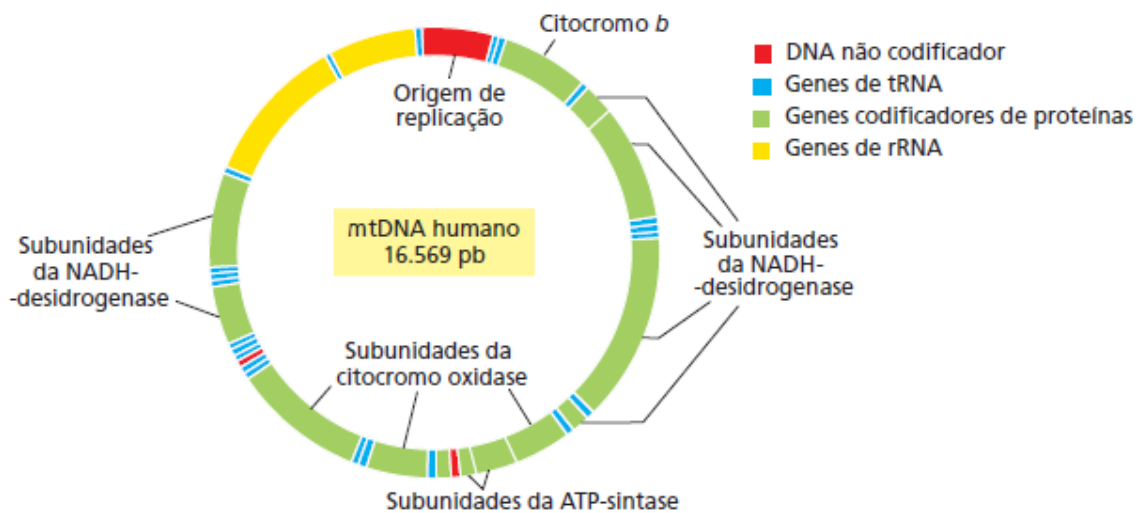
Além dessa vantagem quantitativa, o mtDNA também apresenta características genéticas que o tornam um marcador informativo em contextos forenses. Por ser herdado exclusivamente pela via materna, o mtDNA não sofre recombinação, o que garante a conservação de haplótipos ao longo das gerações. Contudo, a ausência de mecanismos eficientes de reparo resulta em uma taxa de mutação mais elevada do que a observada em genes nucleares (Cann *et al.*, 1987). Essa combinação de conservação estrutural e alta mutabilidade faz com que determinadas regiões do mtDNA sejam de grande interesse forense por sua capacidade de diferenciar indivíduos dentro da população humana (Costa; Kortmann; Francez, 2025).

Em virtude dessas características, pesquisadores como Kaddumukasa *et al.* (2015), Townzen, Brower e Judd (2008) e Zehner, Zimmermann e Mebs (1998) empregaram regiões mitocondriais, como os genes Citocromo B e Citocromo Oxidase Subunidade I, para determinar a origem da alimentação sanguínea em insetos hematófagos, possibilitando, inclusive, a identificação de DNA humano quando presente. Embora o par de *primers* utilizado neste estudo amplifique uma região do citocromo B do mtDNA de vertebrados em geral, e não exclusivamente humana, tal fato não compromete a relevância metodológica deste trabalho, visto que a linhagem utilizada em laboratório foi alimentada uma única vez com sangue humano de origem conhecida. Assim, para compreender o potencial desses marcadores, é essencial conhecer a estrutura do genoma onde tais marcadores estão presentes.

O genoma mitocondrial humano (Figura 13) possui uma região codificadora e uma região não codificadora de aproximadamente 1.100 pb denominada região controle ou hipervariável (Costa; Kortmann; Francez, 2025). A região codificadora

abriga 37 genes responsáveis pela síntese de 13 proteínas da cadeia respiratória, 22 RNAs de transferência e 2 RNAs ribossomais (Wilson *et al.*, 1993). Já a região controle compreende três segmentos hipervariáveis — HV1, HV2 e HV3 — caracterizados por alto grau de polimorfismo. A maior parte da variação de sequência entre indivíduos se concentra nas regiões HV1 e HV2 (Greenberg; Newbold; Sugino, 1983), que por seu pequeno tamanho e alta variabilidade, são rotineiramente amplificadas por PCR em análises forenses (Budowle *et al.* 2003).

