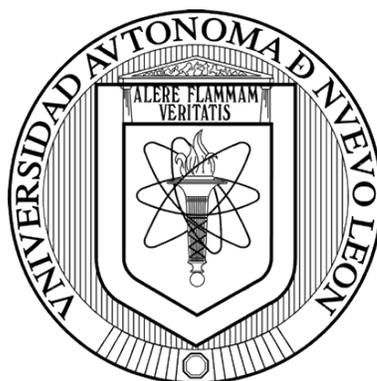


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ESTUDIO ENTOMOTOXICOLÓGICO DE PARATIÓN, CARBOFURANO Y  
COCAÍNA EN LARVAS DE MOSCA CARROÑERA DE INTERÉS MÉDICO  
FORENSE EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN.**

**Por**

**M en C. ELTON SOLÍS ESQUIVEL**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con acentuación en  
Entomología Médica.**

**Octubre, 2014**

**ESTUDIO ENTOMOTOXICOLÓGICO DE PARATIÓN, CARBOFURANO Y  
COCAÍNA EN LARVAS DE MOSCA CARROÑERA DE INTERÉS  
MÉDICO FORENSE EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN.**

**COMITÉ DE TESIS**

---

**Dr. Humberto Quiroz Martínez  
Director**

---

**Dr. Adolfo Caballero Quintero  
Director Externo**

---

**Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez  
Secretario**

---

**Dr. Carlos Hernández Luna  
Primer Vocal**

---

**Dr. Roberto Mercado Hernández  
Segundo Vocal**

---

**Dr. Jorge Armando Verduzco Martínez  
Tercer Vocal**

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios***

Razón y causa del todo, por el origen de la vida y su evolución, por permitirnos ser parte de su creación y más aún contemplarla y estudiarla.

### ***A mi Esposa e Hijos***

Ceci, Diego y Sofía, columna central de mi vida, por todo su apoyo, amor, comprensión y cariño en esta etapa de nuestras vidas y en todo el tiempo que llevamos juntos.

### ***A mis Padres***

Roberto y Gloria, la base de todo lo que soy y a quienes admiro por su dedicación y trabajo en todo lo que emprenden, gracias por todo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mentor y guía del presente trabajo el Dr. Humberto Quiroz Martínez por aceptarme como su alumno, por todo su interés en el proyecto y en mi preparación. Por toda su disponibilidad, por las charlas, los consejos, todo lo que le he aprendido y me falta por aprender.

Al Dr. Adolfo Caballero Quintero, mi maestro en la química analítica, por todas las facilidades brindadas en este proyecto, el interés en mi preparación y su apoyo incondicional.

A la Dra. Adriana Flores Suarez, por su apoyo, atenciones y disponibilidad hacia un servidor y con el presente trabajo.

A la Dr. Roberto Mercado Hernández por sus acertadas observaciones y su participación en el presente.

A los Profesores Dr. Carlos Hernández Luna y Dr. Jorge Armando Verduzco Martínez por sus consideraciones, atenciones y participación.

A los profesores: Dra. Zinnia Molina Garza, Dr. Feliciano Segovia Salinas y Dr. Carlos Solís Rojas, por estar al tanto del proyecto y todos sus consejos.

Al Coordinador del programa de Doctorado en Ciencias con acentuación en Entomología Médica, Ildelfonso Fernández Salas PhD, por aceptarme en el programa y por sus observaciones.

A los Profesores antes mencionados y a Dr. Eduardo Rebollar y Dr. Gustavo Ponce García por sus atenciones y en especial por los valiosos conocimientos que transmitieron hacia un servidor.

Al C. Director del Instituto de Criminalística y Servicios Periciales, de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Nuevo León, MDP. Porfirio Díaz Torres por su apoyo

A la Dirección de Posgrado de Facultad de Biología de la UANL por todas sus atenciones.

Al CONACYT por el apoyo con la beca

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Forense .....	3
2.2 Entomología Forense .....	4
2.2.1 Entomología Forense Urbana .....	4
2.2.2 Entomología Forense de Producto Almacenado .....	5
2.2.3 Entomología Médico Forense .....	6
2.3 Sucesión de insectos en el proceso de descomposición de un cadáver ...	8
2.4 Curvas de crecimiento .....	10
2.5 Entomotoxicología .....	11
2.5.1 Definición .....	11
2.5.2 Efecto en el desarrollo de los estadios inmaduros al alimentarse de tejidos con tóxicos o contaminantes .....	11
2.5.3 Utilización de insectos como espécimen toxicológico alternativo .	12
2.6 Investigaciones realizadas en materia de entomotoxicología .....	13
2.6.1 Efecto en el desarrollo de los estadios inmaduros al alimentarse de tejidos con tóxicos o contaminantes .....	13
2.6.2 Utilización de insectos como espécimen toxicológico alternativo .	15
3. HIPOTESIS.....	18
4. OBJETIVOS .....	19
4.1 Objetivos generales. ....	19
4.2 Objetivos particulares .....	20
5. MÉTODOS.....	21
5.1 Revisión de cadáveres de humano en el Servicio Médico Forense de	

la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León .....	21
5.1.1 Mantenimiento de la colonia .....	23
5.2 Línea de crecimiento de <i>Chrysomya rufifacies</i> obtenida en condiciones de laboratorio .....	24
5.2.1 Línea de crecimiento y tiempo de muda .....	24
5.2.2 Análisis de datos .....	25
5.3 Estimación de la CL <sub>50</sub> de paratión metílico y carbofurano en los tres estadios larvales .....	25
5.3.1 Bioensayos .....	25
5.3.2 Análisis de datos .....	28
5.4 Determinación del efecto en el crecimiento larval de .....	28
<i>Ch. rufifacies</i> expuesta a CL <sub>50</sub> de paratión y carbofurano .....	28
5.4.1 Efecto en cada uno de los estadio larvales .....	28
5.4.1.1 Bioensayos .....	28
5.4.1.2 Análisis de datos .....	29
5.4.2 Efecto de la concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) paratión metílico y carbofurano en el crecimiento de larvas .....	29
5.4.2.1 Bioensayos .....	29
5.4.2.2 Análisis de datos .....	30
5.5 Desarrollo y validación de un método analítico para la determinar cocaína en larvas de moscas. ....	30
5.5.1 Matriz biológica .....	30
5.5.2 Reactivos .....	31
5.5.3 Extracción .....	32
5.5.4 Condiciones del equipo para el análisis .....	32
5.5.4.1 Método cromatográfico .....	32
5.5.4.2 Espectrometría de Masas .....	33
5.5.5 Validación .....	33
5.5.5.1 Selectividad .....	33
5.5.5.2 Recobro de extracción .....	34
5.5.5.3 Linealidad .....	34

5.5.5.4 Exactitud y precisión .....	35
5.5.5.5 Límite de cuantificación .....	35
5.5.5.6 Límite de detección .....	36
5.6 Aplicación del método analítico desarrollado para la determinación... de cocaína en muestra reales. ....	36
5.6.1 Cadáveres de humano examinados.....	36
5.6.1.1 Parte 04 – 10.....	37
5.6.1.2 Autopsias 05-10, 06-10 y 10-10 .....	38
5.6.1.3 Autopsias 07-10 y 08-10 .....	38
5.6.1.4 Autopsia 09-10 .....	38
5.6.2 Colecta de especímenes entomológicos.....	39
6. RESULTADOS.....	40
6.1 Revisión de cadáveres de humano en el Servicio Médico Forense de la Procuraduría General de Justicia en el estado de Nuevo León ...	40
6.2 Línea de crecimiento de <i>Ch. rufifacies</i> obtenida en condiciones de laboratorio .....	42
6.3 Estimación de la CL <sub>50</sub> de paratión metílico y carbofurano en los tres estadios larvales .....	47
6.4 Determinación del efecto en el crecimiento larval de <i>Ch. rufifacies</i> expuesta a CL <sub>50</sub> de paratión y carbofurano. ....	51
6.4.1 Efecto en cada uno de los estadios larvales .....	51
6.4.2 Efecto de paratión y carbofurano en la curva de crecimiento de larvas de <i>Ch. rufifacies</i> .....	53
6.5 Desarrollo y validación de un método analítico para determinar cocaína en larvas de moscas. ....	55
6.5.1 Condiciones Instrumentales .....	55
6.5.1.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución .....	55
6.5.1.2 Espectrometría de Masas en Tándem. ....	56
6.5.2 Validación del método .....	57
6.5.2.1 Selectividad .....	57
6.5.2.2 Recobro de extracción .....	57

6.5.2.3 Linealidad .....	58
6.5.2.4 Exactitud y precisión .....	59
6.5.2.4.1 Intra-día .....	59
6.5.2.4.2 Inter-días .....	59
6.5.2.5 Límite de cuantificación .....	61
6.5.2.6 Límite de detección .....	61
6.6 Aplicación del método a muestras reales. ....	62
6.6.1 Larvas de dípteros positivos para cocaína .....	64
6.6.1.1 larvas colectadas de la parte 04 – 10 .....	64
6.6.1.2 Larvas colectadas de la autopsia 06 – 10 .....	65
6.6.1.3 Larvas colectadas de la chamarra que pertenecieran en vida al cuerpo de la autopsia 09 – 10 .....	67
6.6.1.4 Larvas colectadas de la autopsia 10 – 10 .....	68
7. DISCUSIÓN .....	69
8. CONCLUSIONES .....	78
9. LITERATURA CITADA .....	81
10. RESUMEN BIOGRÁFICO .....	98

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Cadáveres humanos de donde se colectaron insectos de importancia forense en el SEMEFO de la PGJNL durante los periodos de enero a mayo de 2009 y de junio a octubre de 2010 .....	21
2. Concentración de insecticida a las cuales fueron expuestas larvas de <i>Ch. rurifacies</i> .....	27
3. Cadáveres y partes de cuerpos donde se obtuvieron las larvas de dípteros para la determinación de cocaína por el método desarrollado. ....	37
4. Insectos colectados de cadáveres humanos en el SEMEFO de la PGJNL durante los durante los periodos de enero a mayo de 2009 y de junio a octubre de 2010 .....	41
5. Estadísticas descriptivas y comparación sucesiva de la longitud larval de la línea de crecimiento de <i>Ch. rurifacies</i> .....	44
6. Rango de longitud, ancho y tiempo de duración de las larvas de <i>Ch. rufifacies</i> criadas en condiciones de laboratorio. ....	47
7. Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) obtenida para los tres estadios larvales de <i>Ch. rufifacies</i> expuestas a paratión metílico y carbofurano. ....	49
8. Efecto en el crecimiento en los tres estadios de larvales de <i>Ch. rufifacies</i> a la exposición a CL <sub>50</sub> de paratión y carbofurano. ....	52

9. Valores de pendiente e intercepto que describen la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación de las curvas de crecimiento larval de <i>Ch. rufifacies</i> . .....	54
10. Comparación de las líneas de crecimiento larval en presencia de los insecticidas con la generada por un control. ....	54
11. Parámetros dependientes del compuesto optimizados en el Espectrómetro de Masas para la detección de cocaína y benzoilecgonina-D3. ....	56
12. Exactitud y Precisión intra e inter días del métodos analítico para la determinación de cocaína. ....	60
13. Desviación porcentual y precisión del primer punto de la curva de calibración. ....	61
14. Determinación de cocaína en larvas de dípteros colectados de cuerpos humanos, partes anatómicas y prendas de cadáveres de interés médico legal. ....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Línea de crecimiento tomando la longitud de <i>Ch. rufifacies</i> obtenida en condiciones de laboratorio a temperatura de $27 \pm 1$ °C y humedad relativa de $56.09 \pm 7.75$ %.	43
2. Línea de crecimiento tomando el ancho de <i>Ch. rufifacies</i> obtenida en condiciones de laboratorio a temperatura de $27 \pm 1$ °C y humedad relativa de $56.09 \pm 7.75$ %.	43
3. Línea respuesta de paratión sobre larvas de <i>Ch. rufifacies</i> en los tres estadios larvales.	50
4. Línea respuesta de carbofurano sobre larvas de <i>Ch. rufifacies</i> en los tres estadios larvales.	50
5. Líneas de crecimiento de <i>Ch. rufifacies</i> en base a su longitud larval expuestas a la $CL_{50}$ estimada en primer estadio.	53
6. Cromatograma de la inyección de una muestra enriquecida con cocaína ( $t_R = 0.45$ min.) a una concentración de 100 ng/g y el calibrador interno benzoilecgonina-D3 de 800 ng/g. ( $t_R = 0.42$ min).	55
7. Cromatograma de la inyección de una de larva blanco sin calibrador interno	57
8. Curva de calibración del primer día de evaluación de linealidad. $r^2 = 0,998$ .	58
9. Límite de detección: Cromatograma de la inyección de una muestra enriquecida con una concentración de 0,625 ng/g de cocaína, con una relación señal:ruido (S/N) de 3:1	62
10. Fotografía de la pieza 04-10	64

11. Cromatograma de la inyección de la muestra de <i>C. macellaria</i> colectadas de la pieza 04-10 .....	65
12. Cromatograma de la inyección de la muestra de <i>C. macellaria</i> colectadas de la autopsia 06-10 .....	66
13. Cromatograma de la inyección de la muestra de <i>Ch. rufifacies</i> colectadas de la autopsia 06-10 .....	66
14. Fotografía de la chamarra colectada del cuerpo cuya autopsia correspondió la 09-10. ....	67
15. Cromatograma de la inyección de la muestra de <i>M.domestica</i> colectadas de la chamarra que perteneciera en vida al cuerpo de la autopsia 09-10 .....	68
16. Cromatograma de la inyección de la muestra de <i>C. macellaria</i> colectadas de la autopsia 10-10 .....	68

## RESUMEN

La entomotoxicología desde un punto de vista médico legal utiliza a los insectos o artrópodos presentes en el cuerpo como muestra alternativa en la asociación de tóxicos en el cadáver, esto tiene básicamente dos fines, los efectos que tienen los tóxicos en el crecimiento de los insectos con el objetivo de la alteración en el tiempo de estimación postmortem. y la determinación de la presencia del tóxico en el cuerpo en forma indirecta. Ambos aspectos fueron estudiados en el presente trabajo. Se evaluó el efecto que tienen los insecticidas: paratión métilico y carbofurano en  $CL_{50}$ , estimada en el presente trabajo, en el crecimiento larval medido en longitud de *Chrysomya rufifacies* (Díptera:Calliphoridae) especie de interés forense en el estado de Nuevo León, en los resultados obtenidos no se observó una diferencia terminante en el crecimiento al comparar grupos de larvas expuestas a los insecticidas respecto a sus controles libres de los tóxicos en cada uno de los estadios larvales ni tampoco en las líneas de crecimiento generadas al exponer larvas desde su eclosión hasta su etapa de pre pupa a la  $CL_{50}$  estimada en el primer estadio. Por otro lado se desarrolló una metodología para detectar y cuantificar cocaína por medio de estándar interno (benzoilecgonina-D3) en larvas de moscas carroñeras por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas en Tándem, el tratamiento de la muestra (400 mg) consistió en precipitación con acetonitrilo con una recuperación superior a 80 %. Los parámetros de validación evaluados demuestran, alta sensibilidad, adecuada exactitud y precisión. La utilidad de las larvas como espécimen alternativo fue demostrada al utilizar el método en muestras reales de dípteros colonizadores en cadáver de humano de interés forense en el Estado de Nuevo León.

## ABSTRACT

The entomotoxicology from a legal perspective use insects or arthropods present in the carrion as an alternative shown in association toxic in the body, this basically has two purposes, effects of toxics on insect growth with the objective of utilization in the estimation time postmortem and determining the presence of toxic in the body indirectly. Both aspects were studied in this paper. The effect that methyl parathion and carbofuran  $LC_{50}$  in larval growth measured in length of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) was assessed, the fly is a forensic interest species in the Nuevo León state, where the effect was evaluated insecticides results obtained a significant difference in growth when comparing groups insecticide larvae exposed against their toxic free controls in each of the larval instar nor in the generated growth lines with newly hatching larvae to pre pupa stage exposed to  $LC_{50}$  estimated in the first stage. A new High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry tandem analysis methodology was developed for detect and quantify cocaine by internal standard (benzoylecgonina -D3) in larvae of carrion flies, treatment of the sample (400 mg ) consisted of acetonitrile precipitation with a recovery above 80 % . The validation parameters evaluated demonstrate high sensitivity, adequate accuracy and precision. The usefulness of the larvae as an alternative specimen was shown to use the method in real samples of Diptera colonizers in human body of forensic interest in the Nuevo León state.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Entomología Forense se divide en tres ramas: Entomología Forense de Producto Almacenado, Entomología Forense Urbana y Entomología Médica Legal, siendo de esta última la mayor área de estudio por la estimación del intervalo post-mortem a través del crecimiento y desarrollo de insectos presentes en el cuerpo en descomposición, así como la sucesión de estos en el cadáver. Otra área de interés médico criminal es la Entomotoxicología en la que los insectos o artrópodos presentes en el cuerpo sin vida son utilizados como muestra alterna con dos fines: la determinación de la presencia del tóxico en el cuerpo en forma indirecta y los efectos que tienen en el crecimiento de los insectos, con el objetivo de determinar la alteración en el tiempo de estimación postmortem.

Las especies necrófagas constituyen la primera oleada de insectos en una carcasa, aparecen inmediatamente después de la muerte; numerosas especies de moscas (Díptera) y escarabajos (Coleóptera) son atraídas por cadáveres de donde ellos se alimentan, viven y crían dependiendo las preferencias biológicas y el estado de descomposición (Zepeda, 2012). La información que pueden proveer, como evidencia biológica, es muy valiosa y poco aprovechada.

En una investigación criminal, conocer si una persona fue expuesta a tóxicos antes de su muerte representa una información invaluable al contribuir en el esclarecimiento de la causa. Sin embargo, existe discrepancia en cuanto a los métodos de

detección y correlación entre la concentración encontrada en los tejidos del cuerpo y la presente en las larvas de dípteros que se alimentan del cuerpo sin vida (Campobasso *et al.*, 2004).

La mayor parte de la literatura se enfoca en tóxicos considerados sustancias ilícitas como drogas o medicamentos, muy poco se ha estudiado con relación a los insecticidas aún y cuando la intoxicaciones letales por estas sustancias resulta en incidencia semejante a la ocasionada por los considerados psicotrópicos y estupefacientes.

La susceptibilidad de los insectos ha sido evaluada a los diferentes grupos toxicológicos de insecticidas; sin embargo, tales efectos de los plaguicidas en especies necrófagas de importancia forense son escasos. Establecer la identidad del tóxico o algún metabolito presente en las larvas de mosca necrófaga ayudaría a reconsiderar una estimación del tiempo postmortem o causa de muerte ya que los tóxicos pueden influir en el crecimiento, la rapidez de desarrollo y talla de los insectos necrófagos (Byrd y Castner, 2001). Hasta el momento, no se han reportado valores de concentración letal media de tóxicos ( $CL_{50}$ ) en larvas de dípteros carroñeros; además de cómo influye en su crecimiento la exposición a concentraciones subletales de los mismos, en el presente estudio ambos aspectos fueron considerados como motivo de investigación.

Una de las principales sustancias ilícitas de mayor incidencia de consumo en la población es la cocaína, esta sustancia como tal se relaciona con el crimen en diferentes aspectos de la muerte ilegal, por tal motivo se desarrolló, validó y aplicó una metodología analítica apropiada para la detección de cocaína en larvas de moscas carroñeras como espécimen alternativo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Forense

En la actualidad, en el noreste de México la violencia extrema es tan lamentablemente familiar que los términos y expresiones como “ejecución”, “cocinar”, “levantón”, “topetón”, “dar piso”, “ajuste de cuentas”, entre otros, describen un significado propio o coloquial y ajeno a su significado literal ya que están muy relacionados por la opinión pública con un hecho delictivo.

Bajo este escenario de confusión de términos y la influencia de series de televisión como CSI (Crime Scene Investigations), Medical Detectives, Extreme Forensics, Boones, etc.), resulta interesante que el término forense se relacione más a muerte en un sentido criminal que a su verdadero y simple significado “Forense”, de foro (del latín *fórum*), describe un lugar público, una tribuna y como tal con audiencia, manera en la que se llevan a cabo las audiencias judiciales en general para esclarecer conflictos en un marco de legalidad.

