
PROTOCOLO DE BIOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE ZOPICLONA EN UN DÍPTERO DE IMPORTANCIA FORENSE *Lucilia sericata* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

BIOLOGY PROTOCOL FOR THE DETECTION OF ZOPICLONE IN A DIPTERA OF FORENSIC IMPORTANCE *Lucilia sericata* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

SANABRIA Claudia¹

*Laboratorio de Biología Forense, Instituto de Investigaciones Forenses
claudiasanabria1798@gmail.com
Sucre, Bolivia*

ZANETTI Noelia²

*Laboratorio de Entomología Forense, Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
noeinez@yahoo.com.ar
Provincia de Buenos Aires, Argentina*

Recibido en 18 de julio de 2024
Aceptado en 20 de noviembre de 2024



Resumen

En aquellos casos cuando el cadáver se encuentra en un estado de putrefacción avanzada y al mismo tiempo se sospecha de una intoxicación, no es posible la colecta de muestras cadavéricas, por lo tanto, el diagnóstico de la posible causa de muerte muchas veces se muestra inconclusa. Sin embargo, el cadáver en esas circunstancias presenta abundante fauna cadavérica, convirtiéndose éstos en elementos importantes dentro de la investigación forense. Por lo expuesto, se realizó un estudio consistente con la detección de zopiclona en un díptero de importancia forense *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), con el objeto de elaborar un protocolo y ser un aporte científico en la investigación de delitos de esta naturaleza, utilizando como método de ensayo la Cromatografía en Capa Fina, en la que se aplicó una placa cromatográfica de sílica gel como fase estacionaria polar, adherida a una superficie, inmersa verticalmente en una fase móvil (eluyente). Considerando el ciclo de vida de *L. sericata*, que consiste en huevos, larvas de estadio I, II, y III, pupas y adultos, se realizó el estudio tomando en cuenta las larvas de estadio III y pupas de controles positivos (alimento con zopiclona) y controles negativos (alimento sin zopiclona). Los resultados indicaron que de todas las fases móviles experimentadas la que mejor relación de polaridad tuvo entre la muestra y el eluyente fue la de Diclorometano e Isopropanol (85:15). En los controles positivos se observó la formación de bandas iguales y similares al estándar de zopiclona. En los controles negativos no hubo formación de bandas en las muestras de larvas III y tampoco en las de pupas, con ninguno de los eluyentes estudiados.

Palabras Clave: Cambios Post mortem, Entomología Forense, Entomotoxicología Forense, Necrófagos, Toxicología Forense

Abstract

In those cases when the corpse is in a state of advanced putrefaction and at the same time poisoning is suspected, the collection of cadaveric samples is not possible, therefore the diagnosis of the possible cause of death is often inconclusive. However, the corpse in these circumstances presents abundant cadaveric fauna, making these important elements in forensic investigation. Therefore, a study consisting of the detection of zopiclone in a dipteran of forensic importance *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) was carried out, in order to develop a protocol and be a scientific contribution in the investigation of crimes of this nature, using as a method Thin Layer Chromatography test, in which a silica gel chromatographic plate was applied as a polar stationary phase, adhered to a surface, vertically immersed in a mobile phase (eluent). Considering the life cycle of *L. sericata*, which consists of eggs, larval instars I, II, and III, pupae and adults, the study was carried out taking into account larval instar III and positive control pupae (food with zopiclone) and negative controls (food without zopiclone). Results indicated that of all the mobile phases tested, the one with the best polarity relationship between the sample and the eluent was that of Dichloromethane and Isopropanol (85:15). In positive controls was observed the formation of bands equal and similar to the zopiclone standard. In the negative controls, there was no formation of bands in the samples of larvae III and neither in those of pupae, with any of the eluents studied.

Keywords: Forensic Entomology, Forensic Entomotoxicology, Necrophagous, Forensic Toxicology, Postmortem changes.

INTRODUCCIÓN

La Entomología Forense es una rama especializada de la Biología que tiene como objeto de estudio a la fauna cadavérica, es decir insectos y otros artrópodos presentes en un cadáver (Ayón, 2019).