Figura 13 - Organização do genoma mitocondrial humano



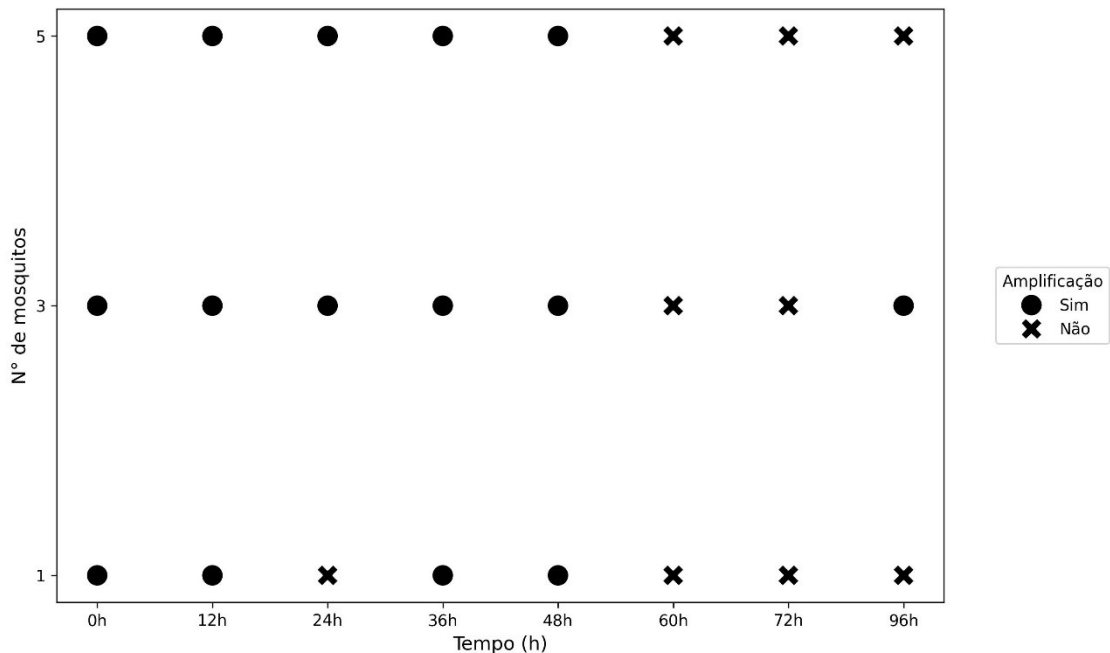
Fonte: Alberts *et al.* (2017).

Apesar da escolha do gene citocromo B para este estudo, o marcador mitocondrial mais indicado para fins de identificação forense humana são as regiões hipervariáveis HV1 e HV2, localizadas na região controle do genoma mitocondrial. Essas regiões apresentam elevada taxa de mutação, essencial para a diferenciação individual (Greenberg; Newbold; Sugino, 1983). A região HV1, por exemplo, foi empregada com sucesso por Vieira, Carvalho e Silva (2017) para identificar DNA humano em mosquitos e é preferencialmente utilizada em casos forenses devido à sua sensibilidade mesmo em amostras altamente degradadas (Li *et al.*, 2011).

Além do tempo pós-alimentação, também foi avaliada a influência do número de indivíduos testados (1, 3 e 5 mosquitos) em cada horário pós-repasto sobre a eficiência de amplificação. De modo geral, observou-se que a amplificação do gene citocromo B foi bem-sucedida, independentemente da quantidade de mosquitos presentes em cada tempo de coleta. Conforme apresentado no gráfico 1, houve amplificação em todas as 3 quantidades de mosquito testadas nos tempos de 0h, 12h,

36h e 48h. No tempo de 24h, apenas as amostras compostas por 3 e 5 indivíduos apresentaram amplificação, enquanto no tempo de 96h apenas a amostra com 3 indivíduos foi amplificada.