De tal forma que un forense es aquel que participa en un foro judicial en el sistema de un Estado. Es común encontrar que como adjetivos los términos “legal” y “forense” se usen indistintamente, estos se deberán considerar correctamente como sinónimos (Cabanellas, 2003).

## **2.2 Entomología Forense**

Básicamente la Entomología Forense es la interacción entre la rama de los insectos y el sistema judicial, esto se da cuando los propios insectos o sus acciones puedan ser utilizados como evidencia (Goff, 2003; Capinera, 2008). En el sentido de esta definición el objeto de estudio son los insectos como indicio y como tales pueden considerarse como testigos mudos pero veraces de un delito o crimen. Generalmente es mejor conocida por una de sus ramas la Entomología Médica Forense, de hecho ambos términos son mencionados indistintamente y hasta por los mismos Entomólogos (Goff, 2003) además cuenta con dos ramas más de estudio: la Entomología Forense Urbana y la Entomología Forense de Producto Almacenado (Hall, 2008 y 2010).

### **2.2.1 Entomología Forense Urbana**

Es el estudio de una gran variedad de insectos de interés legal, principalmente como resultado de los daños que causan a una casa habitación, por ejemplo las termitas y escarabajos que causan destrucción en madera; derméstidos que dañan y destruyen pieles de animales de adorno o vestimenta. Además de los insectos que son considerados también como plagas urbanas, siempre y cuando estén dentro de un proceso legal (Byrd y Castner, 2001).

En México, la aplicación de esta rama está documentada en la NOM-144-SEMARNAT-2012 (SEMARNAT, 2012) aún y cuando no se menciona el término es

necesaria su aplicación para determinar la presencia de una plaga viva en madera embalada y certificada bajo la norma, tal incumplimiento estaría sujeto a una infracción la cual se sancionaría en los términos de la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable, su reglamento y demás disposiciones legales aplicables.

Otra implicación legal bajo esta misma rama son los daños y perjuicios ocasionados por moscas en la propiedad de los residentes cercanos al área donde se encuentra ganado, granjas o instalaciones con material orgánico en descomposición. El potencial daño de estas moscas no solo es material, como en la depreciación de las propiedades, es también en el de salud pública ya que en general son consideradas como vectores mecánicos de enteropatógenos.

### **2.2.2 Entomología Forense de Producto Almacenado**

Bajo esta categoría se encuentra el estudio de insectos asociados en productos generalmente alimenticios. Ejemplos, en sentido normativo de la aplicación de la Entomología Forense de Producto Almacenado son el estudio de insectos o sus partes consideradas como materia extraña en productos como cereales y harinas que se encuentran regulados por la Secretaría de Salud, NOM-147-SSA1-1996(SSA, 1999). En esta misma rama los insectos son considerados como fauna nociva asociados a los establecimientos que se dedican al proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios de acuerdo a la NOM-251-SSA1-2009 (SSA, 2010).

### 2.2.3 Entomología Médica Forense

En esta rama, los insectos en estudio son todos los que puedan ser utilizados en el esclarecimiento de crímenes perpetrados contra humanos o vida silvestre, en ocasiones el término puede expandirse hasta incluir otro tipo de artrópodos (Gennard, 2007; Hall, 2008, 2010). En el caso de investigaciones forenses, en las que se inicien o relacionen a cadáveres, las aplicaciones generalmente se enfocan en el estudio de dípteros y escarabajos. En algunas familias, solo los estadios juveniles son los que se alimentan y consumen el cadáver, en otros tanto juveniles como imagos se alimentan del cuerpo. La Entomología Médica Forense puede ayudar a esclarecer los acontecimientos previos e incluso posteriores al fallecimiento de la persona.

Insectos necrófagos, principalmente de los órdenes díptera y coleóptera, son atraídos por el cadáver y lo hacen en una sucesión característica; otros insectos del orden coleóptera y de diferentes órdenes e incluso otras clases de artrópodos, son atraídos por el cuerpo en descomposición debido a que son depredadores y parasitoides de los insectos presentes, estos grupos de artrópodos también son útiles en la investigación en criminalística (Goff, 2003; De Jong y Hoback, 2006; Silva-Mello y Aguiar-Coelho, 2009; Zepeda 2012).

Con base en la estimación de la edad de los insectos necrófagos o bien por el análisis de la composición de especies sobre el cuerpo, ecología, distribución geográfica y comportamiento, es posible la estimación del intervalo post-mortem (Ament *et al.*, 2011), el estudio es quizá el más conocido que cualquier otro, quizá porque para los investigadores criminales responde la primer pregunta y constante que se formula al ver un cadáver en descomposición y esta es ¿cuándo?, sin embargo, esto no implica que sea

el más importante, si bien siempre es necesario establecer el momento del fallecimiento en una investigación, también es importante determinar o detallar la causa, el mecanismo, los sucesos y las condiciones relacionadas con el deceso.

Además de lo antes descrito, nuevos campos o aplicaciones de la entomología forense se han establecido, entre ellos los estudios toxicológicos y moleculares que se llevan a cabo en los insectos presentes en el cuerpo en descomposición que puede ayudar a determinar, además de la causa de muerte, la identidad de la víctima gracias a la asociación de las larvas con su alimento, por ejemplo cuando el cuerpo ha sido deliberadamente removido y las larvas aún están presentes en el lugar (Ament *et al.*, 2011).

Algunas especies de moscas no solo están presentes en el cadáver, también están presentes en cuerpo vivo causando una infestación conocida como miasis, la cual en algunos casos pueden llegar a ser mortal, generalmente cuando se asocia con lesiones cerebrales o de otras partes del sistema nervioso (Zúñiga, 2009; Díaz *et al.*, 2011). El estudio de las larvas, en estos casos, puede ser utilizado en conjunto con las observaciones médicas en la autopsia para determinar la causa de la muerte

El conocimiento del sustrato alimenticio y la forma de alimentarse de los insectos también es utilizando en materia médico legal, por ejemplo: la caracterización de manchas de sangre proveniente de las moscas al regurgitar y excretar fluidos del cadáver en las superficies cercanas, esto es útil para identificarlas y diferenciarlas de la sangre proyectada proveniente del impacto o laceración violenta sobre el cuerpo en el momento del crimen, de tal forma que no interfieran en la determinación del lugar del hecho violento en el que se proyectó la sangre del cuerpo (Bevel y Gardner, 2008; Zuha, *et al.*, 2008).

Las lesiones causadas por la actividad alimenticia de las hormigas sobre la piel del cadáver pueden ser confundidas con las lesiones causadas por una gran variedad de armas utilizadas sobre el cuerpo, tanto postmortem como antemortem, la caracterización de las lesiones causadas por hormigas es útil en su identificación al momento de la autopsia en donde se podría mal interpretar el hallazgo (Byrd, 2005). No solo la actividad de los insectos sobre o en el cadáver es útil en la investigación criminal, también la actividad que se desarrolla posterior al contacto con el cadáver, tal es el caso del movimiento del cuerpo seguido de la muerte.

### **2.3 Sucesión de insectos en el proceso de descomposición de un cadáver**

Se han utilizado diferentes medios para el análisis de las especies de insectos necrófagos asociadas a un cadáver. Una de las mejores fuentes de información proviene de los mismos casos de homicidios previos que cuenten con registros detallados de las especies encontradas. Diversos autores han recopilado información valiosa a partir de numerosos estudios de caso en los que se describen las circunstancias bajo las cuales se presentan diferentes especies y la forma en que contribuyen a la resolución de crímenes (Benecke, 2004; Nava-Hernández *et al.*, 2007; Quiroz-Martínez y Rodríguez-Castro, 2007; Molina-Chávez *et al.*, 2010; Simmons *et al.*, 2010).

De esta forma, y por primera vez, se han obtenido registros de especies de insectos con importancia forense, como es el caso de *Chrysomya rufifacies* Macquart que fue informada en Tailandia en un cuerpo sin vida de un varón de 40 años de edad, aun cuando no existían registros previos de este califórido para la región del hallazgo (Sukontason *et al.*, 2001). De forma similar, *Megaselia scalaris* (Loew) que fue

encontrada por primera vez en el sur de Italia durante la exhumación de un cuerpo (Campobasso *et al.*, 2004).

Conforme ha cobrado interés la Entomología Forense, se ha hecho énfasis en la ecología de las comunidades de insectos sarcosaprófagos. Los estudios más frecuentes en este campo han sido aquellos encaminados a describir la sucesión de especies en cadáveres. Para fines científicos, el cuerpo humano constituye la mejor y más confiable fuente de información forense (Byrd y Castner, 2001; Vergara-Pineda *et al.*, 2009).

Los restos humanos son difíciles de conseguir por lo que dificultan los estudios con este tipo de cadáveres, además de requerir sitios especiales donde llevar a cabo los estudios. Por esta razón, el cerdo *Sus scrofa* ha sido considerado como el modelo más apropiado en estudios forenses. Es un animal omnívoro, tiene fauna intestinal que se asemeja a la del humano, carece relativamente de pelo y tiene una piel muy similar a la del humano (Anderson y Van Laerhoven 1996).

La estructura de las comunidades de insectos y tasas de descomposición en cuerpos de humanos de adultos e infantes fueron comparados con aquellos presentes en el cerdo, encontrando que no existe diferencia significativa en la composición. La putrefacción de cerdos sucede al mismo ritmo que en los seres humanos que tienen el mismo peso (Campobasso *et al.*, 2001).

Cadáveres de todo tipos y tamaños han sido utilizados en estudios de descomposición, el listado incluye ovejas (Deonier, 1940), conejillos de indias (Bornemissza, 1957), cerdos (Payne 1965; Tullis y Goff, 1987; Haskell, 1989; Anderson y Van Laerhoven, 1996; Tessmer *et al.*, 1995; Richards y Goff, 1997; Byrd, 1998; de Carvalho *et al.*, 1999; Shaid *et al.*, 1999; Davis y Goff, 2000; de Carvalho y Linhares, 2001; Wolff *et al.*, 2001; Tenorio *et al.*, 2003; Watson y Carton, 2003; Centeno, 2007;

Gruner *et al.*, 2007; Quiroz-Martínez y Rodríguez-Castro, 2007; Flores-Pérez *et al.*, 2007; Biavati *et al.*, 2010; Molina-Chávez *et al.*, 2010; Sabauoglu y Sert, 2010; Simmons *et al.*, 2010; Mulieri *et al.*, 2012), zorros (Easton y Smith, 1970; Smith, 1975), lagartijas y sapos (Cornaby, 1974), conejos (Denno y Cothran, 1975; Tantawi *et al.*, 1996; Bourel *et al.*, 1999; Calderon-Arguedas *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2010; Bachmann y Simmons, 2010). El listado continua con ardillas (Johnson, 1975), ratones de campo (Lane, 1975) elefantes (Coe, 1978), ratones (Putnam, 1978; Blackith y Blackith, 1989), impala (Braack, 1981), perros (Jiron y Cartin, 1981; Early y Goff, 1986; Richards y Goff, 1997), tortugas (Abell *et al.*, 1982), focas (Lord y Burger, 1984b), gaviotas (Lord y Burger, 1984<sup>a</sup>), gatos (Early y Goff, 1986), ratas (Greenberg, 1990; Tomberlin y Adler, 1998; Faucherre *et al.*, 1999; Kocarek, 2001; Simmons *et al.*, 2010), aves de corral (Hall y Doisy, 1993; Quintero-Martínez *et al.*, 2007), osos negros (Anderson, 1998; Peters, 2003; Watson y Carlton, 2003; Vannin *et al.*, 2007), mapaches (Joy *et al.*, 2002), lagartos (Watson y Carlton 2003) y venados (Watson y Carlton 2003).

#### **2.4 Curvas de crecimiento**

El periodo entre la muerte y el descubrimiento de un cadáver, llamado como intervalo postmortem (IPM), es de gran valía en la reconstrucción de los eventos que rodean a la muerte de un ser humano; los entomólogos pueden estimarlo usando las larvas más viejas que puedan encontrarse en los restos (Gallagher *et al.* 2010). Un gráfico que demuestre el crecimiento de las larvas por horas es de mucho apoyo para estimar el tiempo, pero aun seguirá siendo importante aplicar la metodología para determinar las unidades calor acumuladas expresadas en términos de horas para definir un tiempo más aproximado al momento de los hechos; es bien sabido que el desarrollo

de los insectos se ve influenciado por la temperatura ambiental. Esta es la información que requiere ser obtenida bajo un esquema de localidad debido a las adaptaciones que la población de las mismas especies han adquirido a través del tiempo en su lugar de origen.

## **2.5 Entomotoxicología**

### **2.5.1 Definición**

Es un término que se le ha dado al análisis de tóxicos en artrópodos que se alimentan de carroña (principalmente en moscas y escarabajos). Sus principales objetivos han sido: la utilización de insectos carroñeros como un espécimen toxicológico alternativo del cuerpo o remanentes del que se alimentan y el estudio del impacto que tienen los tóxicos o contaminantes presentes en los tejidos en el desarrollo de los estadios inmaduros (Goff y Lord, 2010; Murthy y Mohanty, 2010).

### **2.5.2 Efecto de tóxicos en el desarrollo de los estadios inmaduros.**

Una de las bases de la estimación del intervalo post mortem, particularmente entre las primeras dos a cuatro semanas, es que se asume que los insectos se desarrollaran a una razón predecible dada por las condiciones ambientales. Si bien es cierto que existe influencia de la temperatura en el metabolismo y desarrollo del insecto, existen factores que pueden influenciar y por lo tanto deben de tomarse en cuenta los siguiente: la presencia de la masa de larvas que por su actividad puede generar una temperatura mayor a la ambiental, causando un incremento en la tasa de crecimiento (Higley y Haskell, 2010); el tipo de alimento, el cual determina la calidad nutrimental de

la dieta; la presencia de tóxicos o contaminantes, estos últimos pueden tener un efecto en los insectos carroñeros acelerando o desacelerando su crecimiento, dependiendo de la sustancia y concentración de la misma.

### **2.5.3 Utilización de insectos como espécimen toxicológico alternativo.**

Como parte de la autopsia de un cadáver se colectan diversas muestras para llevar a cabo estudios con el objetivo de determinar las condiciones o posibles causas de su muerte. En el caso de estudios toxicológicos, las muestras que son colectadas son de dos tipos: primero fluidos como sangre, orina y bilis; en segundo lugar tejidos sólidos como el hígado, cerebro y riñones, incluso el contenido gástrico es útil (Villanueva, 2010; Martínez y Hernández, 2010).

La colecta de las muestras requeridas para el análisis no presenta mayor problema en cuerpos de muerte reciente o en estado fresco, los fluidos y tejidos se encuentran presentes y distinguibles con facilidad para el investigador; sin embargo, este trabajo se torna complicado al tratar de llevar a cabo la colecta de las muestras y su estudio en estados de descomposición subsecuentes al fresco, que en orden secuencial son: hinchado, putrefacción, putrefacción tardía y esqueletización. Históricamente ha sido difícil obtener información toxicológica del cadáver (Goff y Lord, 2010; Villanueva, 2010), la razón es que los especímenes para estudio no se encuentran o han sido modificados, mezclados y degradados.

Un espécimen alterno para estos estudios son las larvas de moscas, las razones que las hacen viables son las siguientes:

- Por su disponibilidad en los estados de descomposición siguientes a la etapa fresca del cadáver. En los primeros instantes que siguen a la muerte, a veces ya en agonía,

ciertos insectos, como las moscas, acuden a poner sus huevos sobre los cadáveres, en los que eligen determinadas partes: hendidura palpebral, comisura de los labios, abertura vulvar, etc., de tal forma que las larvas están presentes alimentándose del cuerpo en las siguientes etapas de descomposición (Villanueva, 2010).

- Como matriz analítica para su análisis, las larvas ofrecen una composición controlada. A diferencia del tejido del que se alimentan, por razones fisiológicas compatibles con su vida, las larvas deben mantener una homeostasia, razón por la cual mantienen cierta composición controlada a lo largo de sus estadios.
- Presentan bioacumulación de tóxicos. Se ha encontrado suficiente evidencia que indica que las larvas de moscas que se alimentan con sustratos contaminados con algunos tóxicos presentan una concentración del mismo superior a la presente en el sustrato (Goff y Lord, 2010).

## **2.6 Investigaciones realizadas en materia de entomotoxicología.**

### **2.6.1 Efecto en el desarrollo de los estadios inmaduros al alimentarse de tejidos con tóxicos o contaminantes.**

Generalmente, las moscas de la familia Calliphoridae son las estudiadas para determinar el efecto que tienen en su crecimiento larval diversos tipos de sustancias tóxicas, ilícitas y no ilícitas. Las especies estudiadas son las que se encuentran en las regiones en donde se llevan a cabo los estudios, aún y cuando estas no son endémicas, por su presencia y actividad, son de interés forense en la región.

Altunso y Basaran (2011), evaluaron el efecto del talio en la tasa de crecimiento en larvas de *Lucilia sericata* Meigen (Díptera: Calliphoridae), observaron que el tiempo

requerido para llegar a la máxima longitud larval fue significativamente mayor en las larvas alimentadas con sustrato contaminado con concentraciones de: 0.12, 0.25, 0.50, 1.00 y 2.00  $\mu\text{g/g}$ , respecto a un control alimentado con sustrato libre del metal.

También, se han evaluado las sustancias de comercialización ilegal, Lopes de Carvalho *et al.*, (2012), evaluaron el efecto en el crecimiento de larvas de *Chrysomya putoria* Wiedemann (Díptera: Calliphoridae) y *Chrysomya albiceps* Wiedemann (Díptera: Calliphoridae), alimentadas con hígado de conejo sacrificado con concentraciones letales de cocaína, ellos encontraron que el crecimiento larval fue acelerado en los tratamiento con cocaína respecto al control.

George *et al.*, (2009), estudiaron el efecto de la morfina en el crecimiento larval de *Calliphora stygia* Fabricius (Díptera: Calliphoridae), a quienes se les proporcionó alimento para perro con tres diferentes concentración del tóxico: 2.00, 10.00 y 20.00  $\mu\text{g/g}$ ; determinaron en base a mediciones de longitud larval que no existió diferencia significativa en ninguna concentración evaluada respecto al control.

Estudios, con el mismo objetivo, se han llevado a cabo al evaluar el efecto de insecticidas. Liu *et al.*, (2009) y Wei *et al.*, (2010), reportaron que la presencia de malatión en el sustrato, disminuyó la tasa de crecimiento larval de *Chrysomya megacephala* Fabricius (Díptera: Calliphoridae) y esto puede alterar la estimación del intervalo post mortem. Wei *et al.*, (2010); reportaron que las larvas de especie de moscas más abundantes en los cadáveres de conejos tratados con dosis letal y dosis media letal fueron de *Ch. megacephala*. Por otra parte Abd El-bar y Sawaby, (2011), encontraron que no existe diferencia entre las especies de insectos colonizadores en cadáveres de conejos intoxicados con pirimifos metil respecto a los de cadáveres de conejos control

sacrificados por asfixia, la especie de mayor abundancia fue *Ch. albiceps*, la cual constituyó el 76% de todas las muestras colectadas.

Martínez *et al.*, (2009), compararon la secuencia de aparición de entomofauna necrófaga en cerdos *Sus scrofa* intoxicados con dosis letales de paratión metílico y los compararon con controles sacrificados humanitariamente; encontró que las larvas presentes, tanto en los tratamientos como en los controles fueron las mismas familias de dípteros (Calliphoridae, Musidae, Piophilidae y Sarcophagidae) y coleópteros (Histeridae, Staphylinidae, Cleridae, Dermestidae, Scarabaeidae, Silphidae, Nitidulidae y Trogidae).

En los estudios antes mencionados exponen a las larvas a concentraciones letales, sin embargo no se ha estimado aún la susceptibilidad en términos de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en estadios larvales de moscas carroñeras de interés forense, así como tampoco el efecto de estas concentraciones subletales en el crecimiento. Resulta interesante considerar experimentar con insecticidas, primero porque estas sustancias son utilizadas para controlar insectos y segundo porque los humanos estamos expuestos a ellos ya sea de forma accidental, negligente y hasta intencional (Gupta, 2006).