La Cromatografía en capa fina deriva del griego “chroma” que significa color y “graphos” que significa escritura, es un procedimiento fisicoquímico que permite separar los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por adsorción o separación diferencial de estos componentes sobre una superficie estacionaria o inmóvil (Chicharro, 2005).

En investigaciones forenses cuando se debe realizar un estudio toxicológico, pero los cadáveres atraviesan una descomposición cadavérica avanzada, comienzan las limitaciones de las

técnicas tradicionales en la toxicología forense. A partir de estas limitaciones surge la Entomotoxicología Forense; por lo que la definimos como una rama de la Entomología Forense que se enfoca en el análisis toxicológico de los insectos que se encuentran en los cadáveres para identificar drogas y toxinas en los tejidos o restos; además, estudia el efecto que tienen estas sustancias sobre el desarrollo de estos especímenes, como una manera de establecer el intervalo post mortem (PMI, abreviatura en inglés); y coadyuva en la localización geográfica del posible lugar del hecho. La farmacocinética en este tipo de invertebrados depende de la especie, la etapa de desarrollo; el mecanismo de acción del fármaco, su absorción, distribución, procesamiento y estabilidad (Hidalgo, 2021).

Las estadísticas indican que el interés por la Entomotoxicología Forense creció en la década de 1970 por los

enfoques ecológicos, cuando la policía de varios países comenzó a solicitar la ayuda de los entomólogos en forma metódica. El primer reporte fue de Sohal & Lamb (1970), quienes demostraron la acumulación de diferentes metales, incluyendo cobre, hierro, zinc y calcio, en tejido de moscas adultas. En 1982, se detectó mercurio (Hg) en larvas de mosca alimentadas con pescado contaminado y en coleópteros alimentados con las moscas adultas producidas por esas larvas (Nuorteva & Nuorteva, 1982). Beyer et al. (1980) publicaron el primer artículo sobre fenobarbital y posteriormente, Gunatilake & Goff (1989) realizaron la detección de malatión en larvas de mosca de cabeza grande, por cromatografía gaseosa. Goff et al. (1989) realizaron la cría de mosca gris oriental sobre hígado de conejos que recibieron cocaína. En las larvas tratadas se detectaron cocaína y benzoil-ecognina, que estuvieron ausentes en los lotes del control. Además, se encontró que el desarrollo de las mismas se acortó en proporción a la dosis recibida. En casos judiciales Gagliano-Candella & Aventaggiato (2001) también analizaron las muestras para drogas y narcóticos, tales como triazolam, oxazepam, fenobarbital, alimemazina, morfina, cocaína, opiáceos, entre otros. Goff et al. (1993) realizaron la detección de amitriptilina y nortriptilina en larvas y encontraron que las concentraciones no fueron proporcionales a las dosis. De igual modo los autores determinaron

que el desarrollo de colonias era más alargado con dosis altas. En otro trabajo, se realizó el aislamiento de amitriptilina y nortriptilina a partir de puparios de mosquita amarilla y pelechos de larvas de *Dermestes maculatus* DeGeer 1774 (Coleoptera: Dermestidae) (Miller et al., 1994). Asimismo, Goff et al. (1997) utilizaron el espectrómetro de masas y cromatografía líquida para la detección en larvas y puparios de dípteros de 3,4-metilendioximetanfetamina ("éxtasis"). Zanetti et al. (2016) llevaron a cabo la determinación de la fluoxetina en *D. maculatus* mediante el método de espectrometría. Posteriormente, Zanetti et al. (2019) utilizaron dos especies de mosca para la detección post mortem del antidepresivo fluoxetina. También se estudió el desarrollo de *D. maculatus* bajo el efecto de la fluoxetina utilizando dos modelos de administración de fármacos (Zanetti et al., 2021). En otro trabajo, Salimi et al. (2018) analizaron la concentración de morfina en los insectos que colonizaron cadáveres de conejos, determinando que la misma no fue directamente proporcional a la del cadáver. Sin embargo, se pudo identificar de forma precisa la sustancia, por lo tanto, se pudo incluir la presencia de la misma entre las posibles causas de muerte a descartar. En años anteriores, Tracqui et al. (2004) reportaron una serie de 29 necropsias en las que se detectaron compuestos orgánicos (incluyendo benzodiacepinas, barbitúricos,