Gráfico 1 - Eficiência na amplificação do gene citocromo B em diferentes tempos e quantidades de fêmeas ingurgitadas de *Aedes aegypti*



Fonte: elaborado pela autora.

Este achado indica que, mesmo um único mosquito pode conter DNA humano detectável em diferentes tempos pós-alimentação, evidenciando que um espécime isolado pode fornecer material genético suficiente para análises posteriores. Embora o citocromo B não permita a identificação individual, a detecção inicial de DNA mitocondrial pode subsidiar etapas subsequentes, como o sequenciamento e a comparação com bancos de dados para confirmar a origem humana. Nesse sentido, reforça-se o potencial dessa abordagem em investigações forenses, especialmente quando associada a marcadores mais informativos, como as regiões hipervariáveis HV1 e HV2 da região controle mitocondrial, e em cenários nos quais as amostras disponíveis são escassas.

Assim, no contexto da entomologia forense, os mosquitos destacam-se como potenciais fontes de evidências biológicas em locais de crime, pois podem conter DNA humano capaz de subsidiar a identificação de indivíduos.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou a viabilidade dessa abordagem em *A. aegypti* alimentados com sangue humano, por meio da amplificação do gene mitocondrial citocromo B em diferentes intervalos pós-alimentação.

A amplificação foi, em geral, bem-sucedida nos tempos de 0h, 12h, 24h, 36h e 48h, enquanto não houve detecção nos tempos de 60h, 72h e nas amostras de 1 e 5 mosquitos de 96h.

Os resultados obtidos reforçam o potencial do uso de mosquitos como fonte alternativa de material genético em investigações forenses e ressaltam a importância da seleção adequada dos marcadores moleculares para garantir a especificidade da identificação.

Embora o gene citocromo B tenha se mostrado eficiente neste estudo, o par de *primers* utilizado não é específico para humanos, pois amplifica uma região gênica do citocromo B presente em diferentes vertebrados. Assim, em contextos periciais reais, nos quais não se sabe se o mosquito se alimentou exclusivamente de sangue humano, recomenda-se o uso de marcadores da região controle do genoma mitocondrial, como a região hipervariável HV1, que é específica para DNA humano e proporciona maior precisão na identificação.

Outro ponto relevante é que o número de indivíduos pode não ser um fator limitante, pois uma única fêmea capturada em uma cena de crime, caso tenha se alimentado de sangue humano, pode fornecer material genético suficiente para fins de identificação humana quando se utiliza o marcador adequado. Ainda assim, o tempo decorrido após a alimentação sanguínea permanece uma limitação importante, devido à ação das enzimas digestivas que comprometem a integridade e a detectabilidade do DNA em análises forenses.

Embora a amplificação tenha sido bem-sucedida na maioria dos intervalos testados, o estudo não contemplou diferentes marcadores moleculares nem técnicas quantitativas, como a qPCR, que poderiam oferecer informações mais detalhadas sobre a degradação progressiva do material genético. Dessa forma, pesquisas futuras poderiam comparar o desempenho de distintos marcadores mitocondriais e nucleares

sob as mesmas condições experimentais, avaliando a sensibilidade e a especificidade de cada marcador.

Assim, os resultados apresentados neste estudo reforçam o potencial dos mosquitos como ferramentas complementares na investigação criminal e evidenciam a importância de aprimorar as metodologias moleculares para maximizar a recuperação e a identificação do DNA humano em diferentes contextos forenses.