### **2.6.2 Insectos como espécimen toxicológico alternativo.**

Diversos estudios, con diferentes metodologías y técnicas analíticas, se han desarrollado con la finalidad de detectar y cuantificar tóxicos de interés médico legal en larvas de moscas principalmente de la familia Calliphoridae. Gosselin *et al.*, (2010), desarrollaron y validaron un método para la detección y cuantificación de metadona y uno de sus metabolitos en larvas de tercer estadio de *L. sericata*; la extracción de los

analitos se llevó a cabo con 1-clorobuteno pulverizando el cuerpo completo de las larvas, posteriormente el extracto fue secado y resuspendido en fase móvil, la recuperación fue mayor al 66%, el análisis de detección y cuantificación fue en un Cromatógrafo de Líquidos acoplado a un Espectrometría de Masas en Tándem (CLAR-EM-EM).

Kharbouche *et al.*, (2008), confirmaron la utilidad de las larvas de moscas como espécimen alterno en estudios de toxicología al determinar la presencia de codeína en larvas, pupas e imagos de *L. sericata*, las cuales fueron previamente alimentados de hígado de cerdo contaminado con el tóxico; además evaluaron el efecto en el desarrollo, encontraron que las larvas alimentadas con el sustrato contaminado retrasó su desarrollo en comparación con las que consumieron el sustrato control libre de tóxico.

Bushby *et al.*, (2012), examinaron el potencial de las larvas de *L. sericata* y *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Díptera: Calliphoridae), como material alternativo para la determinación de metilfenidato, mediante extracción líquido-líquido con la que recobraron el 80% y su análisis por Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem. Determinaron además la bioacumulación del tóxico al encontrar una concentración superior en las larvas respecto al sustrato consistente en cerebro de cerdo contaminado.

Los estudios anteriormente citados, coinciden en que las larvas de moscas carroñeras fueron útiles como espécimen alterno en los estudios de toxicología postmortem. En el Estado de Nuevo León, las sustancias ilícitas de mayor incidencia en investigaciones forenses son marihuana y cocaína. Al comparar ambas sustancias, resulta de mayor interés experimentar con la cocaína debido a que no existen reportes en todo el mundo que establezcan una muerte por sobredosis por consumo del vegetal

Musshof, 2004), en contraste con la cocaína en donde incluso en el estado de Nuevo León ya han sido documentadas.

Por otra parte, el tiempo que tarda el cuerpo humano en desintoxicarse posterior al consumo de las sustancias activas de la marihuana (cannabinoides) son considerablemente mayor a la cocaína y sus metabolitos, esto se debe a que las provenientes del Cannabis, por su naturaleza lipofílica, son retenidas en los tejidos grasos lo que convierte al cuerpo humano en un organismo bioacumulador de estas sustancias (hasta por 30 días), en contraste la cocaína y sus metabolitos son eliminados con una mayor rapidez del cuerpo humano (de 3 a 4 días), esto significa que la concentración de cocaína en el cuerpo decae a niveles trazas incluso indetectables. Por lo anteriormente mencionado justifica a la cocaína como una droga de interés para desarrollar la metodología de detección en larvas de moscas.

### **3. HIPÓTESIS**

Ante la nula información generada sobre Entomotoxicología en México, considerando la importancia y relevancia que traerán metodologías y resultados que puedan ser reproducibles y que apoyen la investigación en criminalística se han planteado las siguientes hipótesis:

La exposición de larvas de moscas de importancia forense a tóxicos como las sustancias insecticidas paratión metílico y carbofurano, diseñadas para controlar químicamente a plagas de insectos, así como su potencial incorporación a la biomasa de la larva, modifica el patrón de crecimiento y desarrollo larval de moscas de una especie de interés forense en el estado de Nuevo León, México.

La técnica analítica de Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem determina de forma indirecta la presencia de cocaína en cuerpos humanos en el estado de Nuevo León, México, utilizando larvas de dípteros carroñeros como muestra alterna de análisis.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivos Generales**

Generar información relativa al ciclo de vida, al efecto y detección de tóxicos en larvas del *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae).

## 4.2 Objetivos Particulares

1. Identificar la entomofauna en cadáveres de humano en el Servicio Médico Forense de la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León, durante el periodo de enero a mayo de 2009.
2. Construir una línea de crecimiento para *Chrysomya rufifacies* (Díptera: Calliphoridae) en condiciones de laboratorio.
3. Estimar de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de paratión metílico y carbofurano en los tres estadios larvales de *Chrysomya rufifacies* (Díptera: Calliphoridae).
4. Determinar el efecto de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de paratión metílico y carbofurano en el crecimiento larval de *Chrysomya rufifacies* (Díptera: Calliphoridae).
5. Desarrollar y validar la metodología para la detección y cuantificación de cocaína en larvas carroñeras, mediante la técnica de Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas.
6. Aplicar la metodología estandarizada para la detección y cuantificación de cocaína en larvas carroñeras obtenidas de cadáveres humanos en el estado de Nuevo León.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

### **5.1 Revisión de cadáveres de humano en el Servicio Médico Forense de la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León.**

Durante los periodos de enero a mayo de 2009 y de junio a octubre de 2010 fueron revisados un total de 20 cuerpos sin vida, correspondiendo a 10 por cada periodo, los cuerpos fueron examinados en el Servicio Médico Forense (SEMEFO) de la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León (PGJNL) (Tabla 1), tratando de encontrar insectos de importancia forense que hayan colonizado los cadáveres, enfocándose principalmente a la colecta de larvas de dípteros.

De la base de datos que elaboran estos organismos procuradores de justicia fue tomada la información de utilidad para este estudio, de la cual en 10 casos se encontraron insectos en alguna etapa del desarrollo, correspondiendo tres para el año del 2009 y siete para el 2010. Por razones de seguridad y sigilo el número de autopsia o parte anatómica no corresponde al establecido en el SEMEFO, el descrito en el presente escrito solo es ilustrativo y fue asignado en forma consecutiva y el año de recolección en los cuerpos que presentaron colonización. Como podrá apreciarse en la tabla el estado de descomposición es muy importante de registrar ya que podrá correlacionarse con la colonización y el tiempo postmortem, el mecanismo de deceso implica para el conocimiento común la causa de muerte.

Tabla 1. Cadáveres humanos de donde se colectaron insectos de importancia forense en el SEMEFO de la PGJNL durante los periodos de enero a mayo de 2009 y junio a octubre de 2010.

Autopsia	Estado de descomposición	Fecha	Mecanismo de deceso
01 – 09	Putrefacción	enero 2009	Homicidio
02 – 09	Fresco	marzo 2009	Enfermedad
03 – 09	Saponificación	abril 2009	Homicidio
Parte 04-10	Putrefacción	junio 2010	Se desconoce
05-10	Putrefacción	marzo 2010	Homicidio
06-10	Putrefacción	marzo 2010	Homicidio
07-10	Putrefacción	marzo 2010	Enfermedad
08-10	Putrefacción	abril 2010	Enfermedad
09-10 <sup>a</sup>	Fresco	mayo 2010	Homicidio
10-10	Putrefacción	septiembre 2010	Homicidio

<sup>a</sup> El sustrato donde se colectó fue una prenda tipo sudadera, de fabricación sintética, impregnada de sangre del cadáver.

Cada uno de los cuerpos fue examinado previo a la autopsia, las evidencias entomológicas fueron colectadas directamente con las manos cubiertas con guantes de látex y pinzas de exploración quirúrgica, posteriormente fueron colocadas en el interior de recipientes de plástico de un litro con 300 g de hígado fresco de res, el cual fue cubierto con malla de nylon para permitir su ventilación y se mantuvo en el interior de una incubadora a una temperatura constante de 30 °C, con una humedad relativa del

70%. Alcanzada la etapa post-alimentaria, las larvas fueron colocadas en otro recipiente con tierra seca para su etapa de pupa. Una vez emergidos, los adultos fueron separados e identificados con claves de Whitworth (2006), Vélez y Wolff (2008) y Florez y Wolff (2009). La especie elegida para el presente estudio fue *Chrysomya rufifacies* debido a que se presentó en mayor incidencia en el grupo de cadáveres revisados.

### **5.1.1 Mantenimiento de la colonia**

El material colectado de los cadáveres en el año 2009 fue utilizado como pie de cría. Los adultos de *Ch. rufifacies* restantes de la identificación fueron mantenidos en jaulas de policarbonato de 40 x 40 x 40 cm a 24 °C, humedad relativa de 55 a 75% y fotoperiodo de 12/12 h; la dieta proporcionada fue oligídica en medio axénico consistente en sacarosa en grano y sacarosa disuelta al 10 %  $P/v$  en agua potable; además les fue proporcionado hígado fresco de res como alimento y sustrato de ovoposición (Nation, 2001).

De la colonia se obtuvieron los huevos y larvas requeridas para los ensayos que son descritos a continuación, según el experimento se trabajó con masa de huevos y/o larvas, las cuales se lograban obtener de una jaula al suministrar hígado fresco de res a la dieta en los siete días posterior a la emergencia de los adultos, del octavo al 14avo día no se expuso y a partir del 15avo día posterior nuevamente se expuso hígado fresco para la ovoposición, la secuencia anterior se llevó a cabo con la finalidad de contar con la mayor cantidad de huevos por masa al sincronizar la mayor cantidad de hembras en su ovoposición. Esta sincronía fue necesaria debido a que algunas hembras maduraban sexualmente antes que otras.

## **5.2 Línea de crecimiento de *Chrysomya rufifacies* obtenida en condiciones de laboratorio**

### **5.2.1 Línea de crecimiento y tiempo de muda.**

Antes de estimar la  $CL_{50}$  en cada uno de los tres estadios fue necesario determinar los tiempos de duración de cada uno en el desarrollo larval a fin de establecer el momento adecuado de exposición, la estrategia establecida para obtener estos datos fue: llevar a cabo líneas de crecimiento en las que describieran el largo y ancho larval en función del tiempo, así como la observación de cada una de las larvas para definir cada estadio larval y la muda.

Una masa de huevos fue colocada en un recipiente plástico de 3.75 L con un kg de hígado de res, cubierto con malla de nylon para permitir su ventilación y se mantuvo en el interior de una incubadora microbiológica, marca J.M. Ortiz, a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C y humedad relativa de  $56.9 \pm 7.75\%$ ; cada 25 min fue monitoreada la masa de huevos hasta su eclosión, momento que se definió como tiempo 0, posteriormente cada dos horas fueron extraídos grupos de 10 larvas hasta la etapa post-alimenticia las cuales fueron sacrificadas por inmersión en agua caliente por 30 segundos a una temperatura mayor de 80 °C, pero sin llegar a ebullición, después fueron colocadas en tubos de ensayo con etanol al 70 % (Amendt *et al.*, 2007). La temperatura y humedad fueron registradas con un termo hidrómetro digital ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ).

Debido a las características necesarias para identificar las larvas de mosca se hace necesario matarlas en agua caliente y después preservarlas en etanol. La generación

de las líneas de crecimiento se llevó a cabo con los datos obtenidos al medir la longitud y ancho de cada una de las larvas con un micrómetro vernier marca scala®, de 0.1 mm de gradación y su respectivo tiempo de monitoreo o edad larval. El estadio de cada una de las larvas se determinó en base al número de hendiduras traqueales presentes en los espiráculos posteriores.

### **5.2.2 Análisis de datos**

Los registros de longitud y anchura de las larvas fueron analizados mediante la regresión lineal, coeficiente de correlación y coeficiente de determinación para conocer la tendencia del coeficiente de correlación, la asociación entre la longitud y anchura corporal con el tiempo posteclosión; así como su significancia para esta parte del estudio. Para determinar diferencias de longitud entre los tiempos de muestreo los datos fueron analizados mediante la prueba *t*-student con el software Microsoft Excell 2007, con significancia de 95 %.

## **5.3 Estimación de la CL<sub>50</sub> de paratión metílico y carbofurano en los tres estadios larvales**

### **5.3.1 Bioensayos**

Los insecticidas utilizados fueron dos, el primero de ellos el paratión metílico (Metílico 720<sup>®</sup>) de Agroquímica Tridente LOTE 6563, Ciudad de México, Distrito Federal, México. Insecticida organofosforado (OP) para el control de plagas en cultivos de jitomate y cítricos como limonero y naranjo. El segundo fue el Carbofurano (Furadan 350<sup>®</sup>) de FMC Agroquímica de México LOTE 02132107, Ciudad de Zapopan, Jalisco,

México, insecticida del grupo toxicológico de los carbamatos recomendado para el control de plagas en cultivos de maíz y melón (SENESICA, 2011).

En un inicio, se consideró el sustrato como filetes de hígado de res de 20 g y su impregnación por sumersión; sin embargo, no fue adecuado debido a que los resultados de los ensayos no fueron reproducibles, además no mostraban una relación directa de la mortalidad con la concentración del tóxico. El sustrato fue licuado y la impregnación del mismo fue mediante diluciones de concentraciones del insecticida, de esta manera se distribuyó uniformemente y no solo en la periferia o capa superficial, en comparación con un filete. La cantidad de sustrato de 20 g se estableció debido a que experimentalmente se estimó que fue suficiente para alimentar un grupo de 20 larvas del tercer estadio temprano por 24 h y aún presentar sustrato sin consumir.

Al estar en el sustrato en donde las larvas se sumergen y penetran, también están expuestas por contacto al insecticida. Las formulaciones fueron diluidas en agua destilada a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de ingrediente activo (ia); varias concentraciones fueron preparadas para realizar bioensayos para obtener el rango de mortalidad entre el 10 y 90 % y de esta manera definir las concentraciones finales para ambos insecticidas, los rangos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de insecticida a las cuales fueron expuestas larvas de *Chrysomya rufifacies*.

Insecticida	Estadio	Rango de concentraciones de ia $\mu\text{g/g}$
Paratión metílico	Primer	0.100 – 6.000 <sup>a</sup>
	Segundo	2.000 – 4.000 <sup>a</sup>
	Tercer	18.000 – 32.000 <sup>b</sup>
Carbofurano	Primer	0.100 – 1.000 <sup>a</sup>
	Segundo	0.500 – 1.200 <sup>a</sup>
	Tercer	0.500 – 2.750 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Cinco concentraciones, <sup>b</sup> Ocho concentraciones

Las pruebas toxicológicas fueron realizadas en recipientes de plástico de tereftalato de polietileno de 250 mL con 13.5 g de una pasta de hígado de res molido en una licuadora a la cual le fueron agregados 1.5 mL de la solución del insecticida, agitada con un aplicador de madera para homogeneizar la pasta. Como testigo fueron colocados los sistemas de prueba con las mismas características; con la diferencia de que le fueron agregados 1.5 mL de agua destilada.

Grupos de 20 larvas de cada uno de los estadios fueron incorporadas a los sistemas de prueba, con un tiempo de exposición de 24 horas y tres repeticiones. Posteriormente, los recipientes de plástico fueron introducidos a una cámara bioclimática Thermo Scientific modelo 3759, Marietta, Ohio, United States, con un fotoperiodo de 12:12 horas luz:oscuridad, temperatura de  $27 \pm 1$  °C y humedad relativa de  $70 \pm 10\%$ . Transcurrido el tiempo de exposición, fue registrado el número de larvas muertas con la inmovilidad como respuesta a un estímulo mecánico como criterio de

mortalidad. Para el cálculo de  $CL_{50}$  se consideraron los grupos de larvas que presentaron una mortalidad menor al 5% en el testigo.

### **5.3.2 Análisis de datos**

La relación dosis-mortalidad fue verificada mediante un análisis log-Probit con el programa SPSS versión 17.0, se calculó la concentración de insecticida que provoca el 50% de mortalidad ( $CL_{50}$ ) y los correspondientes intervalos de confianza (IC95%), en base a los cuales se determinó las diferencias en susceptibilidad.

## **5.4 Determinación del efecto en el crecimiento larval de *Chrysomya rufifacies* expuesta a $CL_{50}$ de paratión metílico y carbofurano.**

### **5.4.1 Efecto en cada uno de los estadios larvales.**

#### **5.4.1.1 Bioensayos**

De la misma forma en que se prepararon los sistemas de prueba para los ensayos de estimación de  $CL_{50}$  fueron preparados grupos de 20 g de sustrato con las concentraciones estimadas de paratión metílico y carbofurano para los tres estadios larvales. Las concentraciones corresponden a la cantidad del tóxico capaz de tener efecto letal en el 50 % de la población larval de *Ch. rufifacies* en cada estadio, con el razonamiento de ser una concentración subletal, por tal motivo el 50 % de la población sobreviviente continuara con su desarrollo y se determinó el efecto en el crecimiento larval.

Siete repeticiones de grupos de 20 larvas de cada estadio fueron expuestos a las  $CL_{50}$  correspondientes y las mismas repeticiones con igual número de larvas fueron

colocadas en sustrato libre de insecticida como control. Ambos grupos, tratamiento y control de cada ensayo fueron obtenidos de la misma masa de ovoposición. Una vez colocados en los sustratos los grupos permanecieron por 24 h con fotoperiodo de 12/12 a  $27 \pm 1$  °C y humedad relativa de 65 a 80%. Posterior al tiempo de exposición fue medida la longitud cada larva en cada grupo.

#### **5.4.1.2 Análisis de datos.**

La longitud de las larvas de los grupos control y tratamientos fueron tomadas con un micrómetro vernier marca scala®, de 0.1 mm de gradación y analizados mediante una comparación de las medias con una prueba *t*-student con el software Microsoft Excell 2007, con significancia de 95 %.

#### **5.4.2 Efecto de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) paratión metílico y carbofurano en el crecimiento de larvas.**

##### **5.4.2.1 Bioensayos**

Las formulaciones fueron diluidas en agua destilada a una concentración de 1000 µg/mL del ingrediente activo, las soluciones de trabajo fueron preparadas en agua destilada en concentraciones  $P/p$  (µg/g) 10 veces mayor a la concentración final (CL<sub>50</sub>) de la sustancia activa en el hígado, 50 mL de la solución de trabajo fue añadida a dos recipientes plásticos de tereftalato de polietileno de 3.750 L de capacidad con 450 g de hígado de res molido en una licuadora de cocina hasta obtener una pasta uniforme, con CL<sub>50</sub> de paratión metílico (1.756 µg/g) y carbofurano (0.441 µg/g) por separado en cada recipiente. La homogenización se llevó a cabo de forma manual, con aplicadores de

madera en movimiento circular. De igual forma fue preparado un testigo libre de insecticida con 450 g de hígado y 50 mL de agua destilada.

De una misma masa de huevecillos se pesó en una balanza analítica por triplicado 0.5 g de huevos, cada una de las réplicas se colocó en uno de los tres recipientes (tratamiento con paratión metílico, carbofurano y el control); posteriormente fueron cubiertos con una malla y permanecieron a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C; cada 20 minutos fueron revisados por diferentes periodos de tiempo hasta la eclosión de las larvas. Después de la eclosión fueron tomadas 10 larvas de cada tratamiento y de cada una de las larvas fue obtenida su longitud con un micrómetro vernier marca scala® de 0.1 mm de gradación.

#### **5.4.2.2 Análisis de datos.**

Los datos de longitud de las larvas de los dos tratamientos fueron comparados con el control; analizados mediante una prueba *t*-student para muestra emparejadas se llevaron a cabo mediante el software Microsoft Excell 2007, la significancia de la prueba fue de 95 %.

### **5.5 Desarrollo y validación de un método analítico para determinar cocaína en larvas de moscas**

#### **5.5.1 Matriz biológica**

La matriz biológica utilizada fue el total del cuerpo de las larvas, debido a que se diseñó el método analítico para muestras reales, en el que la cantidad de material no puede ser controlado y en este sentido no se tiene la certeza en cuanto a la magnitud en

gramos disponible, más si cada especie de larvas que colonicen el cuerpo deben ser identificadas y analizadas por separado, no es la finalidad del presente estudio determinar la cantidad del tóxico en cada tejido independiente de la larva.

Para el desarrollo del método, se utilizaron larvas del tercer estadio debido a que presentan mayor masa corporal, todas las larvas utilizadas en el estudio se limpiaron en vida con agua destilada y se secaron con papel estroza con la finalidad de reducir las posibles interferencias provenientes del sustrato, posteriormente fueron sacrificadas por congelación, a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Cuando se requiere observar en las larvas las características morfológicas con la finalidad de identificación de la especie o bien medir la longitud larval con el propósito de estimar el intervalo post mortem, es necesario sacrificar a las larvas con agua caliente antes de sumergirlas en etanol de lo contrario podrían obscurecerse en pocos días debido a la putrefacción y también podrían encogerse interfiriendo con la medición (Amendt, *et al.*, 2007); sin embargo, para determinar la presencia de tóxicos en las larvas tales consideraciones nos son necesarias y más aún podría complicar el tratamiento de la muestra, ya que a temperaturas elevadas las proteínas son desnaturalizadas, se semisolidifican los tejidos de los órganos y la hemolinfa, lo que disminuiría la disposición del tóxico ante el contacto del solvente de extracción.