antidepresivos, fenotiazida, opiáceos, cannabinoides, meprobamato, digoxina y nefopam) en larvas de artrópodos muestreadas en cadáveres humanos, donde se concluyó que el análisis de larvas casi no tuvo interés para el análisis forense práctico, al no observarse coincidencia entre las concentraciones de fármaco en las larvas y las muestras humanas. Ishak et al. (2019) estudiaron la detección de metabolitos de heroína en especímenes inmaduros de *Lucilia cuprina* Weidemann, 1830 alimentados por carne tratada con heroína (500, 1000, 2500, 5000 y 10000 ng/μl). La detección de metabolitos se realizó mediante un análisis de espectrofotometría de masas por cromatografía de gases (GCMS); sin embargo, los metabolitos completos esperados de la heroína no se detectaron en pupas, mientras que las larvas de los estadios II y III mostraron un metabolito completo de la heroína: la morfina (dependiente de la concentración de heroína dada). Los metabolitos de heroína detectados en el segundo y tercer estadio larvario probaron que se producen conversiones bioquímicas en las larvas de mosca.

En las investigaciones entomotoxicológicas, las especies necrófagas pertenecientes al grupo de los Dípteros (moscas) y Coleópteros (escarabajos) son muy recomendables ya que se encuentran comúnmente en las escenas del crimen. Los insectos de tipo Calliphoridae son muy

predominantes y de gran importancia forense ya que generalmente son los primeros artrópodos en localizar el cadáver y en depositar sus huevos en el mismo en cuestión de minutos. Tales insectos detectan los cadáveres principalmente a través del olor de los tejidos en descomposición y/o fluidos, por lo tanto, el conocimiento de las comunidades de insectos locales y su tasa de crecimiento, así como la dinámica de poblaciones es importante para la aplicación de la entomotoxicología con fines forenses. Un fármaco o toxina se puede detectar en las larvas cuando su tasa de absorción excede la tasa de eliminación y por lo tanto se produce una bioacumulación en su interior. Sin embargo, no se conoce con claridad cómo se bioacumulan o se eliminan las drogas en las larvas y cómo afectan los tóxicos al desarrollo de las mismas. Los primeros estudios durante la década de 1970 se centraron en la detección de metales y en los años 80 se evaluaron algunos plaguicidas y medicamentos en los insectos (Sanabria, 2020). El tipo de xenobiótico presente y su concentración podría afectar a la tasa de crecimiento de las especies de moscas, por lo tanto, es esencial comprender los efectos de los xenobióticos y las toxinas en su desarrollo. Teniendo en cuenta la sucesión de insectos que se produce durante la descomposición del cadáver y/o la etapa de desarrollo de los insectos (huevo, larva, pupa o adulto), es posible calcular el tiempo

transcurrido desde el momento de la muerte. Hay estudios que han demostrado que la presencia de las drogas en los insectos podría acelerar, retardar o puede que no tenga influencia en las tasas o ciertos estados de desarrollo. Algunos de estos efectos dependen de la concentración de la droga (por ejemplo, la metanfetamina y la cocaína), mientras que otros simplemente dependen de su presencia. Diversos métodos se han utilizado para las pruebas toxicológicas en este tipo de muestras tales como los inmunoensayos, la cromatografía de gases y la cromatografía líquida. Además, la combinación de cromatografía líquida con espectrómetros de masas en tándem puede proporcionar una mayor sensibilidad y selectividad, con tiempos de análisis y preparación de muestras muy reducidas (Hidalgo, 2021). La determinación de tóxicos a través de los insectos puede ser cualitativa y/o cuantitativa. Por lo cual con lo anteriormente expuesto se llega a la elaboración de un instrumento práctico e innovador, derivando en un Protocolo de Biología para la detección de zopiclona (C₁₇H₁₇ClN₆O₃) en un díptero de importancia forense, *Lucilia sericata* Meigen, 1830 (Diptera: Calliphoridae), utilizando la técnica de la Cromatografía en Capa Fina y considerándola una investigación pionera.