REFERÊNCIAS

- AHEBWA, A. *et al.* *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) ecology, biology, behaviour, and implications on arbovirus transmission in Thailand: Review. **One Health**, [s. l.], v. 16, p. 100555, 2023.
- AHMED, A. M. *et al.* Forensic DNA Analysis of Mixed Mosquito Blood Meals: STR profiling for human identification. **Insects**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 467-482, 2023.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464 p.
- ANJOLETTE, A. F. F; MACORIS, M. L. G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **BEPA**, São Paulo, v. 13, n. 156, p. 19-29, 2016.
- ALMEIDA, E. A. B.; MELO, G. A. R. Morfologia externa. *In*: RAFAEL, J. A. *et al.* (eds.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 2. ed. Manaus: INPA, 2024. p. 1-11.
- BENCHIMOL, J. L.; SÁ, M. R (org.) **Adolpho Lutz: Entomologia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. 1056 p.
- BOTTEON, V. W. Entomologia forense: Insetos no local do crime. *In*: JORGE, H. V. N.; MONTES, R. H. O. (coord.). **Tratado de perícia criminal contemporânea: Fundamentos, teoria, prática e inovação na ciência criminalística**. São Paulo: Juspodivm, 2025. p. 277-308.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3. ed. Tradução: Carlos Henrique de Araújo Cosendey. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1254 p. Título original: Invertebrates.
- BUDOWLE, B. *et al.* Forensics and mitochondrial DNA: Applications, debates, and foundations. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [s. l.], v. 4, p. 119-141, 2003.
- BYERLY, C. R. **Mosquito warrior**: yellow fever, public health and the forgotten career of general William C. Gorgas. Tuscaloosa: The University of Alabama Press, 2024. 431 p.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. Insects of Forensic Importance. *In*: BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. (eds.). **Forensic Entomology: the utility of arthropods in legal investigations**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 39-127.
- CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, Estados Unidos, v. 325, p. 32-36, 1987.
- CARVALHO *et al.* Diptera. *In*: RAFAEL, J. A. *et al.* (eds.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 2. ed. Manaus: INPA, 2024. p. 783-831.

CATTS, E. P; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 253-272, 1992.

CHOW-SHAFFER, E. *et al.* Laboratory and Field Evaluation of Polymerase Chain Reaction-Based Forensic DNA Profiling for Use in Identification of Human Blood Meal Sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal Of Medical Entomology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 492-502, 2000.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. 224p.

COSTA, G. S. M. B.; KORTMANN, G. L.; FRANCEZ, P. A. C. DNA mitocondrial. *In*: FILHO, C. R. D. *et al.* (org.) **Introdução à genética forense**. 2. ed. Campinas: Millennium Editora, 2025. p. 411-447.

CURIC, G. *et al.* Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). **Forensic Science International: Genetics**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 109-112, 2014.

DURDLE, A. Insects as vectors of DNA in a forensic context. **Wires Forensic Science**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 1-27, 2019.

EIRAS, A. E. Culicidae. *In*: NEVES *et al.* **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 355-368.

EL-GAWAD, A. A. *et al.* Successive waves of dipteran flies attracted to warfarin-intoxicated rabbit carcasses in Cairo, Egypt. **The Journal Of Basic And Applied Zoology**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 1-10, 2019.

GOMES, G. *et al.* Insetos, entomologia e ciências forenses. *In*: GOMES, L. (org.) **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 17-86.

GREENBERG, B. D.; NEWBOLD, J. E.; SUGINO, A. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. **Gene**, [s. l.], v. 21, p. 33-49, 1983.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos: Fundamentos da Entomologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. 912 p.

HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA sequence analysis: Validation and use for forensic casework. **Forensic Science Review**, [s. l.], v. 11, p. 22-50, 1999.

HONÓRIO, N. A. *et al.* Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 191-198, 2003.

HORENSTEIN, M. B.; ROSSO, B.; GARCÍA, M. D. Seasonal structure and dynamics of sarcosaprophagous fauna on pig carrion in a rural area of Cordoba (Argentina): their

importance in forensic science. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 217, n. 1-3, p. 146-156, 2012.

HOSSAIN, M. S. et al. *Aedes* Larva Detection Using Ensemble Learning to Prevent Dengue Endemic. **Biomedinformatics**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 405-423, 2022.

HUTCHINGS, R. W. et al. 2025. Culicidae in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/798>>. Acesso em: 07 set. 2025.

IBRAHIM, A. M. A. et al. Temporal analysis of 16 STR loci in human blood drawn from two culicid mosquitoes cultured at different temperatures. **Entomological Research**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 268-274, 2015.

INSTITUTO BUTANTAN. Curso Dengue: conheça mais sobre os mosquitos. Escola Superior do Instituto Butantan, 2024a. Disponível em: <<https://escolasuperior.butantan.gov.br/>>. Acesso em: 19 out. 2024.