### **5.5.2 Reactivos**

Los estándares de cocaína y benzoilecgonina-D3 utilizados fueron de la marca Cerillant (Lote FC032007-01A y FC110405, respectivamente). Los solventes fueron grado HPLC y de marca J.T. Baker. El ácido fórmico utilizado fue 98-100 % de marca Merck.

### **5.5.3 Extracción**

En 400 mg de masa de larvas, previamente macerada y homogenizada en mortero, les fue agregado 80  $\mu\text{L}$  de una solución de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de benzoilecgonina-D3 en acetonitrilo como estándar interno. Por triplicado, se llevó a cabo una secuencia de extracción por precipitación en la cual se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y se homogenizó la mezcla con agitación de 5 min en vórtex, posteriormente fueron agregados 400  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo y nuevamente se agitaron en vórtex por 5 min, la mezcla se sonicó por espacio de 5 min y se centrifugó por 10 min a 3000 rpm.

El sobrenadante fue colectado en un tubo de ensayo, posterior a las secuencias de extracción se agregaron al tubo 500  $\mu\text{L}$  de una solución de acetonitrilo:agua, 95:5 %, con 0,05% de ácido fórmico, la solución fue agitada en vórtex por 10 s, filtrada con poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y trasferida a un vial para su inyección en el cromatógrafo.

### **5.5.4 Condiciones del equipo para el análisis**

#### **5.5.4.1 Método cromatográfico**

El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$  del extracto en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), marca Agilent modelo 1100. La columna utilizada fue de fase inversa, marca Supelco modelo SB-C18 de 2.1 x 30 mm y 1.8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. La elución se llevó a cabo mediante una mezcla de solución A (agua:acetonitrilo, 98:2 % + 0,05% de ácido fórmico) y B (acetonitrilo:agua, 98:2% + 0,05% de ácido fórmico) con un flujo constante de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La composición inicial fue 90% A, seguido por un gradiente lineal hasta 50% A de 0 a 4 min.

#### **5.5.4.2 Espectrometría de Masas**

Se utilizó un Espectrómetro de Masas de Triple Cuadrupolo e Interfase de Electrospray (ESI-MS/MS por sus siglas en inglés), marca Applied Biosystem, modelo API 2000. La detección para ambas sustancias fue mediante el modo de Monitoreo de Múltiple Reacción (MRM por sus siglas en inglés), las transiciones ion padre – ion producto para cocaína y benzoilecgonina-D3 fueron seleccionadas con base en experimentación, así como los voltajes óptimos para la mayor respuesta.

#### **5.5.5 Validación**

El método fue cualificado para selectividad, porcentaje de extracción, linealidad, precisión (intra-día e inter-días), exactitud, límite de detección y límite de cuantificación (Kharbouche *et al.*, 2008; FDA 2001; Thompson *et al.*, 2002; Johansen y Bhatia, 2007). El análisis de datos fue mediante los softwares Applied Biosystem Analyst 1.4.1 y Microsoft Excel 2007.

##### **5.5.5.1 Selectividad**

La selectividad se evaluó al inyectar 10 blancos de la matriz procesada libre de tóxicos y estándar interno; se considera selectivo si los cromatogramas no presentan señales superiores al límite de detección o que interfieran en el tiempo de retención ( $t_R$ ) del analito.

### 5.5.5.2 Recobro de extracción

Para determinar la eficiencia de la extracción de la cocaína se determinó el recobro absoluto (R%), se comparó el área del pico cromatográfico obtenida de la inyección de cinco muestras independientes enriquecidas en concentración de 1 µg/g antes de la extracción con cinco muestras independientes enriquecidas después de la extracción mismas que representan el 100 %.

$$R \% = (A_{\text{ext}} / A_{100}) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$A_{\text{ext}}$  = Área del pico cromatográfico del analito agregado antes de la extracción.

$A_{100}$  = Área del pico cromatográfico del analito agregado posterior a la extracción.

### 5.5.5.3 Linealidad

La linealidad se evaluó mediante el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el cálculo del coeficiente de variación porcentual (CV%) de la pendiente obtenida de curvas de calibración ( $n=5$ ) con seis puntos de concentraciones distintas de cocaína (10, 50, 100, 500, 1000 y 5000 ng/g) preparadas y analizadas en forma independiente; tres en un mismo día y una por cada uno de los dos días consecutivos. La ecuación de la curva de calibración fue calculada usando el área relativa del pico del analito (cocaína) y del estándar interno (benzoilecgnina-D3) en función de la concentración de cocaína y del estándar interno (benzoilecgnina-D3).

#### 5.5.5.4 Exactitud y precisión

La exactitud y precisión, intra-día ( $n=5$ ) e inter-días ( $n=15$ ), fue determinada al analizar cinco réplicas independientes de muestras enriquecidas con cocaína a la concentración de 30, 300 y 3000 ng/g, en un mismo día y por tres días consecutivos, para la evaluación de la exactitud se calculó su porcentaje de recobro ( $E_R\%$ ) y para la precisión el coeficiente de variación porcentual (CV%).

$$E_R\% = (C_{\text{obtenida}}/C_{\text{real}}) \times 100 \quad (2)$$

Donde

$C_{\text{obtenida}}$  = Concentración obtenida en la cuantificación de la muestra enriquecida.

$C_{\text{real}}$  = Concentración real presente en la muestra enriquecida.

$$CV \% = (\bar{X}_{\text{mediciones}} / S_{\text{mediciones}}) \times 100 \quad (3)$$

Donde

$\bar{X}_{\text{mediciones}}$  = Promedio de las mediciones obtenidas

$S_{\text{mediciones}}$  = Desviación Estándar de las mediciones obtenidas

#### 5.5.5.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC), se estableció como el punto más bajo de la curva de calibración y se evaluó en base a su CV% y desviación porcentual de la medición respecto a la concentración real.

#### **5.5.5.6 Límite de detección**

El límite de detección (LD), se determinó en base a la señal de la cocaína en el cromatograma al analizar muestras enriquecidas ( $n=3$ ), cuya altura el pico fuera tres veces la desviación estándar sobre la media del ruido y se evaluó en base al CV% de su respuesta.

### **5.6 Aplicación del método analítico para la determinación de cocaína en larvas de mosca.**

El método analítico desarrollado se utilizó para determinar la presencia y concentración de cocaína en larvas de dípteros de fauna cadavérica en cuerpos humanos.

#### **5.6.1 Cadáveres de humano examinados**

Se examinaron siete cuerpos de los cuales cuatro de ellos perdieron la vida en forma violenta, dos por enfermedad y en el otro restante no pudo ser determinado el mecanismo (Tabla 3). A seis de los cuerpos se les efectuó un estudio toxicológico realizado rutinariamente en el Laboratorio de Química Forense, las sustancias rastreadas fueron psicotrópicos, estupefacientes y alcohol etílico.

Tabla 3. Cadáveres y partes de cuerpos donde se obtuvieron las larvas de dípteros para la determinación de cocaína por el método desarrollado.

Autopsia	Fecha	Lugar del hallazgo.	Mecanismo de muerte	Sustancias detectadas en muestras humanas <sup>a</sup>
Parte 04-10	22 de junio	Planta Tratadora de Aguas Negras.	Se desconoce	No analizado
05-10	11 marzo	Carretera Nacional, Monterrey.	Homicidio	No detectadas
06-10	28 marzo	Brecha Carrera de Caballos, Gral. Mier.	Homicidio (arma de fuego)	Alcohol etílico, Cocaína
07-10	18 marzo	San Nicolás	Enfermedad (Infarto)	Alcohol etílico
08-10	22 abril	Sobre vía pública, Residencial Anáhuac. San Nicolás.	Enfermedad (Infarto)	Alcohol etílico
09-10 <sup>b</sup>	05 mayo (14 mayo)	Col. Los Cristales, Guadalupe	Homicidio (arma blanca)	Cocaína
10-10	03 septiembre	Cd. Mier; Tamaulipas	Homicidio (arma de fuego)	Alcohol etílico

<sup>a</sup> Las sustancias detectadas fueron en base a estudios en sangre realizados de rutina en el Laboratorio de Química Forense, las sustancias rastreadas son psicotrópicos, estupefacientes y alcohol etílico.<sup>b</sup> El sustrato donde se colectó fue una prenda tipo sudadera de fabricación sintética impregnada de sangre del cadáver.

#### 5.6.1.1 Parte 04 – 10

En particular, de este cadáver solo se recuperaron fragmentos cercenados en el lugar del hallazgo y de ello solo se examinó la rodilla, el grupo de fragmentos fueron encontrados en una planta tratadora de aguas negras. Aún y cuando existe suficiente evidencia de que el cuerpo fue mutilado, no fue posible determinar el mecanismo de su muerte por no contar con los miembros anatómicos necesarios. Los estudios toxicológicos no se llevaron a cabo debido a las inadecuadas características de la muestra.

#### **5.6.1.2 Autopsias 05-10, 06-10 y 10-10.**

En común, las tres autopsias fueron practicadas a cuerpos en un estado de descomposición avanzado, encontrados fuera del área metropolitana y como mecanismo de muerte el homicidio. Los resultados de los estudios toxicológicos de rutina, con muestras de procedencia humana fueron los siguientes: No detectado para la autopsia 05-10, detectado para etanol y cocaína para la autopsia 06-10 y detectado para cocaína en la autopsia 10-10.

#### **5.6.1.3 Autopsias 07-10 y 08-10.**

Ambas autopsias se llevaron a cabo en cuerpos que perdieron la vida a causa de infarto agudo al miocardio, en el caso de la autopsia 07-10 el cuerpo fue encontrado dentro de un domicilio, el estudio toxicológico indicó la presencia de alcohol etílico; en la autopsia 08-10 el cuerpo fue encontrado en la intemperie en vía pública en el área metropolitana de Monterrey, el estudio toxicológico indicó la presencia de alcohol etílico.

#### **5.6.1.4 Autopsia 09-10.**

En el cuerpo cuya autopsia correspondió la 09-10, perdió la vida mediante el mecanismo de homicidio por arma blanca, el cadáver fue encontrado en estado fresco sin colonización de insectos, sin embargo, las ropas del cadáver presentaban abundante absorción de sangre proveniente de las heridas que posiblemente causaron su muerte, entre las prendas se encontró una chamarra de material sintético, dos días después de la separación de la prenda del cadáver fueron encontradas larvas al parecer de mosca.

### **5.6.2 Colecta de especímenes entomológicos**

La colecta del material fue directa del cuerpo o partes anatómicas antes de la autopsia en el SEMEFO de la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León. Además, se colectó sobre una prenda de vestir del cadáver nueve días posteriores a su autopsia. La forma de colecta de larvas fue manual, con las manos cubiertas con guantes de látex se obtuvo del interior de cavidad torácica y abdominal. Cada especie de dípteros presentes en estados inmaduros fue identificada y analizada por separado.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Revisión de cadáveres de humano en el Servicio Médico Forense de la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León.

Como inicio del presente estudio fueron revisados 10 cadáveres de humano en el SEMEFO de la PGJNL durante el periodo de enero a mayo de 2009, en tres casos fueron encontrados insectos de importancia forense, de la familia Calliphoridae se localizaron larvas del tercer estadio de *Ch. rufifacies* y *Ch. megacephala*, así como de huevos de *Lucilia sp*, los cuales fueron criados hasta larvas del tercer estadio para su identificación. Además se encontró un coleóptero de la familia Dermestidae *Dermestes caninus*. Los tres cuerpos presentaron en común larvas de *Ch. rufifacies*, razón por la cual se eligió para los estudios posteriores (Tabla 4).

En el año 2010 durante el periodo de junio a octubre, fueron revisados otros 10 cuerpos, de los cuales siete presentaron insectos de importancias forense, todos ellos del orden Díptera, dos de la familia Calliphoridae con *Ch rufifacies* y *Cochliomyia macellaria* Fabricius, una de la familia Sarcophagidae con *Sarcophaga haemorrhoidalis* Fallén, una de la familia Musidae con *Musca domestica* Linnaeus. Ninguna otra especie de insectos fue encontrada colonizando los cadáveres.

Tabla 4. Insectos colectados de cadáveres humanos en el SEMEFO de la PGJNL durante los periodos de enero a mayo de 2009 y de junio a octubre de 2010.

Autopsia	Estado de descomposición	Fecha	Mecanismo de deceso	Material entomológico.
01 – 09	Putrefacción	enero 2009	Homicidio	<i>Chrysomya rufifacies</i> L3; <i>Chrysomya megacephala</i> L3
02 – 09	Fresco	marzo 2009	Enfermedad	<i>Chrysomya rufifacies</i> ; L1 <i>Lucilia sp.</i> Huevecillos
03 – 09	Saponificación	abril 2009	Homicidio	<i>Chrysomya rufifacies</i> L2, L3; <i>Dermestes caninus</i> <sup>a</sup>
Parte 04-10	Putrefacción	junio 2010	Se desconoce	<i>Cochliomyia macellaria</i> L3
05-10	Putrefacción	marzo 2010	Homicidio	<i>Sarcophaga haemorrhoidalis</i> L2, L3
06-10	Putrefacción	marzo 2010	Homicidio	<i>Chrysomya rufifacies</i> L3; <i>Cochliomyia macellaria</i> L3
07-10	Putrefacción	marzo 2010	Enfermedad	<i>Chrysomya rufifacies</i> L3; <i>Cochliomyia macellaria</i> L3
08-10	Putrefacción	abril 2010	Enfermedad	<i>Chrysomya rufifacies</i> L2, L3
09-10 <sup>a</sup>	Fresco	mayo 2010	Homicidio	<i>Musca domestica</i> L1
10-10	Putrefacción	septiembre 2010	Homicidio	<i>Cochliomyia macellaria</i> L3

<sup>a</sup> Corresponde a un escarabajo de la familia Dermestidae presente en estado adulto en el cuerpo.

<sup>b</sup> El sustrato donde se colectó fue una prenda tipo sudadera de fabricación sintética impregnada de sangre del cadáver.

## 6.2 Línea de crecimiento de *Chrysomya rufifacies*

*Ch. rufifacies* fue la especie más común en los cadáveres revisados durante el periodo del 2009 y 2010, además ya ha sido considerada como tal por otros estudios (Quiroz-Martínez y Rodríguez-Castro, comunicación personal), por tal razón fue seleccionada para realizar los objetivos de este proyecto; posteriormente se procedió a establecer la cría del díptero en laboratorio para desarrollar una línea de crecimiento desde la oviposición hasta la etapa de prepupa.

Los promedios de las medidas de largo y ancho de cada grupo de 10 larvas fueron graficados en función del tiempo (hora), iniciado desde la eclosión de las larvas hasta cuatro horas posterior a su longitud máxima; la forma de la gráfica se ajustó a un modelo lineal. Posterior a las 84 h post-eclosión, tiempo en el cual se obtuvo la mayor medición de largo larval, se consideró como el inicio de la etapa post-alimenticia o prepupa en la que ya no se alimenta y deja de crecer, las mediciones evidenciaron la contracción de tamaño solo apreciable en el largo y no en el ancho larval (Figuras 1 y 2).

La línea de crecimiento obtenida al graficar la longitud larval en función del tiempo desde la eclosión de las larvas hasta las 84 h presentó una ecuación de la recta de  $y = 0.157x + 1.621$  ( $\beta$ ,  $t = 42.712$ ;  $P < 0.01$ ), su tendencia fue lineal, con una relación directamente proporcional entre el tamaño la longitud larval y el tiempo, con coeficiente de correlación positivo de  $r = 0.988$  y un coeficiente de determinación  $r^2 = 0.977$ ; la línea de crecimiento obtenida al graficar el ancho larval en función del tiempo en el mismo intervalo de tiempo presentó una ecuación de la recta de  $y = 0.044x + 1.125$  ( $\beta$ ,  $t = 34.847$ ;  $P < 0.01$ ), su tendencia también fue lineal, con una relación directamente

proporcional entre el ancho larval y el tiempo, con coeficiente de correlación positivo de  $r = 0.983$  y un coeficiente de determinación  $r^2 = 0.967$

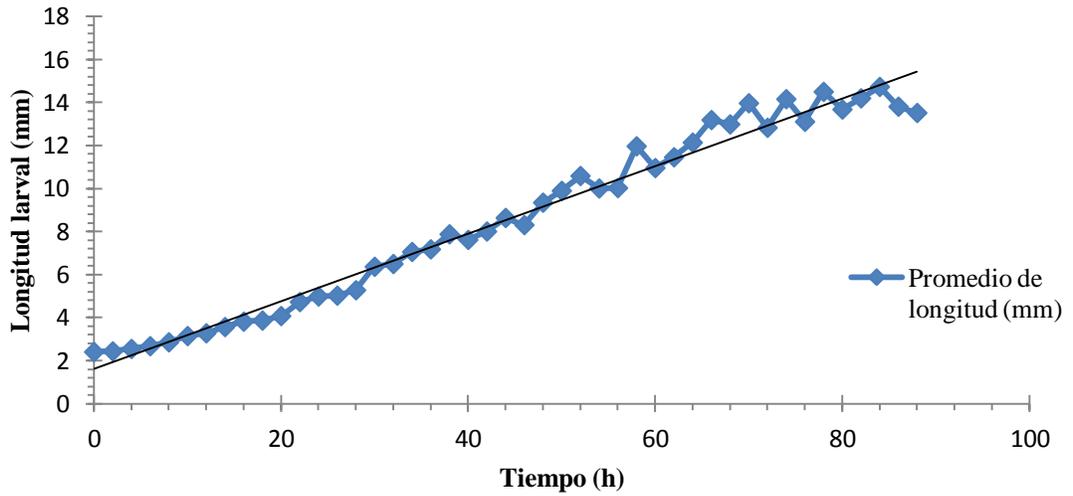


Figura 1. Línea de crecimiento de *Chrysomya rufifacies* considerando la longitud larval en función de tiempo, obtenida a temperatura de  $27 \pm 1$  °C y humedad relativa de  $56.09 \pm 7.75$  %.

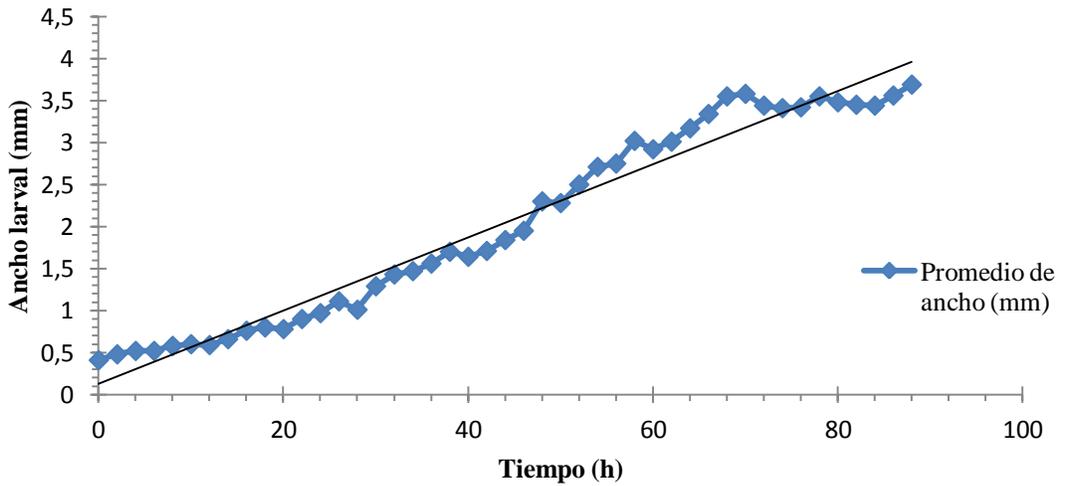


Figura 2. Línea de crecimiento de *Chrysomya rufifacies*, considerando el ancho larval en función del tiempo, obtenida a temperatura de  $27 \pm 1$  °C y humedad relativa de  $56.09 \pm 7.75$  %.