MÉTODOS

Establecimiento de colonias de *L. sericata* en cebos de hígado de pollo

Con el objeto de poder aislar y lograr reproducir para este estudio al insecto de interés forense que en esta investigación fue el díptero *L. sericata*, se utilizaron inicialmente cebos de hígado de pollo, los cuales fueron puestos en pequeñas bolsas plásticas con pequeñas aberturas para mantener la humedad y proveer de oxígeno, fueron colgados en ramas de árboles de un domicilio particular ubicado en la zona de Villa Armonía (-19.021718, -65.265430), región periurbana de la ciudad de Sucre – Bolivia.

Una vez obtenidos los huevos, éstos fueron colectados y colocados en las dietas preparadas para la obtención de larvas III y pupas.

Preparación de dietas

A) Alimento para Control Positivo con Zopiclona.

Se pesaron 40 – 50 g de músculo de cerdo con balanza digital (SCA), se trituró con la ayuda de una procesadora (Philips), y luego se homogeneizó con 15 a 20 ml de agua destilada durante 2 min. A continuación, se pulverizaron comprimidos de zopiclona (Zometic) con la ayuda de un mortero y un pilón obteniendo 200 mg, que se mezclaron con la carne, se homogeneizó nuevamente la mezcla por 2 min, y se vertió la mezcla en un molde.

Posteriormente, se agregaron a la mezcla 50 huevos obtenidos del cebo y se esperó su desarrollo cubriendo el envase de plástico que contenía al cultivo con una tela milimétrica y la ayuda de una liga.

B) Alimento para Control Negativo sin Zopiclona.

Se pesaron 40 – 50 g de músculo de cerdo con balanza digital, se trituraron con la ayuda de una procesadora, luego se homogeneizó con 15 a 20 ml de agua destilada durante 2 minutos, y se vertió la mezcla en un molde. A continuación, se agregaron a la mezcla 50 huevos obtenidos del cebo y se cubrió el envase de plástico que contenía al cultivo con una tela milimétrica con la ayuda de una liga.

Muestreo

Durante el muestreo se colectaron larvas III y pupas que se alimentaron de músculo de cerdo que contenía zopiclona 7,5 mg, luego de ser pulverizado un comprimido en un mortero y pilón de porcelana, denominándolos Control Positivo. Así mismo se colectaron larvas III y pupas que se alimentaron de músculo de cerdo que no contenía zopiclona, denominándolos Control Negativo.

Procedimiento para aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina

Preparación del estándar

Se pulverizó un comprimido de zopiclona 7,5 mg con un mortero y pilón de porcelana, se pesó con una

balanza analítica (AND), se diluyó en 7,5 ml de agua destilada y se conservó entre 2 a 8 °C.

Preparación de muestras (larvas)

Se pesaron 10 larvas de control (+) y luego 10 larvas de control (-) con balanza analítica, en cada muestra se añadió agua destilada, se homogeneizó 10 a 15 min y se filtró. Al líquido filtrado se agregó 5 ml de diclorometano (Thermo Fisher Scientific) : isopropanol (Sigma Aldrich) (85:15), se agitó con vórtex (Velp) durante 15 min, luego se centrifugó (Thermo Scientific) a 2000 rpm por 15 min, y se midió el pH (logrando un medio neutro 7). Posteriormente, se colectó la fase orgánica (el sobrenadante), se evaporó hasta secar en cajas de Petri o relojes de vidrio y finalmente se disolvió con 5 ml de diclorometano : isopropanol (85:15).

Preparación de muestras (pupas)

Se pesaron 10 pupas de control (+) y luego 10 pupas de control (-) con balanza analítica, en cada muestra se añadió agua destilada, se homogeneizó de 10 a 15 min y se filtró. Al líquido filtrado se agregó 5 ml de diclorometano : isopropanol (85:15), se agitó con vórtex por 15 min, luego se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min, y se midió el pH (logrando un medio neutro 7). Posteriormente, se colectó la fase orgánica (el sobrenadante), se evaporó hasta secar en cajas de petri o relojes de vidrio y finalmente se disolvió con 5 ml de diclorometano : isopropanol (85:15).