INSTITUTO BUTANTAN. O que aconteceria se os insetos fossem extintos do mundo? Entenda a importância desses pequenos animais, 2024b. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/o-que-aconteceria-se-os-insetos-fossem-extintos-do-mundo-entenda-a-importancia-desses-pequenos-animais>>. Acesso em: 18 ago. 2025.

KADDUMUKASA, M. A. et al. High proportion of mosquito vectors in Zika forest, Uganda, feeding on humans has implications for the spread of new arbovirus pathogens. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 16, p. 1418-1426, 2015.

KANTOR, A. M. et al. Ultrastructural Analysis of Chikungunya Virus Dissemination from the Midgut of the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 571, 2018.

LI, X. et al. Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: a forensic entomology case from central-southern China. **Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 333-338, 2011.

LOZOVEI, A. L. Culicidae (Mosquitos). In: MARCONDES, C. B. (org.). **Entomologia médica e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 107-174.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 526 p.

MUKABANA, W. R. et al. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from blood meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Bulletin Of Entomological Research**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 233-239, 2002.

O'GOWER, A. K. The rate of digestion of human blood by certain species of mosquitoes. **Australian Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 125-129, 1956.

OKUDA, K. *et al.* Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. **Tissue And Cell**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 210-219, 2002.

OLIVEIRA-COSTA, J. *et al.* **Entomologia médico-legal**: da cronotanatognose à entomogenética. São Paulo: Millennium, 2024. 522 p.

PUJOL-LUZ, J. R.; ARANTES, L. C.; CONSTANTINO, R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 485-492, 2008.

QUARESMA, P. F.; CARVALHO, G. M. L.; RAMOS, M. C. N. F.; FILHO, J. D. A. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 480-485, 2012.

RABÊLO, K. C. N. *et al.* Trace samples of human blood in mosquitoes as a forensic investigation tool. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 14847-14856, 2015.

REEVES, L. E. *et al.* Maintenance of host DNA integrity in field-preserved mosquito (Diptera: Culicidae) blood meals for identification by DNA barcoding. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016.

SATO, C. *et al.* Identification of Human Blood in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Using Nonradioactive DNA Dot Blot Hybridization. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1045-1048, 1992.

SCHNEIDER, M. C.; CELLA, D. M. Citogenética de insetos de importância para a entomologia forense: Coleoptera e Diptera. *In*: GOMES, L. (org). **Entomologia Forense**: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 321-361.

SPITALERI, S. *et al.* Genotyping of human DNA recovered from mosquitoes found on a crime scene. **International Congress Series**, [s. l.], v. 1288, p. 574-576, 2006.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, PH. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 247-254, 2005.

SUWANNAKART, P. *et al.* Human DNA profiles from mosquito blood meal for forensic application in tropical country. **Scienceasia**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 1-7, 2024.

TAVARES, M. Introdução, origem e evolução dos Arthropoda. *In*: FRANSOZO, A.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. (org.). **Zoologia dos Invertebrados**. Rio de Janeiro: Roca, 2017. p. 679-688.

THYSSEN, P. J. Entomologia forense. *In*: MARCONDES, C. B. (org.). **Entomologia médica e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 229-238.

TOWNZEN, J. S.; BROWER, A. V. Z. A.; JUDD, D. D. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. **Medical and Veterinary Entomology**, [s. l.], v. 22, p. 386-393, 2008.

VIEIRA, B. R. C.; CARVALHO, E. F.; SILVA, D. A. Analysis of human DNA present in the digestive tract of *Aedes aegypti* mosquitoes for possible forensic application. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, [s. l.], v. 6, p. 324-326, 2017.

WILSON, M. R. *et al.* Guidelines for the Use of Mitochondrial DNA Sequencing in Forensic Science. **Crime Laboratory Digest**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 68-77, 1993.

WILSON, M. R. *et al.* Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 108, p. 68-74, 1995.

ZHANG, Z. Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. **Zootaxa**, Nova Zelândia, v. 3148, p. 7-12, 2011.

ZEHNER, R.; ZIMMERMANN, S.; MEBS, D. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application, **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 111, p. 323-327, 1998.