Las larvas recién eclosionadas promediaron 2.41 mm de longitud, de acuerdo a las diferentes muestras que fueron tomadas alcanzaron una máxima longitud de 14.73 mm en promedio. Las larvas tomadas fueron consideradas como Grupo denominado numéricamente y en forma consecutiva a medida que paso el tiempo. Los promedios de longitud de las larvas fueron comparados mediante una prueba *t-student*; los resultados se muestran en la Tabla 5 donde podemos apreciar que después del análisis casos de diferencia significativa (D) y no diferencia significativa (ND) del largo de las larvas en los intervalos de tiempo.

Tabla 5. Estadísticas descriptivas y comparación sucesiva de la longitud larval de la línea de crecimiento de *Ch. rufifacies*

Grupo	Tiempo (h)	Longitud promedio (mm)	s (mm)	$t^a$	P	Decisión
1	0	2.41	0.22			
2	2	2.44	0.18	0.337	0.740	ND
3	4	2.55	0.12	1.632	0.12	ND
4	6	2.68	0.15	2.112	0.049	D
5	8	2.86	0.11	3.019	0.007	D
6	10	3.15	0.27	3.179	0.005	D
7	12	3.28	0.21	1.197	0.247	ND
8	14	3.57	0.21	3.044	0.007	D
9	16	3.82	0.23	2.504	0.022	D
10	18	3.87	0.16	0.56	0.582	ND
11	20	4.08	0.10	3.538	0.002	D
12	22	4.73	0.43	4.652	0.0002	D
				1.412	0.175	ND

Tabla 5. (Continuación)

13	24	4.99	0.39	0.22	0.829	ND
14	26	5.03	0.42	1.428	0.17	ND
15	28	5.28	0.36	4.23	0.0005	D
16	30	6.37	0.73	0.459	0.652	ND
17	32	6.50	0.52	3.118	0.006	D
18	34	7.06	0.24	0.849	0.407	ND
19	36	7.18	0.38	3.752	0.002	D
20	38	7.88	0.45	1.32	0.203	ND
21	40	7.62	0.43	1.667	0.113	ND
22	42	8.01	0.60	2.919	0.009	D
23	44	8.64	0.32	1.122	0.277	ND
24	46	8.31	0.87	2.606	0.018	D
25	48	9.35	0.91	1.202	0.245	ND
26	50	9.9	1.12	1.753	0.097	ND
27	52	10.59	0.53	2.377	0.287	D
28	54	10.01	0.56	0.068	0.946	ND
29	56	10.03	0.74	6.632	$3 \times 10^{-06}$	D
30	58	11.97	0.56	3.045	0.007	D
31	60	10.96	0.89	1.288	0.213	ND
32	62	11.46	0.85	2.189	0.042	D
33	64	12.14	0.50	3.735	0.002	D
34	66	13.19	0.74	0.621	0.543	ND
35	68	12,99	0.70			

Tabla 5. (Continuación)

36	70	13,97	0.63	3.289	0.004	D
37	72	12,83	1.49	2.228	0.039	D
38	74	14.16	1.21	2.188	0.042	D
39	76	13.11	0.88	2.212	0.04	D
40	78	14.50	0.73	3.831	0.001	D
41	80	13.68	1.18	1.872	0.078	ND
42	82	14.20	1.10	1.02	0.322	ND
43	84	14.73	1.05	1.102	0.285	ND
44	86	13.81	0.43	2.568	0.019	D
45	88	13.52	0.79	1.018	0.322	ND

$t^a$  valor critico = 2.101, g.L. = 18,  $\alpha$  = 0.05; D Diferente, ND No Diferente.

En la Tabla 6, se presentan los valores de los rangos obtenidos de la longitud, ancho y tiempo de duración de los tres estadios larvales de *Ch. rufifacies*. La longitud mínima fue de 2.1 mm y un máximo de 16.3 mm; mientras que el ancho de las larvas fue como mínimo 0.4 mm a 4.0 mm; el tiempo de duración de la fase de larva fue de 84 h, desde el momento en que eclosionaron las larvas hasta que aparecieron las prepupas.

Tabla 6. Rango de longitud, ancho y tiempo de duración de las larvas de *Chrysomya rufifacies* criadas en condiciones de laboratorio.

Estadio	Largo (mm)		Ancho (mm)		Tiempo (h)	
	min.	max.	min.	max.	min.	max.
L1	2.1	3.1	0.4	0.6	0 <sup>a</sup>	14
L2	3.0	9.0	0.5	2.4	8	48
L3	7.6	16.3	1.5	4.0	42	84 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Momento del inicio de la eclosión de la masa de huevos.

<sup>b</sup> Tiempo en donde se registró la mayor longitud larval, las muestras obtenidas en tiempos de monitoreo superiores presentan longitud larval inferior.

### 6.3 Estimación de la CL<sub>50</sub> de paratión metílico y carbofurano en los tres estadios larvales

La edad larval expresada en horas para ser utilizadas en los bioensayos fue de 4 h (L1), 18 h (L2) y 54 h (L3). Para cada ensayo se aseguró el estadio de exposición al determinarlos morfológicamente en el total de la misma ovoposición, sacrificadas al momento previo a la prueba. La susceptibilidad para paratión metílico y carbofurano en cada uno de los estadios larvales de *Ch. rufifacies* se muestran en la Tabla 7. Comparando ambos insecticidas y de acuerdo a las CL<sub>50</sub>, obtenidas para cada uno de los estadios de las larvas, se puede apreciar que *Ch. rufifacies* fue más susceptible al insecticida carbofurano.

Para ambos insecticidas, se observó con base en las concentraciones del intervalo de confianza (95%) de las  $CL_{50}$  estimadas que la susceptibilidad fue significativamente diferente entre los tres estadios larvales ya que no hubo traslape en los IC. La susceptibilidad en función del estadio larval fue mayor en el primer estadio y a medida que avanzó en su desarrollo este indicador disminuyó.

La  $CL_{50}$  del paratión metílico fue de 1.756  $\mu\text{g/g}$  para larvas del primer estadio; para las larvas del segundo estadio fue 2.771  $\mu\text{g/g}$  y para las del tercer estadio fue de 27.605  $\mu\text{g/g}$  tomando como base el valor del primer estadio para el segundo prácticamente se duplicó y del primero al tercero fue un poco más de 15 veces el incremento. Del segundo al tercer casi 10 veces el incremento de la concentración.

La  $CL_{50}$  del carbofurano fue de 0.441  $\mu\text{g/g}$  para larvas del primer estadio; para las larvas del segundo estadio fue 0.782  $\mu\text{g/g}$  y para las del tercer estadio fue de 1.899  $\mu\text{g/g}$  tomando como base el valor del primer estadio para el segundo prácticamente casi se duplicó el valor y del primero al tercero fue un poco más de cuatro veces el incremento. Del segundo al tercero fue casi dos y media veces el incremento

En la Figura 3 se muestra la línea respuesta de paratión sobre larvas de *Ch. rufifacies* en los tres estadios larvales, se puede apreciar que la población presenta mayor heterogeneidad en su respuesta en el primer estadio respecto al segundo y tercer en donde las pendientes son prácticamente cuatro veces mayor (Tabla 7). En cuanto a la línea respuesta de carbofurano sobre larvas de *Ch. rufifacies* en los tres estadios larvales se muestra en la Figura 4, se puede apreciar que la población presenta mayor heterogeneidad en la respuesta en el primer y tercer estadio respecto al segundo en donde el valor de la pendiente es más del doble (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) obtenida para los tres estadios larvales de *Chrysomya rufifacies* expuestas a paratión metílico y carbofurano.

Insecticida	Estadio	Nº	Pendiente (EE)	Intercepto (EE)	CL <sub>50</sub> µg/g (IC 95%)	g.l.	X <sup>2</sup>
Paratión metílico	L1	300	1.495 (0.159)	-0.366 (0.092)	1.756 (1.353 – 2.290)	3	2.516 <sup>a</sup>
	L2	300	6.299 (0.785)	-2.788 (0.370)	2.771 (2.606 – 2.932)	3	4.798 <sup>a</sup>
	L3	480	7.112 (0.823)	-10.248 (1.157)	27.605 (26.510 – 29.015)	6	4.767 <sup>b</sup>
Carbofurano	L1	300	2.815 (0.321)	0.647 (0.099)	0.441 (0.292 – 0.601)	3	5.704 <sup>a</sup>
	L2	300	6.041 (0.618)	0.913 (0.106)	0.782 (0.732 – 0.832)	3	1.192 <sup>a</sup>
	L3	300	2.831 (0.349)	-0.788 (0.104)	1.899 (1.662 – 2.230)	3	0.429 <sup>a</sup>

EE: Error Estándar.

Los valores de <sup>a</sup>X<sup>2</sup> valor crítico = 7.815 y <sup>b</sup>X<sup>2</sup> valor crítico = 12.592 están determinados con una significancia de 0.05 (5%)

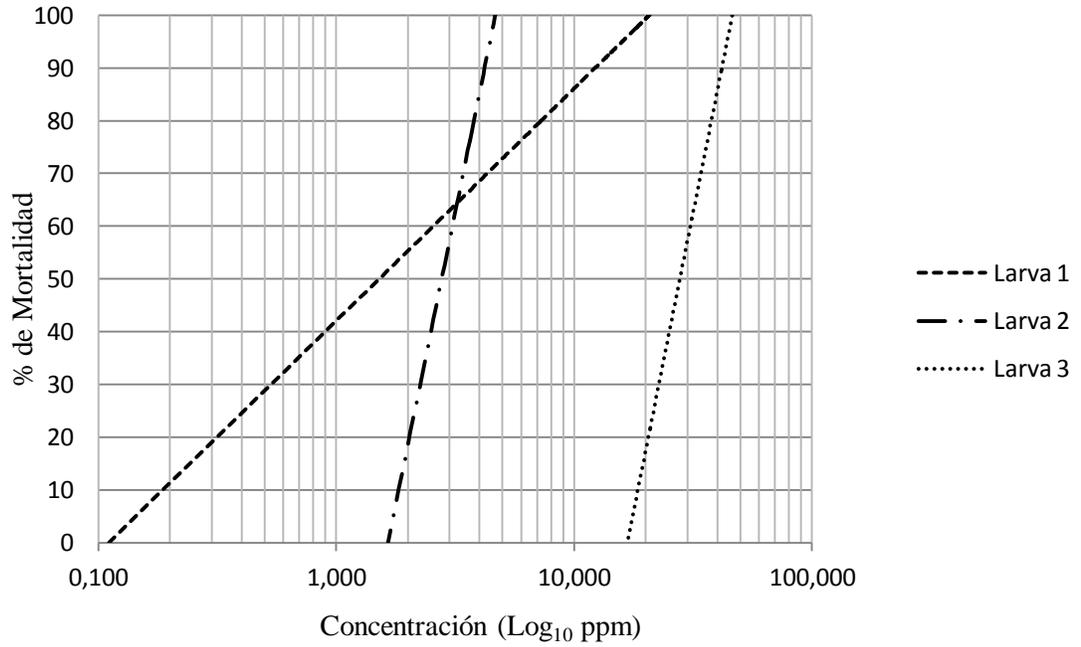


Figura 3. Línea respuesta de paratión metílico sobre larvas de *Ch. rufifacies* en los tres estadios larvales.

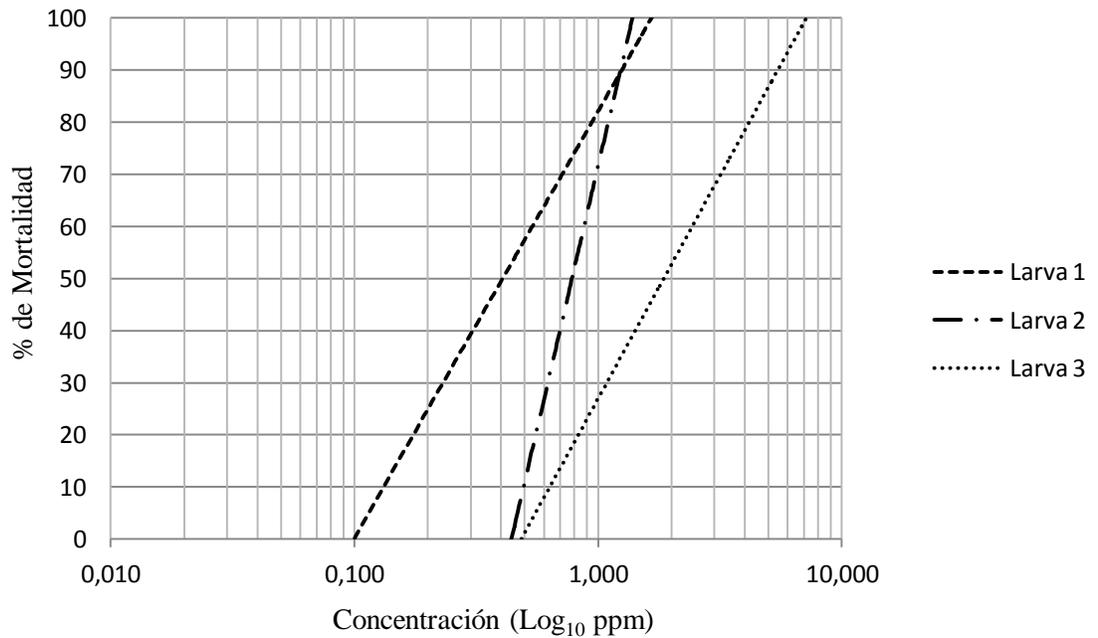


Figura 4. Línea respuesta de carbofurano sobre larvas de *Ch. rufifacies* en los tres estadios larvales.

## **6.4 Determinación del efecto de CL<sub>50</sub> de paratión metílico y carbofurano en el crecimiento larval de *Chrysomya rufifacies*.**

### **6.4.1 Efecto en cada uno de los estadios larvales**

El efecto de los insecticidas en el crecimiento larval fue evaluado exponiendo cada estadio a su correspondiente CL<sub>50</sub> estimadas para ambos insecticidas, bajo condiciones con fotoperiodo de 12:12 a 27 °C y humedad relativa de 65 a 80%. De una misma masa de huevecillos fueron tomadas las larvas para exponerlas al insecticida. Cada tratamiento fue comparado con un control con siete repeticiones del tratamiento (n = 140) y del control (n = 140).

Como resultado de la exposición a la CL<sub>50</sub> de paratión metílico, en cada respectivo estadio larval se observó un efecto en el tamaño al presentar aumento en la longitud de los sobrevivientes en el primer estadio y disminución en el tercero, ambos de forma significativa en comparación con las larvas control; en contraste, las larvas del segundo estadio no presentaron diferencia significativa en su longitud respecto a su control. En lo que respecta al carbofurano, la exposición a la CL<sub>50</sub> solo en el primer estadio presentó efecto en el tamaño al disminuir la longitud larval significativamente respecto al control (Tabla 8).

En común, solo en el primer estadio ambos insecticidas modifican el tamaño larval esperado, sin embargo el efecto es contrario, mientras que el paratión aumenta la longitud, el carbofurano la disminuye.

Tabla 8. Efecto en el crecimiento en los tres estadios de larvales de *Ch. rufifacies* a la exposición a CL<sub>50</sub> de paratión metílico y carbofurano.

Insecticida	Estadio	Tratamiento			Control			Comparación de medias		
		n	$\mu$ (mm)	$s^2$	n	$\mu$ (mm)	$s^2$	g.l.	$t$	$P$
Paratión	L1	112	6.17	0.39	119	5.93	0.27	229	3.17	0.002
	L2	36	7.24	0.32	109	7.15	0.45	143	0.76	0.407
	L3	100	14.52	2.42	130	15.43	1.40	228	5.08	<0.001
Carbofurano	L1	44	5.56	0.16	119	5.93	0.27	161	4.29	<0.001
	L2	61	7.49	0.92	140	7.44	0.38	199	0.38	0.705
	L3	38	12.42	1.29	122	12.72	0.95	158	1.55	0.123

<sup>a</sup> Valor crítico  $t$  esta determinado con una significancia de 0.05 (5%)

#### 6.4.2 Efecto de paratión metílico y carbofurano en la curva de crecimiento de larvas de *Chrysomya rufifacies*.

Un grupo de larvas del primer estadio (L1) fue expuesto a una concentración de 1.756  $\mu\text{g/g}$  de paratión metílico ( $\text{CL}_{50}$ ), otro grupo del mismo estadio fue expuesto a una concentración de carbofurano de 0.441  $\mu\text{g/g}$  ( $\text{CL}_{50}$ ) y finalmente un tercer grupo libre de tóxico como control. Las gráficas de la longitud en función de tiempo (horas), iniciando desde su eclosión hasta el inicio de la etapa prepupa (89 h), presentaron forma lineal (Figura 5). La ecuación de la recta, coeficiente de correlación y coeficiente de determinación de las tres curvas de crecimiento se detallan en la Tabla 9. Tanto en los tratamientos como en el control, los estadios fueron consistentes entre los tiempos de monitoreo. Registro de aparición del segundo y tercer estadio fue de 17 y 53 h, respectivamente.

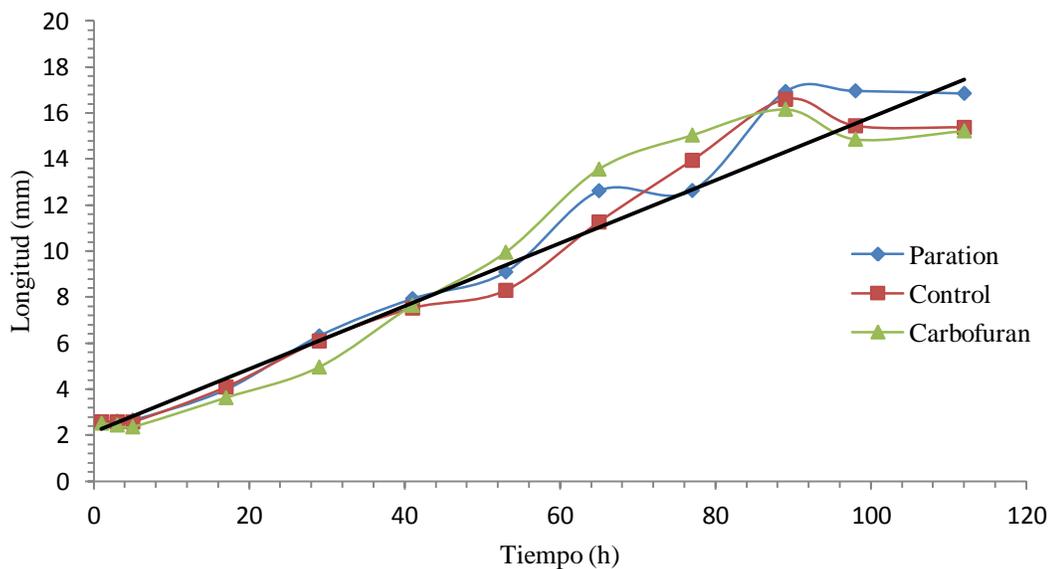


Figura 5. Líneas de crecimiento de *Ch. rufifacies* con base en su longitud larval expuestas a la  $\text{CL}_{50}$  estimada en primer estadio.

Tabla 9. Valores de pendiente e intercepto que describen la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación de las curvas de crecimiento larval de *Ch. rufifacies*.

Insecticida	Observaciones	Pendiente (IC 95%)	Intercepto (IC 95%)	$r$	$r^2$
Paratión metílico	10	0.155 (0.136 – 0.175)	1.827 (0.893 – 2.761)	0.989	0.978
Carbofurano	10	0.169 (0.149 – 0.190)	1.397 (0.396 – 2.398)	0.989	0.978
Control	10	0.154 (0.136 – 0.173)	1.702 (0.760 – 2.645)	0.988	0.976

Las líneas de crecimiento larval, generadas de la exposición a los insecticidas, presentan una alta correlación con el control al relacionar el total cada uno de los valores promedio de longitud en los mismos tiempos de medición, en un rango de 1 a 89 h. Mediante un prueba de  $t$  de student para muestras emparejadas se compararon las diez medias de longitud de cada tratamiento con las respectivas del control, resultó que las dos líneas de crecimiento de las larvas expuestas a insecticidas no presentaron diferencia significativa, cada una respecto al control los estadísticos se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10.- Comparación de las líneas de crecimiento larval en presencia de los insecticidas con la generada por el control.