Corte de láminas de silicagel (sustancia polar sólida porosa): "Fase Estacionaria"

Se utilizaron láminas de silicagel (o placas) TLC60254 (Sigma Aldrich) que se cortaron con el apoyo de una base de vidrio y la ayuda de un scutter se cortó 3,4 cm x 10 cm.

Preparación de fase móvil

Se preparó cloroformo (Thermo Fisher Scientific) : metanol (Sigma Aldrich) (90:10).

Aplicación de estándares y muestras

Se aplicaron 5 μ L del estándar a 1 cm del borde inferior de la placa cromatográfica y de igual forma se aplicaron 10 μ L de las muestras.

Desarrollo de la cromatoplaça

Se midió y colocó en la cámara cromatográfica 5 ml de cloroformo : metanol (90:10), se mezcló y dejó saturar la cámara cromatográfica durante 10 min a 23 °C aproximadamente (para lograr esta temperatura se usó una estufa termoventilador CIMAC). Luego se colocaron las láminas de silicagel dentro de la cámara cromatográfica (Kontes), una vez que se observó la corrida se retiraron las placas de la cámara y se dejaron secar durante 10 min.

Detección o revelado de estándares y muestras

Se observó la cromatoplaça de estándar y muestras con la Lámpara de UV (UVGL-58).

Técnica general de la cromatografía en capa fina

En la cromatografía en capa fina (CCF), se colocó el estándar de zopiclona 7,5 mg y las muestras en cuestión, por lo menos a 1 cm del borde de la placa, se marcó el sitio donde fueron colocados el estándar y las muestras respectivamente, para luego calcular el Rf. La muestra colocada se dejó secar un tiempo prudente dependiendo del solvente en el que se encontraba para evitar coleos y superposición del analito presente en la misma. El extremo de la placa más próximo al sitio o punto donde se colocó el estándar y las muestras, se sumergió en el disolvente de naturaleza compatible al estándar y las muestras contenidas en la cámara adecuada. La cámara cromatográfica se tapó inmediatamente y se observó el movimiento ascendente del frente del disolvente sobre la placa, el estándar y los componentes de la muestra que se desplazaron a diferentes velocidades. Al tratarse de una cromatografía ascendente, se sacó la placa de la cámara cuando el frente recorrió la distancia deseada. Con un lápiz de grafito se marcó la posición alcanzada por el frente del disolvente. Se dejó secar la placa, se observó y registró la posición de las manchas observables con luz ultravioleta. Se hace mención, que diferentes solventes orgánicos en concentraciones conocidas y agua destilada en sí, fueron sometidos al estudio de investigación para elegir cual sería el más indicado para utilizar

como fase móvil, su elección fue de acuerdo a la polaridad de los mismos en relación a la zopiclona y las muestras en cuestión. Estos solventes orgánicos fueron acetonitrilo (Thermo Fisher Scientific), diclorometano, diclorometano : Isopropanol (85:15), cloroformo : metanol (90:10), cloroformo : Isopropanol (95:5), acetonitrilo : metanol (90:10), acetonitrilo : Isopropanol (90:10) y agua destilada. Las condiciones óptimas que se determinaron y favorecieron en la separación del compuesto zopiclona de manera selectiva y eficaz fueron a partir de la composición de una fase móvil como la mezcla de cloroformo : metanol en cantidades de 90:10 ml, respectivamente. En cuanto a la fase

estacionaria se utilizaron las placas mencionadas arriba en cámara cromatográfica saturada por 10 min. El proceso se llevó a cabo en condiciones de trabajo a temperatura de 23 °C y 42% de humedad. La cuantificación se efectuó utilizando la técnica de densitometría UV con una lámpara de deuterio a una longitud de onda de 285 nm. Las disoluciones de las muestras se prepararon a una concentración de 4,25 ml de Diclorometano y 0,75 ml de Isopropanolol y en la cromatopla se aplicaron 10 µL de la disolución preparada. Se utilizó como estándar dentro de la técnica de separación la zopiclona 7,5 mg, la cual se pulverizó y diluyó en 7,5 ml de agua destilada, conservándola a temperaturas entre 4 a 8 °C.

RESULTADOS

Se elaboró y desarrolló un Protocolo para la Determinación de Zopiclona usando un Díptero de Importancia Forense, *Lucilia sericata* (Díptera: Calliphoridae).