Tratamiento	Observaciones (1 a 89 h)	$r$	$g.l.$	$t$	$P$
Paratión metílico	10	0.991	9	0.82	0.428
Carbofurano	10	0.984	9	0.81	0.435

$r$  coeficiente de correlación entre las observaciones del tratamiento y las del control

<sup>a</sup> Valor crítico  $t$ ;  $\alpha = 0.05$

## 6.5 Desarrollo y validación de un método analítico para determinar cocaína en larvas de moscas.

### 6.5.1 Condiciones Instrumentales.

#### 6.5.1.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Bajo las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis, los tiempos de retención obtenidos de la cocaína y benzoilecgonina-D3 fueron de 0.42 y 0.45 min, respectivamente, en la Figura 6 se observan los dos canales de detección, el pico de mayor altura (cps) corresponde a la señal de la cocaína, el de menor benzoilecgonina-D3.

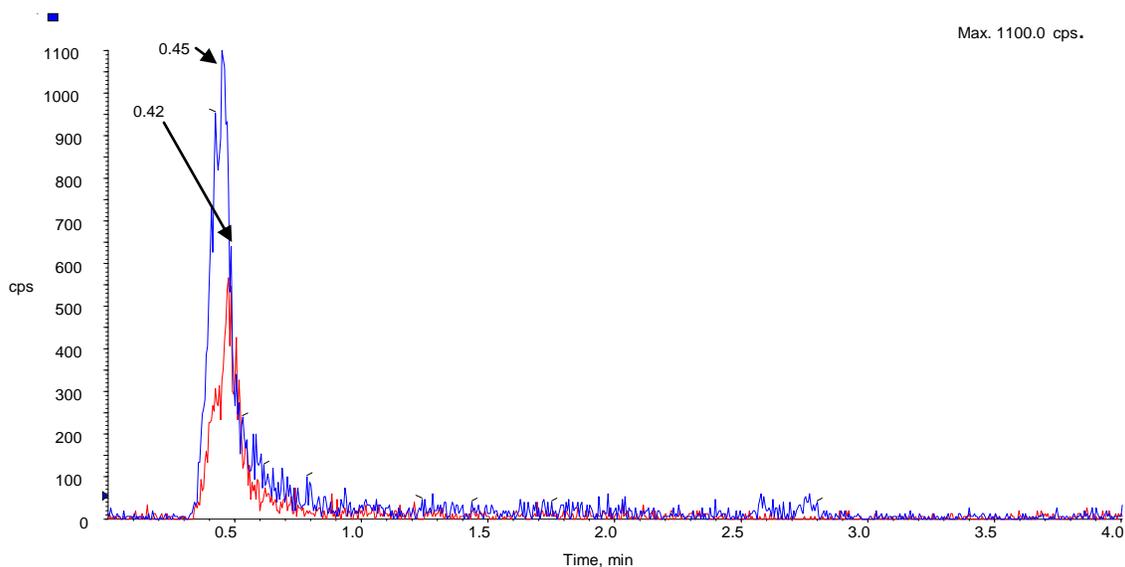


Figura 6. Cromatograma de la inyección de una muestra enriquecida con cocaína ( $t_R = 0.45$  min) a una concentración de 100 ng/g y el calibrador interno benzoilecgonina-D3 de 800 ng/g. ( $t_R = 0.42$  min).

### 6.5.1.2 Espectrometría de Masas en Tandem

Mediante experimentación de ensayo y error, se determinaron las transiciones de ion padre a ion producto utilizadas para detección de los analitos mediante el modo positivo en Monitoreo de Múltiple Reacción (MRM) para cocaína y benzoilecgonina-D3, las transiciones establecidas fueron de: 304.0–182.4 Th y 293.5–171.2 Th, respectivamente. Las condiciones dependientes del compuesto, que consiste en los voltajes óptimos requeridos para la detección, se describen en la Tabla 11; las condiciones dependientes del flujo y que están relacionados directamente con la fase móvil se establecieron en los siguientes valores: presión del gas de cortina (CUR) 22 psi, flujo del gas nebulizador de Interfase (GS1) 40 L/min, flujo del gas de calentamiento de interfase (GS2) 30 L/min, gas en celda de colisión (CAD) 2, Potencial en capilar (IS) 5500 V y Temperatura de interfase (TEM) 550 °C.

Tabla 11. Parámetros dependientes del compuesto optimizados en el Espectrómetro de Masas para la detección de cocaína y benzoilecgonina-D3.

Parámetro	Volt.	
	Cocaína 304.0 – 182.4 Th	Benzoilecgonina-D3 293.5 – 171.2 Th
Potencial de desagrupación (DP)	10	50
Potencial de entrada (EP)	3	5
Potencial de enfoque (FP)	400	400
Energía de colisión (CE)	24	24
Potencial de salida de la celda de colisión (CXP)	0	7

## 6.5.2 Validación del método

### 6.5.2.1 Selectividad

En los cromatogramas obtenidos de la inyección de las 10 muestras de larvas del tercer estadio procesadas en forma independientes y libres de cocaína no mostraron señales de respuesta atribuible a compuestos endógenos en el ensayo y que interfiriera con las señales de la cocaína y benzoilecgonina-D3 en los  $t_R$  característicos. Figura 7.

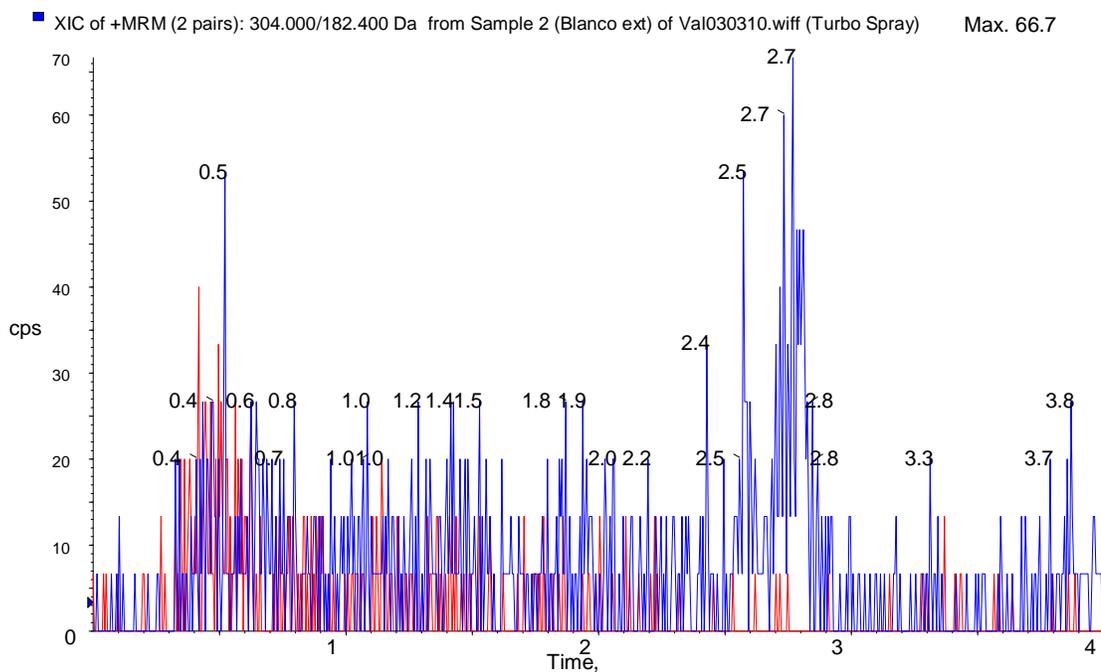


Figura 7. Cromatograma de la inyección de una muestra de larva blanco sin calibrador interno.

### 6.5.2.2 Recobro de extracción

Mediante la comparación de las áreas de los picos cromatográfico de cinco muestras enriquecidas previo a la extracción y las obtenidas de otras cinco muestras enriquecidas posterior a la extracción, el recobro absoluto promedio obtenido para cocaína en una concentración intermedia del rango lineal (1  $\mu\text{g/g}$ ) fue de: 76.43 % con CV% de 10.90 %.

### 6.5.2.3 Linealidad

El método mostró una respuesta lineal de la cocaína en el intervalo de concentraciones de 1 a 5000 ng/g, con coeficientes correlación y determinación de  $r = 0.997$  y  $r^2 = 0.994$ , respectivamente. Las cinco curvas de calibración, tres inyectadas el mismo día y una en cada uno de los dos días subsecuentes, presentaron una ecuación de la recta de  $y = 0.0213 \pm 0x + 0.103 \pm 0.074$  ( $y = m \pm s x + b \pm s$ ); la pendiente no presentó variación en el orden de magnitud expuesto en la ecuación calculada por el software Analyst 1.4.1, por lo que no fue posible calcular el CV%, en la Figura 8 se muestra una de cinco curvas de calibración.

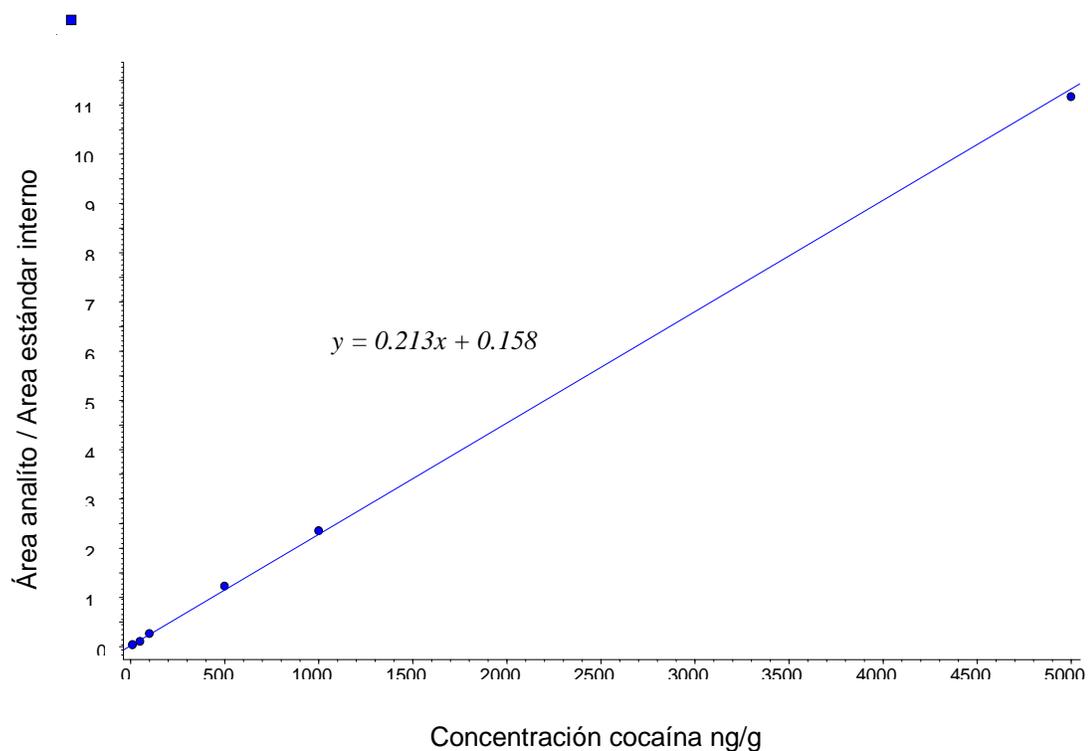


Figura 8. Curva de calibración del primer día de evaluación de linealidad.  $r^2 = 0.998$ .

#### **6.5.2.4 Exactitud y precisión**

Los parámetros de exactitud y precisión fueron evaluados en un día y más dos días consecutivos. Con el estudio de la precisión en un día o intra-día se evaluó la repetitividad y por tres días consecutivos o inter-días la reproducibilidad.

##### **6.5.2.4.1 Intra-día**

En un mismo día las cinco réplicas independientes de muestras enriquecidas ( $n = 5$ ) con concentración baja, media y alta (30, 300 y 3000 ng/g), del rango lineal establecido, se reportan en la Tabla 12, en donde el total de muestras analizadas presentaron valores dentro de un rango de:  $E_R$  84.67 a 104.60% y CV de 4.35 a 5.36%; lo que nos indica que tan exacto y preciso es el método en analizar muestras en un mismo día.

##### **6.5.2.4.2 Inter-días**

En tres días consecutivos, las quince réplicas independientes de muestras enriquecidas ( $n = 5/\text{día}$ ) con concentración baja media y alta (30, 300 y 3000 ng/g), del rango lineal establecido, se reportan en la Tabla 12; el total de las muestras presentaron valores dentro de un rango de:  $E_R$  de 83.33 a 113.00% con CV de 2.17 a 8.84%, en esta evaluación resultó que al agrupar los valores obtenidos de cocaína en los tres días consecutivos, la inexactitud e imprecisión es mayor que la evaluación en un solo día.

Tabla 12.- Exactitud y Precisión intra e inter días del método analítico para la determinación de cocaína.

Concentración de cocaína en larvas de <i>Ch rufifacies</i> . (ng/g)									
Agregada	Día								
	1			2			3		
	Encontrada	E <sub>R</sub> %	CV%	Encontrada	E <sub>R</sub> %	CV%	Encontrada	E <sub>R</sub> %	CV%
30	33,9	113.00	5.19	29.1	97.00	2.17	33.2	110.67	7.56
	32,1	107.00		28.6	95.33		28.5	95.00	
	30,7	102.33		28.0	93.33		31.5	105.00	
	30	100.00		29.5	98.33		29.8	99.33	
	30,2	100.67		28.2	94.00		34.3	114.33	
300	264	88.00	5.36	300	100.00	8.84	310	103.33	6.40
	287	95.67		311	103.67		289	96.33	
	256	85.33		286	95.33		303	101.00	
	261	87.00		250	83.33		325	108.33	
	250	83.33		313	104.33		341	113.67	
3000	2600	86.67	4.35	3080	102.67	7.45	3280	109.33	7.09
	2540	84.67		2620	87.33		3290	109.67	
	2820	94.00		3080	102.67		3300	110.00	
	2630	87.67		2700	90.00		2840	94.67	
	2760	92.00		2950	98.33		2940	98.00	

### 6.5.2.5 Límite de cuantificación

La menor concentración que el método puede determinar, expresado como límite de cuantificación (LC), fue de 10 ng/g, esta concentración correspondiente al punto más bajo de la curva de calibración, la precisión en la cuantificación de esta concentración y la desviación a su valor real se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Desviación porcentual y precisión del primer punto de la curva de calibración.

Concentración del primer punto de la curva de calibración (ng/g)			
Agregada	Encontrada	Desviación %	CV%
10	11.1	11.00	11.68
	10.8	8.00	
	11.8	18.00	
	8.73	-12.70	
	9.67	-3.30	

### 6.5.2.6 Límite de detección

El límite de detección (LD), el cual se estableció como la menor cantidad de cocaína que el método puede distinguir sobre la señal del ruido cromatográfico, fue de 0.625 ng/g, esta concentración presentó alturas de pico iguales a 3.5; 3.3 y 3.1 (Promedio = 3.3) desviaciones estándar del ruido sobre su propia media, en la Figura 9 se muestra la altura del pico de la cocaína ( $t_R = 0.45$  min) y su relación con la señal generada por el ruido.

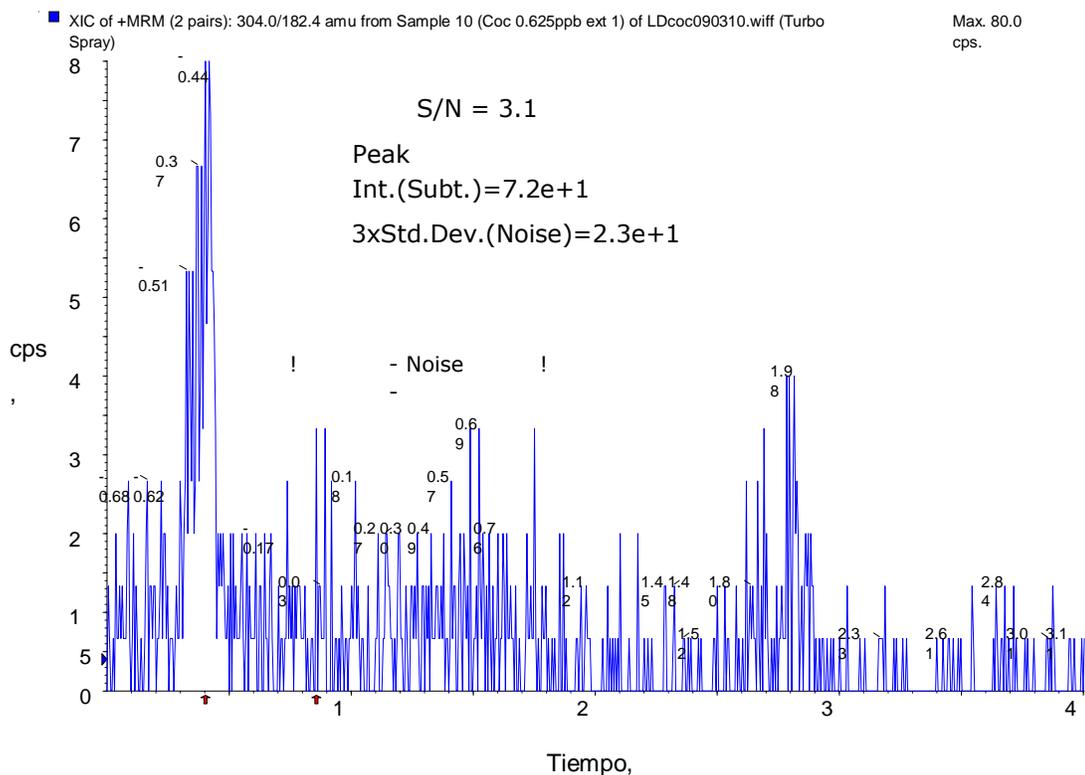


Figura 9: Límite de detección: Cromatograma de la inyección de una muestra enriquecida con una concentración de 0.625 ng/g de cocaína, con una relación señal:ruido (S/N) de 3:1.

## 6.6 Aplicación del método en muestra reales.

Dentro del periodo de junio a octubre del 2010 fueron encontrados varios cadáveres, partes anatómicas y prendas de vestir en quienes existió la sospecha y después confirmación de presencia de drogas. El método utilizado para la detección de drogas fue aplicado a larvas obtenidas de los cadáveres para la determinar la presencia de cocaína (en el insecto). En la Tabla 14 se detalla el resultado de la determinación de cocaína en los inmaduros mencionados líneas atrás.

Tabla 14. Determinación de cocaína en larvas de dípteros colectados de cuerpos humanos, partes anatómicas y prendas de cadáveres de interés médico legal.

Autopsia	Mecanismo de muerte	Sustancias detectadas en muestras humanas <sup>a</sup>	Material Entomológico	Determinación de cocaína en material entomológico
Parte 04-10	Se desconoce	No analizado	<i>C. macellaria</i> L3	< 10 ng/g <sup>c</sup>
05-10	Homicidio	No detectadas	<i>S. haemorrhoidalis</i> L2;L3	No detectado
06-10	Homicidio (arma de fuego)	Alcohol etílico, Cocaína	<i>Ch. rufifacies</i> L3; <i>C. macellaria</i> L3	15.1 ng/g ( <i>Ch. rufifacies</i> ); 21.0 ng/g ( <i>C. macellaria</i> )
07-10	Enfermedad (Infarto)	Alcohol etílico	<i>Ch. rufifacies</i> L3; <i>C. macellaria</i> L3	No detectado
08-10	Infarto	Alcohol etílico	<i>Ch. rufifacies</i> L2, L3	No detectado
09-10 <sup>b</sup>	Homicidio (arma blanca)	Cocaína	<i>M. domestica</i> L1	< 10 ng/g <sup>c</sup>
10-10	Homicidio	Alcohol etílico	<i>C. macellaria</i> L3	30.2 ng/g

<sup>a</sup> Las sustancias detectadas fueron en base estudios en sangre realizados de rutina en el Laboratorio de Química Forense, las sustancias rastreadas son psicotrópicos, estupefacientes y alcohol etílico.

<sup>b</sup> El sustrato donde se colectó fue una prenda tipo sudadera de fabricación sintética impregnada de sangre del cadáver.

<sup>c</sup> La cocaína fue detectada, sin embargo la señal se integra fuera del rango de cuantificación validado, por debajo del límite de cuantificación.