Las fases móviles utilizadas para la investigación que no lograron compatibilidad con el estándar ni las muestras (larvas III y pupas de *L. sericata*) para su recorrido en las placas de silicagel son las siguientes: Acetonitrilo p.a, Diclorometano p.a, Diclorometano : Isopropanol (85:15), Cloroformo : Isopropanol (95:5), Acetonitrilo : Metanol (90:10), Acetonitrilo : Isopropanol (90:10), ya que se formaron en algunos casos manchas no definibles y en otros no se observó nada. La fase móvil CLOROFORMO : METANOL (90:10) seleccionada para la investigación por sus características, logró compatibilidad con el estándar zopiclona 7,5 mg y las muestras de larvas III de *L. sericata*, observándose que ambos son poco polares con relación a la placa de silicagel e identificándose dos manchas que se desplazaron respectivamente del punto original, estas fueron del estándar zopiclona de 7,5 mg y de las larvas III de *L. sericata*.

El estándar zopiclona 7,5 mg, produjo los siguientes factores de retención (Rf): 3,2 y 3,5. La muestra colectada de la fase orgánica proveniente de LARVAS III (CONTROL POSITIVO), obtenida de la crianza de *L. sericata* con zopiclona 7,5 mg, indicaron un factor de retención (Rf) de 3,2 igual a uno de los factores de retención del estándar

zopiclona 7,5 mg y otro similar al mismo, teniendo la formación de bandas (Fig. 1). Las muestras colectadas de la fase orgánica provenientes de LARVAS TIPO III (CONTROL NEGATIVO) obtenidas de la crianza de *L. sericata* sin zopiclona 7,5 mg, exhibieron un factor de retención (Rf) de cero, es decir, no se detectó ningún componente ya que el campo se encontraba limpio (Fig. 2). Las muestras colectadas de la fase orgánica provenientes de PUPAS (CONTROLES NEGATIVOS Y POSITIVOS) obtenidas de la crianza de *L. sericata*, mostraron un factor de retención (Rf) de cero, es decir no se detectó ningún componente, por lo tanto, no hubo la formación de bandas (Fig. 3).

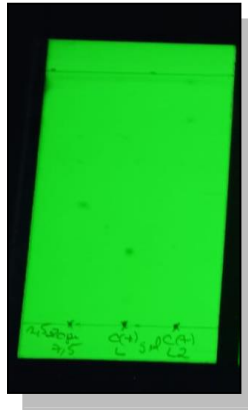


Fig. 1 Cromatoplaca con migración de la muestra larva LIII (c+) similar a la migración del estándar de zopiclona

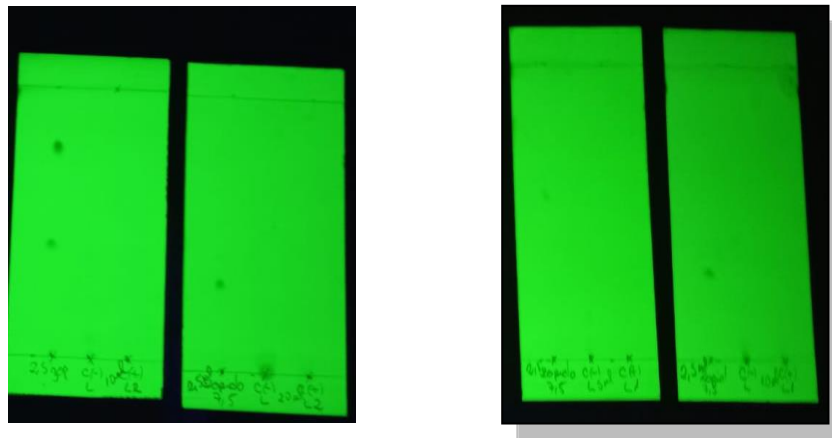


Fig. 2 Cromatoplaca sin migración de muestras larva LIII (c-) con relación a la migración del estándar de zopiclona

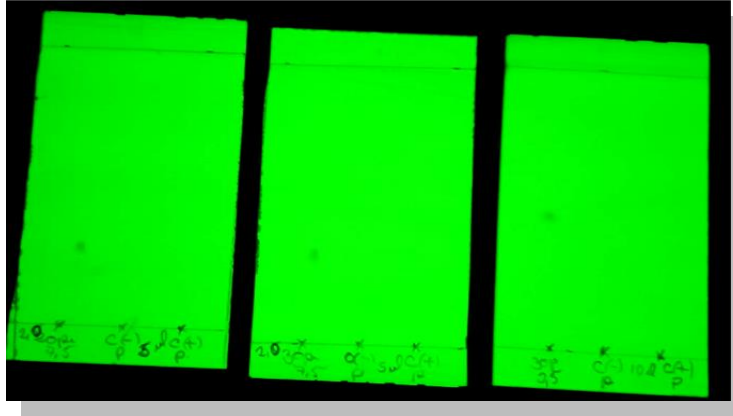


Fig. 3 Muestras de pupas (controles negativos y positivos de *L. sericata* con Rf de 0) con relación a la migración del estándar de zopiclona

DISCUSIÓN

La técnica Cromatografía en Capa Fina (CCF) utilizada en esta investigación demostró ser accesible, rápida y sencilla debido a las pequeñas cantidades que se utilizaron de reactivos, el estándar de zopiclona, muestras de interés forense de larvas III de *L. sericata* y porque no es una técnica sofisticada, es decir que no requiere equipos altamente costosos por lo que puede ser aplicada por los diferentes laboratorios en su etapa preliminar.

Así mismo cabe indicar que el protocolo investigado y presentado servirá de base para ser aplicado en la investigación o búsqueda de otros analitos que podrían estar relacionados a hechos delictivos, también podrá ser aplicado con otras especies de interés forense diferentes a *L. sericata*, pudiendo utilizar otros disolventes o

mediante modificaciones de pH del medio.

La técnica CCF con el transcurrir de los años fue siendo superada en especificidad y sensibilidad por otros métodos analíticos como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o cromatografía de gases masas (CG) entre otras, por lo que por todo lo investigado y experimentado en este tipo de muestras entomológicas y su aplicación de la técnica CCF para la determinación de zopiclona se sugiere que el protocolo correspondiente sea de uso cualitativo, es decir que ayudará a discriminar aquellas muestras que sean negativas, que no tengan ningún contenido de zopiclona y aquellas que cualitativamente sean detectadas con presencia de zopiclona sean confirmadas por un método analítico cuantitativo de mayor sensibilidad pudiendo ser de elección la CG.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Forenses de Bolivia, por su apoyo invaluable en pro del desarrollo de la ciencia.

REFERENCIAS

- Aqel W, Mohamed B. Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography. JPBA [Internet]. 2001; 26(2): 291-299. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00407-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00407-1).
- Beyer JC, Enos WF, Stajic M. Drug identification through the analysis of maggots. JFS.1980; 25: 411-412.
- Cardona A. Separación por cromatografía en capa fina y cuantificación por densitometría UV de cotrimoxazol (trimetoprim + sulfametoxazol); -[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidindiamina y 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol) bencensulfonamida en tabletas y suspensión [Internet]. Tesis de la Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia [Internet]. 2010. Disponible en <https://docplayer.es/71251311-Facultad-de-ciencias-quimicas-y-farmacia-separacion-por-cromatografia-en-capafina-y-cuantificacion-por.html>
- Chicharro M en Sgariglia M, Roldolfo J, Sampietro D, Vattuone, M. Cromatografía: Conceptos y Aplicaciones. R Arakuku, 2010. Año 2. N°1. Universidad Nacional de Tucumán. Disponible en https://notablesdelaciencia.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET_Digital_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c_A.pdf?sequence=2
- Estrada I, Hernández JL, Torres J, Quiroz JDC, Villarreal K. Detection of malathion in dipterous larvae of forensic importance in northeast Mexico. Rev Co Ento [Internet]. 2020 46(1): 1-5. Disponible en <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i1.10166>
- Gagliano R, Aventaggiato L. The detection of toxic substances in entomological specimens. Int Jou Leg Med [Internet]. 2001. 114: 197-203. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s004140000181>
- García JM, Gavilanes JG, Martínez del Pozo A, Montero F, Oñaderra M, Vivanco F. Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica. España. Editorial Síntesis, S.A. 1996.
- Goff ML, Miller ML, Paulson JD, Lord WD, Richards E, Omori AI. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. J Forensic Sci. 1997; 42: 276-280.