### 6.6.1 Larvas de dípteros positivos para cocaína

Las larvas del segundo y tercer estadio fueron colectadas de los siete cuerpos examinados, las cuales correspondieron a especies de importancia forense de tres familias; los califoridos *C. macellaria* y *Ch. rufifacies*; además del sarcófagido *S. haemorrhoidalis*, así como del muscideo *M. domestica*. Los análisis resultaron positivos para cocaína en cuatro cadáveres. Con excepción de las larvas del sarcófagido, las otras larvas resultaron positivas a la presencia de la droga en su cuerpo.

#### 6.6.1.1 Larvas colectadas de la parte 04-10.

Las larvas de tercer estadio de *C. macellaria*, presentes en la rodilla correspondiente a la parte 04–10, resultaron positivas para cocaína; sin embargo, la señal instrumental con relación al calibrador interno la sitúa en una concentración inferior al rango lineal establecido, dicho de otra forma, la concentración de cocaína fue detectable pero inferior a 10 ng/g (Figuras 10 y 11).

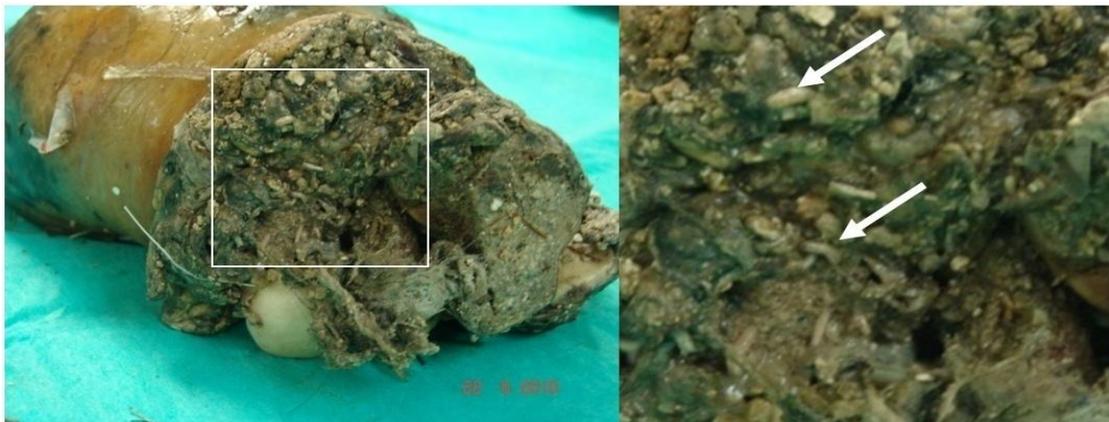


Figura 10. Fotografía de la Pieza 04-10. Corresponde a un fragmento de extremidad inferior identificada como rodilla colonizado por larvas de *C. macellaria*. Las flechas indican la ubicación de larvas sobre la superficie de la pieza, el resto de las larvas se encuentra presente en actividad en el interior de la pieza.

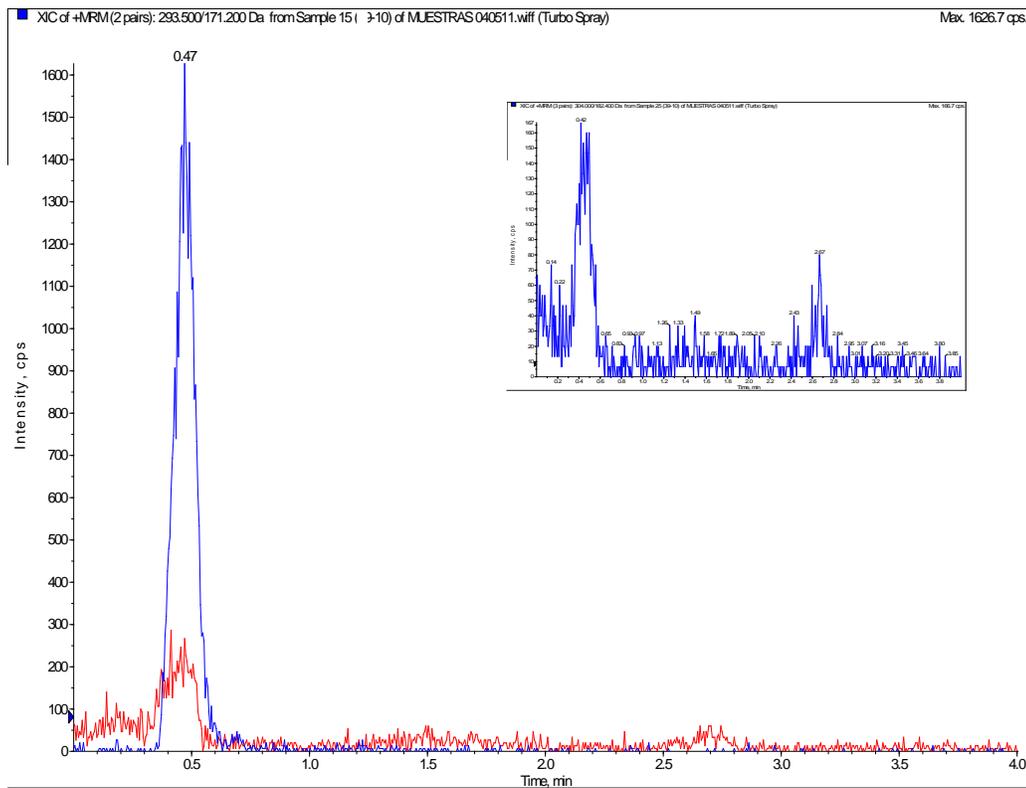


Figura 11. Cromatograma de la inyección de la muestra de *C. macellaria* colectadas de la Pieza 04-10. La señal de mayor intensidad corresponde a la transición 293.5 – 171.1 Th correspondiente a la benzoilecgonina-D3  $t_R$  0.41; La señal del recuadro corresponde a la transición 304.0 – 182.4 Th correspondiente a la cocaína  $t_R$  0.42.

### 6.6.1.2 Larvas colectadas de la autopsia 06-10.

Las larvas de tercer estadio de dos especies de califoridos *Ch. rufifacies* y *C. macellaria*, fueron tomadas del cuerpo perteneciente a la autopsia 06-10 donde fueron detectados alcohol etílico y cocaína; resultaron positivas para cocaína con concentración de 15.1 ng/g y 21.0 ng/g, respectivamente (Figuras 12 y 13).

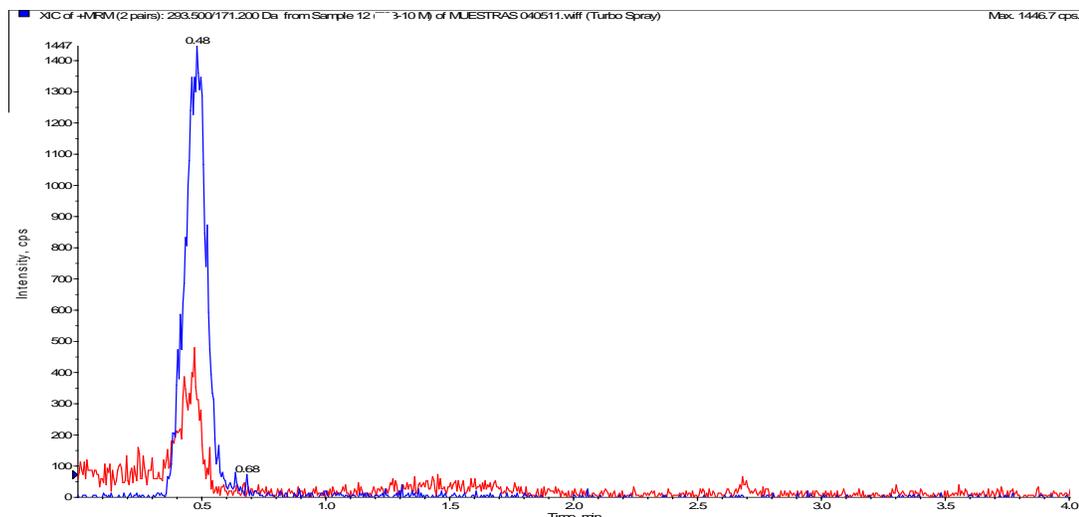


Figura 12. Cromatograma de la inyección de la muestra de *C. macellaria* colectadas de la autopsia 06-10. Las señales corresponden a las transiciones: 293.5 – 171.1 Th (mayor intensidad) correspondiente a la benzoilecgonina-D3  $t_R$  0.48; 304.0 – 182.4 Th (menor intensidad) correspondiente a la cocaína  $t_R$  0.47.

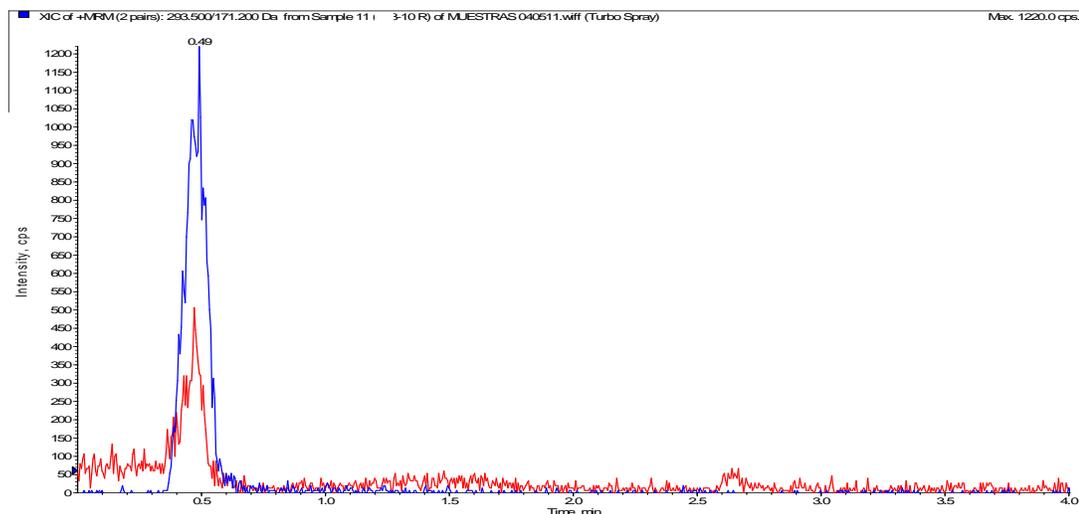


Figura 13. Cromatograma de la inyección de la muestra de *Ch. rufifacies* colectadas de la autopsia 06-10. Las señales corresponden a las transiciones: 293.5 – 171.1 Th (mayor intensidad) correspondiente a la benzoilecgonina-D3  $t_R$  0.50; 304.0 – 182.4 Th (menor intensidad) correspondiente a la cocaína  $t_R$  0.49.

### 6.6.1.3 Larvas colectadas de la chamarra que perteneciera en vida al cuerpo de la autopsia 09-10.

Las larvas de primer estadio de *M. domestica* presentes en la chamarra que perteneciera a uno de los cadáveres revisados, registrado como la autopsia 09-10 resultaron positivas; sin embargo, al igual que las larvas de *C. macellaria* (04-10), la señal instrumental, con relación al calibrador interno, la sitúa en una concentración inferior al rango lineal establecido, es decir, la concentración de cocaína fue detectable pero inferior a 10 ng/g (Figuras 14 y 15).

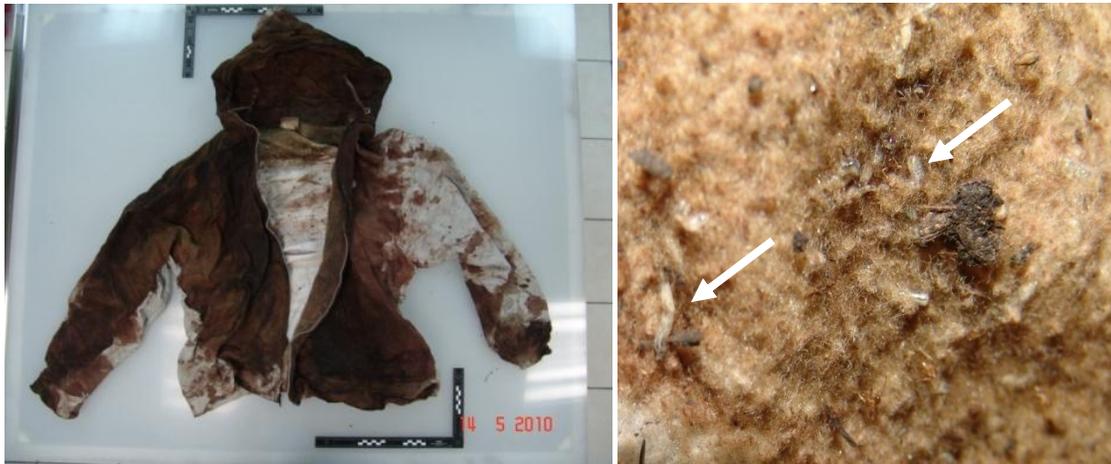


Figura 14. Fotografía de la chamarra colectada del cuerpo cuya autopsia correspondió la 09-10. Las flechas indican la ubicación de larvas de *M. domestica* alimentándose de la sangre presente en la prenda.

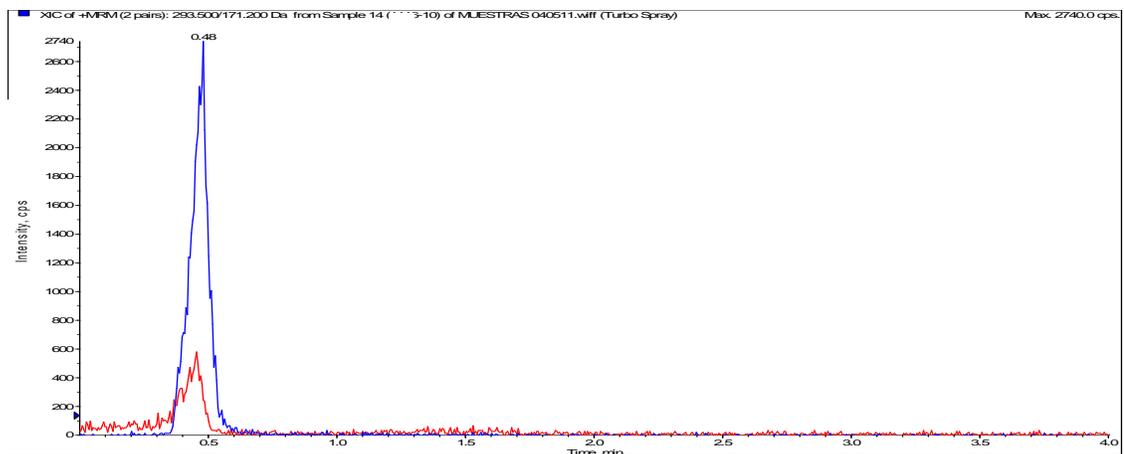


Figura 15. Cromatograma de la inyección de la muestra de *M. domestica* colectadas de la chamarra que perteneciera en vida al cuerpo de la autopsia 09-10. Las señales corresponden a las transiciones: 293.5–171.1 Th (mayor intensidad) correspondiente a la benzoilecgonina-D3  $t_R$  0.48; 304.0–182.4 Th (menor intensidad) correspondiente a la cocaína  $t_R$  0.47.

#### 6.6.1.4 Larvas colectadas de la autopsia 10 -10.

Del cuerpo de la autopsia 10-10 al cual se le detectó solamente alcohol etílico fueron tomadas larvas de tercer estadio de *C. macellaria*, después de realizar el análisis fue determinada la presencia de cocaína con concentración de 30,2 ng/g, Figura 16.

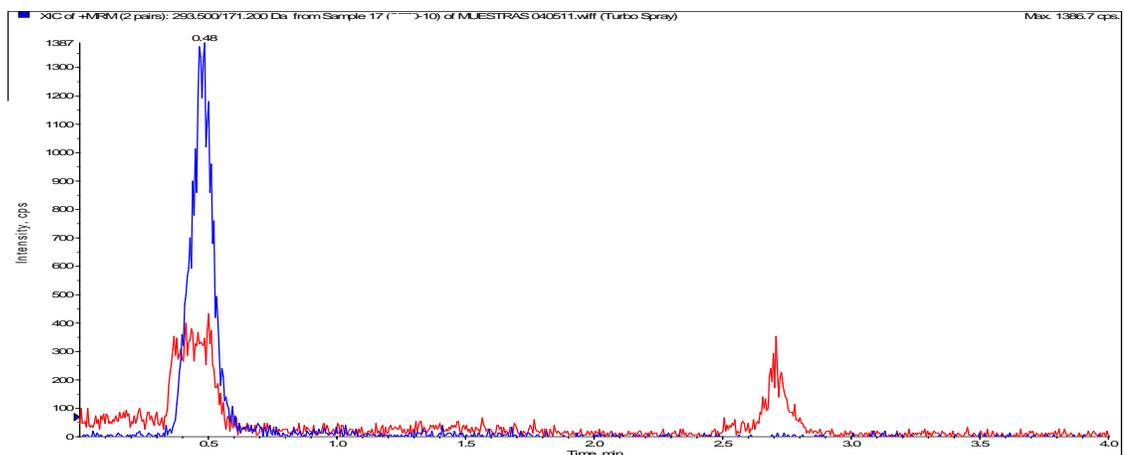


Figura 16. Cromatograma de la inyección de la muestra de *C. macellaria* colectadas de la autopsia 10-10. Las señales corresponden a las transiciones: 293.5 – 171.1 Th (mayor intensidad) correspondiente a la benzoilecgonina-D3  $t_R$  0.48; 304.0 – 182.4 Th (menor intensidad) correspondiente a la cocaína  $t_R$  0.41.

## 7. DISCUSIÓN

El presente estudio fue concebido para usar a los insectos que se alimentan de un cadáver como muestras alternas para la detección de tóxicos, de tal manera que puedan ser utilizados cuando los restos de un cuerpo no puedan ser utilizados. Con los resultados obtenidos podemos ver la factibilidad ya que al analizar algunas larvas de cuerpo con sospecha de intoxicación resultaron positivas a la cocaína.

Con el objetivo establecer una cría de moscas necrófagas presentes en la región, en el año 2009 fueron revisados cadáveres de humano en el SEMEFO de la PGJNL, de estos se obtuvieron larvas de las especies de dípteros fueron *Ch. rufifacies*, *Ch. megacephala* y *Lucilia sp.* Posteriormente, fue examinado otro grupo de cuerpos en el año 2010 a fin de coleccionar larvas de dípteros para la detección indirecta de cocaína en los cadáveres de humanos, en el 50% de estos cadáveres se encontró a *Ch. rufifacies*. Otras especies fueron: *Ch. megacephala* y *Lucilia sp.*, además de *S. haemorrhoidalis* y *M. domestica*.

*Chrysomya rufifacies*, fue la especie elegida para realizar los estudios de aislamiento y detección debido a que la especie más común de encontrar en los cadáveres de humano. Como especie fue descrita por primera vez en 1842 por el entomólogo francés Justin Pierre Marie Macquart, los adultos son moscas robustas de brillo metálico con color azul o verde, dualidad presente inclusive en miembros de la

misma colonia. Las facetas de los ojos son de tamaño uniforme y el espiráculo anterior con investidura externa pálida. (Whitworth, 2006).

Las larvas pertenecen a un grupo llamado *heary-maggot* o larvas peludas debido a lo alargado de sus tubérculos, los cuales están presentes en todo el cuerpo, en algunas especies presentan espinas y en el caso específico de esta solo en su punta (Sukontason *et al.*, 2003, 2006, 2008); presentan depredación facultativa sobre otras larvas necrofílicas. La especie es originaria de Australia, su introducción al Nuevo Mundo fue en Centroamérica (Costa Rica) en los años de 1970, desde entonces su rango se ha ido incrementando de tal forma que se ha reportado desde Canadá (Rosati y Van Laerhoven, 2007), alcanzado hasta Brasil (Almeida-Silva *et al.*, 2012).

De los cadáveres examinados en el año 2009 y 2010, las especies de mayor incidencias fueron *Ch. rufifacies*, encontrada en seis cuerpos y *C. macellaria*, en cuatro, ambas coincidieron en dos cadáveres. Wells y Greenberg (2010) reportaron que la presencia de larvas de *Ch. rufifacies* disminuyó la población de *C. macellararia* cuando estas dos especies coexisten en el mismo cadáver. Conocida también como gusano barrenador secundario de ganado, esta última es endémica del continente americano (FAO, 1993) que presenta grandes similitudes bionómicas con *Ch. rufifacies*.