- Gunatilake K, Goff ML. Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. *J Forensic Sci.* 1989; 34: 714-716.
- Hidalgo M, Castillo M. *Entomotoxicología Forense en Cadáveres en Estado de Descomposición*. Quito: UCE [Internet]. 2021. Disponible en <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/24457>
- Instituto de Investigaciones Forenses. *Guía de recomendaciones para la colección, envío de muestras – evidencias y exámenes forenses*. Min Púb, Fis Gen Rep de Bo. 2006.
- Keulemans AIM. *Gas Chromatography*. New York. Reinhold Publisher Corp. 1959.
- Miller ML, Lord WD, Goff ML, Donnely B, McDonoug ET, Alexis JC. Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. *J Forensic Sci [Internet]*. 1994. 39: 1305–1313. <https://doi.org/10.1520/JFS13717>
- Ishak N, Ahmad AH, Noor SAM, Ahmad A. Detection of heroin metabolites at different developmental stages of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) reared in herointreated meat: a preliminary analysis. *Egyptian J Forensic Sci [Internet]*. 2019. 9: 65. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0171-1>
- Nollet LML. *Chromatographic Analysis of the Environment*. Jack Cazes, Taylor & Francis, Florida, USA: Chief Ed. CRC Press; 2006
- Nuorteva P, Nuorteva SL. The fate of mercury in sarcosaprophageous flies and in eating them. *Ambio* 11: 34–37. 1982. Disponible en https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200902071423736212
- Parry S, Linton M, Francis PS, O'donnell MJ, Toop T. Accumulation and excretion of morphine by *Calliphora stygia*, an Australian blowfly species of forensic importance. *J Insect Physio [Internet]*. 2011. 57: 62–73. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.09.005>
- Pasto DJ, Johnson CR. *Determinación de estructuras orgánica*., Barcelona: Editorial Reverté; 2008.
- Salimi M, Rassi Y, Oshaghi M, Chatrabgoun O, Limoe M, Rafizadeh S. Temperature requirements for the growth of immature stages of blowflies species, *Chrysomya albiceps* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae), under laboratory conditions. *Egyptian J Forensic Sci [Internet]*. 2018. 8: 1-6. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s41935-018-0060-z>
- Sanabria C. *Un Acercamiento a la Entomología y Entomotoxicología Forense en Bolivia*. Bolivia: CDEA; 2020
- Sgariglia M, Roldolfo J, Sampietro D, Vattuone, M. *Cromatografía: Conceptos y Aplicaciones*. R Arakuku, 2010. Año 2. N°1. Universidad Nacional de Tucumán. Disponible en https://notablesdelaciencia.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONI_CET_Digital_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c_A.pdf?sequence=2

- Tracqui A, Keyseri C, Kintz P, Lides B. Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? *Int J Legal Med* [Internet]. 2004. 118:194-196. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0442-7>
- Trezza FC. *Data de la muerte: las transformaciones cadavéricas*. Argentina: Dos y una Ediciones Argentinas; 2006.
- Zanetti NI, Ferrero A, Centeno N. Determination of fluoxetine in *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) by a spectrophotometric method. *Science & Justice* [Internet]. 2016 56: 464-467. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2016.07.005>
- Zanetti NI, Ferrero A, Centeno N. (2019). The Use of Two Fly Species to Detect the Anti-Depressant Fluoxetine Post-Mortem (Diptera: Calliphoridae: *Lucilia sericata* Meigen, Sarcophagidae: *Sarcophaga crassipalpis* Macquart). *J NY Entomological Soc* [Internet]. 2019.125: 1-4. Disponible en <https://doi.org/10.1664/1947-5136-125.1.4>
- Zanetti NI, Costantino A, Lazzarini N, Ferrero, Centeno N. (2020). *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) development under fluoxetine effect using two drug administration models. *J Forensic Sci* [Internet]. 2020. 66: 245-254. Disponible en <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14575>