Para el presente estudio, fue necesario generar los tiempos de eclosión, permanencia en cada estadio e inicio de la etapa prepupa de las larvas debido a que en los diversos ensayos efectuados se debía de evaluar o utilizar etapas del desarrollo en específico. Por otra parte estos registros ofrecen la posibilidad de ser utilizados como herramienta en la estimación del intervalo post-mortem (Wells y Lamotte, 2010).

Bajo la metodología planteada, la línea de crecimiento de *Ch. rufifacies* con base en su longitud, desde eclosión hasta inicio de la etapa post-alimenticia presentó una la

línea de forma recta, esta forma no coincide con las líneas graficadas de crecimiento de otras moscas de la familia Calliphoridae como *C. vicina* (Camacho, 2005), *L. sericata* (Tarone *et al.*, 2008) y *Hypopygiopsis violácea* Macquart (Chen *et al.*, 2011) las curvas de estos autores son de forma sigmoidea que describe un crecimiento lento al principio de la línea; por su parte Grassberger y Reiter (2001), reportaron gráficas de líneas a las que denominaron como “cascadas”, en donde se observó el cese temporal del crecimiento atribuible a la muda, una diferencia considerable con los otros autores y el presente trabajo fue para generar las gráficas seleccionaron en cada tiempo de medición solo las cuatro larvas de mayor tamaño y el presente trabajo la selección de las larvas fue al azar resultado en gráficas lineales.

En nuestros resultados ocurren traslapes en los rangos de largo y ancho larval del primero y segundo estadio, así como en el segundo y tercero, esto indica que existen dos claras asociaciones: el aumento de la longitud y el paso al siguiente estadio; la disminución del ancho larval y el inicio de cada estadio. Por otra parte, los rangos de tiempo de permanencia presentaron traslapes del primero y segundo estadio, así como en el segundo y tercero, esto puede atribuirse a la diferencia en el tiempo de ovoposición de cada mosca y a su vez de cada huevo en la masa de huevecillo, aunado a la propia distribución normal en los datos.

Al analizar las diferencias entre las medias de la longitud larval en dos muestreos consecutivos y separados por dos horas en la línea de crecimiento, encontramos que de los 44 pares de grupos formados, 23 de ellos son significativamente diferentes y en los 21 restantes no existe diferencia significativa. Esto se debe a que la tasa de crecimiento según la ecuación de la recta es de solo 0.16 mm/h, incluso es menor que la mayoría de los valores de desviación estándar de cada uno de las medias calculadas en cada grupo.

Se determinó la concentración necesaria para obtener una respuesta letal del 50 % de las larvas a prueba, la expresión fue dada como  $CL_{50}$  ya que al utilizar formulaciones comerciales no fue posible tener certidumbre de la cantidad exacta del insecticida aplicado al insecto (Lagunes-Tejeda, *et al.*, 2009), para lograrlo se utilizó una metodología propia, diseñada y estandarizada para este fin en donde las larvas estuvieran expuestas al insecticida vía alimentaria y por contacto al sustrato contaminado en condiciones controladas pero semejantes al supuesto ambiente de un cuerpo intoxicado con insecticidas. Este método podría ser utilizado para otras especies de larvas carroñeras

Los resultados de la  $CL_{50}$  mostraron que para paratión metílico y carbofuranó el primer estadio larval *Ch. rufifacies* fue significativamente más susceptible que el segundo estadio y este a su vez que el tercer estadio. La susceptibilidad disminuyó conforme avanza la edad en las larvas, la cual puede deberse al mecanismo físico en donde las propiedades del tegumento varían entre los estadios de vida, de tal forma que la rapidez de penetración puede alterarse (Badii y Garza, 2007); así como al hecho de que al aumentar la masa de la larva se requiere de mayor dosis del tóxico y a la acumulación en tejidos inertes (tejido graso). Si se considera el  $\log P_{o/w}$  del carbofurano (1.52) y paratión (3.83) (Klotz, *et al.*, 2001), ambos insecticidas son considerados lipofílicos y conforme avanza el desarrollo larval aumenta la concentración de grasa en la larva (Gillot, 2005).

Por otra parte, al analizar los resultados de la pendiente de la regresión en la respuesta para los insecticidas en los tres estadios larvales de *Ch. rufifacies* referidos en la Tabla 2, se muestra que para paratión metílico, el valor en el primer estadio es inferior al segundo, a su vez el valor en el segundo es inferior al del tercero; para el carbofurano

el valor de la pendiente en el primer estadio es inferior al segundo, a su vez el valor obtenido en el segundo es superior al del tercero. Esto indica que la heterogeneidad en la respuesta de las larvas de *Ch. rufifacies* para paratión aumenta conforme avanza su desarrollo, a diferencia del carbofurano en donde la heterogeneidad en la respuesta incrementa en el segundo estadio respecto al primero y disminuye en el tercero a tal grado que no es significativamente diferente a la del primer estadio.

Pocos estudios han determinado el efecto de insecticidas en el crecimiento de larvas de especies de interés médico legal (Rashid, *et al.*, 2008); de estos la estrategia en general es la exposición a concentraciones resultantes de la intoxicación letal en mamíferos no humanos. (Rashid, *et al.*, 2008; Liu, *et al.*, 2009; Mahat, *et al.*, 2009; Yan-Wei, *et al.*, 2010).

Al exponer a las larvas de cada estadio a su correspondiente CL<sub>50</sub> establecida de paratión metílico y carbofurano, su longitud después de 24 h de exposición respecto al control, resultó significativamente diferente en el primer estadio larval para ambos insecticidas y en el tercer estadio en el tratamiento con paratión metílico. Aún y cuando en el total de tratamientos evaluados en los tres estadios no mostraron como constante el efecto en la longitud larval, la disminución del número de individuos expuestos respecto a los no expuestos (control) en ambos tratamientos si fue constante.

Rashid, *et al.*, (2008), encontraron que al exponer larvas de *Ch. megacephala* a hígado de ratas sacrificadas con 1000 mg/kg de malatión (1.892 mg/g de malatión en hígado determinado cromatográficamente) presentaban una disminución en la longitud corporal en los tres estadios larvales respecto a un control, la exposición fue desde el primer estadio larval hasta la etapa pre-pupa o post-alimentaria. La mortalidad en las larvas expuestas a hígado con malatión fue mayor respecto al control.

En la presente evaluación no se observó una diferencia significativa al comparar las líneas de crecimiento con base en la longitud larval obtenidas al exponer desde el primer estadio a 1.756 y 0.441  $\mu\text{g/g}$  de paratión metílico y carbofurano respectivamente respecto al control. La diferencia entre ambas evaluaciones es que Rashid, *et al.*, (2008), expusieron a las larvas a concentración de malatión mayor a mil veces superior a la concentración de paratión metílico y carbofurano expuesta en el presente trabajo. Tanto en el reporte de Rashid, *et al.*, (2008), como en el presente trabajo la mortalidad aumento respecto al control.

Goff y Lord (2010), en una revisión de entomotoxicología mencionaron que la recuperación de tóxicos de artrópodos es en general mediante la homogenización y subsecuente procesamiento similar a otros tejidos y fluidos (humanos) o bien sometido a técnicas extractivas desarrolladas para el análisis de tejidos rígidos como pelos y uñas.

El método desarrollado fue diseñado para determinar la presencia de cocaína en larvas de mosca, sin contemplar o enfocarse en estructuras rígidas como el integumento o membranas de órganos, por tal motivo no fue requerido someter al cuerpo de la larva a procesos digestivos, el tratamiento de las larvas a fin de separar el analito de la mayoría de los elementos de la matriz (cuerpo de las larvas) constó de precipitaciones repetidas con acetonitrilo, el solvente fue elegido en base a su característica de lipofobicidad definida por su  $\text{Log } P_{o/w} = -0,17$  (chemicalize.org), al almacenamiento de grasa corporal en las larvas conforme avanza su crecimiento, a la solubilidad de la cocaína en el solvente y a la miscibilidad del sobrenadante en la fase móvil del método cromatográfico.

Como resultado el porcentaje de extracción fue superior al 80%. En cuanto a equipo, separación cromatográfica, ionización, detección, cuantificación, el método instrumental de análisis y la validación fue semejante al reportado por Johansen y Bhatia (2007) para la determinación de cocaína en sangre total, la separación se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con columna cromatografía de fase inversa C18 y un sistema de elución en gradiente consistente de ácido fórmico, agua y acetonitrilo, la detección mediante un Espectrómetro de Masas en tándem con ionización positiva por Electrospray y en modo de Monitoreo de Reacción Múltiple, la cuantificación fue mediante la relación de áreas entre el analito y un calibrador interno consistente en un metabolito deuterado.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de linealidad, precisión y exactitud del método fueron aceptables (FDA, 2001; Thompson *et al.*, 2002) lo que significa que el método permite cuantificar en forma confiable cocaína en larvas desde 10 ng/g hasta 5000 ng/g. En cuanto a la sensibilidad el método es capaz de detectar la cocaína en concentraciones desde 0,625 ng/g y considerando que existe evidencia de acumulación de tóxicos en larvas de moscas (Goff y Lord, 2010) el método podría incluso determinar, indirectamente, la presencia de cocaína en cadáveres aún y cuando la concentración en estos fuese inferior al límite de detección.

Por otro lado, la elección de *Ch. rufifacies* en la presente evaluación resulta interesante debido a que como especie presenta características como la depredación en su segundo y tercer estadio larval de otras especies de dípteros inmaduros de diversas familias como Muscidae, Sarcophagidae y de la propia Calliphoridae, presentes en el cuerpo en descomposición (Goff y Lord, 2010; Rosati y Van Laerhoven, 2007), por lo que tendría potencialmente otra fuente de alimento contaminado con cocaína

proveniente del cadáver. En prospectiva, se recomienda la evaluación de robustez, en específico la evaluación del efecto que tiene en la determinación de cocaína los ciclos de congelamiento y descongelamiento de muestras no contemplado en esta investigación. Por otra parte aún y cuando existe suficiente evidencia en el estudio de la selectividad del método que no hay compuestos endógenos que interfieran con la detección de la cocaína, es recomendable utilizar otras transiciones que aumente la especificidad.

El método fue aplicado en muestras reales de larvas carroñeras provenientes de cadáveres humanos de las cuales las que resultaron positivas presentan diferentes características en torno a las condiciones en las que colonizaron los dípteros estudiados.

Parte 04-10: Corresponde a un fragmento de una extremidad inferior identificada como rodilla con la presencia de larvas *C. macellaria*, el cual fue encontrado en una planta tratadora de aguas residuales, quienes resultaron positivas para cocaína con una concentración inferior al rango establecido. Más allá de la descomposición otros inconvenientes se presentan para llevar a cabo estudios toxicológicos directos en el fragmento anatómico, las condiciones y contaminantes no controlables a las que fue sometida la pieza antes de su hallazgo la hace una matriz analítica de composición no definida a diferencia de las larvas del díptero encontrado y que por compatibilidad con la vida deben presentar homeostasia, permitiéndole mantener controlada su composición química lo que la hace un espécimen adecuado para el estudio.

En el caso del cuerpo cuya autopsia le correspondió la 06-10 presentó colonización de dos especies de dípteros de la familia Calliphoridae (*Ch. rufifacies*, L3; *C. macellaria*, L3) en las larvas de ambas especies se detectó cocaína coincidiendo con el estudio toxicológico de rutina realizado de forma directamente en el cadáver.

En el cuerpo cuya autopsia correspondió la 09-10 fue encontrado en estado fresco sin colonización de insectos, sin embargo las ropas del cadáver presentaban abundante absorción de sangre proveniente de las heridas que posiblemente causaron su muerte, entre las prendas se encontró una chamarra de material sintético, dos días después de su separación en el cadáver fueron encontradas larvas de la especie *M. domestica* (L1) las cuales se alimentaban de la sangre. Aún y cuando las larvas presentes en la colecta se encontraban en el primer estadio fue posible la detección de la cocaína lo que sugiere que la sangre contenía este estupefaciente.

El cadáver al cual se le practicó la autopsia 10-10 correspondió al de una persona quien falleció en un enfrentamiento con armas de fuego en el límite del estado Tamaulipas en un área cercana al estado de Nuevo León. Del cuerpo se colectaron larvas de *C. macellaria* (L3) en donde se detectó la presencia de cocaína. Con la finalidad de conocer las condiciones en las que una persona pierde la vida y cuyo cuerpo se presenta en avanzado estado de descomposición resultaría interesante determinar la relación entre la concentración presente en las larvas de un tóxico y la concentración de este en el cuerpo al momento de su fallecimiento.

## 8. CONCLUSIONES

La entomofauna identificada en cadáveres de humano, en el Servicio Médico Forense de la Procuraduría General de Justicia en el Estado de Nuevo León, en los años 2009 y 2010, fueron principalmente insectos del orden Díptera, y de este grupo solo moscas de las familias Calliphoridae y Sarcophagidae. El otro orden de insecto presente en la entomofauna fue Coleóptera, con solo una especie de la familia Dermestidae. Mencionadas de mayor a menor incidencia en los cadáveres, las especies fueron las siguientes: *Ch. rufifacies* (6), *C. macellaria* (4) y en igual *Ch. megacefala*, *Lucilia sp.*, *Sarcophaga haemorrhoidalis* y *Dermestes caninus*.

La línea de crecimiento para *Ch. rufifacies*, obtenida en condiciones de laboratorio a una temperatura constante de 27 °C y humedad relativa de 56.09 %, fue graficada con los datos de tamaño larval (longitud y ancho) en función del tiempo y presentó forma de recta con coeficiente de correlación superiores a 0,98 desde el tiempo de eclosión hasta la etapa post alimentaria o prepupa (84 h). El rango de tamaño larval de *Ch. rufifacies* fue de 2,1 a 16,3 mm; los tiempo de permanecía de cada estadio y su respectivo el rango de longitud larval fueron: 14 h y de 2.1 a 3.1 mm en el primer estadio; 40 h y de 3.0 a 9.0 en el segundo estadio; 42 h y de 7.6 a 16.3 mm en el tercer estadio. Al analizar los datos obtenidos cada dos horas, se formaron grupos en los cuales 23 de 44 comparaciones presentaron diferencias estadísticamente significativas en la

longitud larval, lo que nos representó una tasa de crecimiento diferente pero en conjunto gráficamente se ajusta a una recta.

Al estimar la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) de paratión metílico y carbofurano en los tres estadios larvales de *Ch. rufifacies* encontramos que la susceptibilidad de las larvas de *Ch. rufifacies* a los insecticidas disminuye conforme avanza los estadios larvales del insecto y esta condición puede ser evaluada mediante el método estandarizado para la estimación de la  $CL_{50}$  de insecticidas en larvas expuesta por vía alimenticia y ectópica en un sustrato natural. Por otro lado la heterogeneidad en la respuesta de las larvas de *Ch. rufifacies* para paratión metílico aumenta conforme avanza su desarrollo, a diferencia del carbofurano en donde la heterogeneidad en la respuesta incrementa en el segundo estadio respecto al primero y disminuye en el tercero a tal grado que no es significativamente diferente a la del primer estadio. Comparando la susceptibilidad entre paratión metílico y carbofurano encontramos que las larvas de *Ch. rufifacies* fue significativamente más susceptible al carbamato.

En la determinación del efecto de la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) de paratión metílico y carbofurano en el crecimiento larval de *Ch. rufifacies* encontramos que la exposición a la  $CL_{50}$  de paratión metílico y carbofurano de cada uno de los tres estadios larvales de *Ch. rufifacies* presenta un efecto negativo al disminuir la población larval, sin embargo no presenta un efecto en el crecimiento larval constante en los tres estadios al monitorearse como longitud. La exposición desde la eclosión hasta etapa de prepupa de las larvas de *Ch. rufifacies* a la  $CL_{50}$  de paratión metílico y carbofurano estimadas en larvas de primer estadio no modifica la líneas de crecimiento de longitud larval en función de la edad.

Se desarrolló un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada Espectrometría de Masas en Tándem para detectar y cuantificar cocaína en larvas de moscas carroñeras presentes en cadáveres humanos, la forma de cuantificación de la cocaína fue mediante el método de estándar interno (benzoilecgonina-D3). Al evaluarlo encontramos que el método es selectivo al no encontrar interferencias de procedencia endógena, con una sensibilidad evaluada como límite de detección de 0,625 ng/g, un rango lineal de 10 a 5000 ng/g con una r de 0,99, la precisión y exactitud del método en un día fue de CV% de 4,35 a 5,36 y E<sub>R</sub>% 84,67 a 104,60; entre días de CV% de 2,17 a 8,84 y E<sub>R</sub>% 84,67 a 104,60.

Al Aplicar la metodología estandarizada para la detección y cuantificación de cocaína en larvas carroñeras, obtenidas de cadáveres humanos, encontramos que las larvas de dípteros ofrecen una alternativa aplicable como espécimen de estudio al detectar el estupefaciente en los casos en que los cuerpos presenten un avanzado proceso de descomposición, aún y cuando las muestras de fluidos como sangre y orina no están presentes en el cadáver e incluso cuando el cuerpo no está presente y las larvas en estudio se alimente de los fluidos del cuerpo.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abd El-bar, M.M. and Sawaby, R.F. 2011. A preliminary investigation of insect colonization and succession on remains of rabbits treated with an organophosphate insecticide in El-Qalyubiya Government of Egypt. *Forensic Science International* 208(1-3):26-30
- Abel, D.H.; S.S. Wastiand G.C. Hartmann. 1982. Saprothagous arthropod fauna associated with turtle carrion. *Applied Entomology & Zoology* 17:301-307
- Almeida-Silva, J.O., Carvalho-Filho, F.S., Esposito, M.C. and Reis, G.A. 2012, First record of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*. 56(1):115-118.
- Altunsoy, F. and Basaran, A.G. 2011. Effects of thallium on the larval development of *Lucilia sericata* Meigen 1826 and PMI estimation. *Life Sciences and Biotechnology*. 1(2):103-112.
- Amendt, J., Campobasso, C.P., Gaudry, E., Reiter, C., LeBlanc, H.N. y Hall, M. 2007. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *Int J Legal Med* 121: 90–104
- Amendt, J., Richards, C.S., Campobasso, C.P., Zehner, R. and Hall, J.R. 2011. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. 7: 379-392.

- Anderson, G.S. 1998. Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bears cubs. *Journal of Forensic Sciences* 44:856-859.
- Anderson, G.S. and S.L. Van Laerhoven. 1996. Initial studies on insect succession on carrion in southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Sciences* 41:617-625.
- Bachmann, J. and T. Simmons. 2010. The influence of preburial insect access on the decomposition rate. *Journal of Forensic Sciences* 55:893-900
- Badii, M.H. y Garza, V. 2007. Resistencia en Insectos, plantas y Microorganismos. *CULCYT*. 4(18):9-25
- Bavel, T. and Gardner, R.M. 2008. Evaluating Impact Spatter Bloodstains in: *Bloodstain Pattern Analysis*, Bavel, T. and Gardner. 3 eds. CRC: Florida, pp. 226-227
- Capinera JL. 2008. *Encyclopedia of Entomology*. Springer. Florida, pp. 1518–1519.
- Benecke, M. 2004. Forensic entomology: arthropods and corpses. En Tsokos M (ed.) *Forensic Pathology Review Vol II Human Press Totowa (NJ USA)* p 207-240.
- Biavati, G.M.; F.H. de Asis-Santana and J.R. Pujol-Luz. 2010. A checklist of Calliphoridae blowflies (Insecta: Diptera) associated with a pig carrion in Central Brazil. *Journal of Forensic Sciences* 55:1603-1606
- Blackith, R.E. and R.M Blackith. 1989. Insect infestations of small corpses. *Journal of Natural History* 24:699-709.
- Bornemissza, G.F. 1957. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Journal of Zoology* 5:5-12.

- Bourel, B.; L. Martin-Bouyer, V. Hedouin, J. C. Cailliez, D. Deroutand D. Gosset. 1999. Necrophilus insect succession on rabbit carrion in sand dune habitats in northern France. *Journal of Medical Entomology* 36:420-425.
- Braack, E.O. 1981. Visitation patterns of principal species of the insect-complex at carcasses in the Kruger National Park. *Koedoe* 24:33-49.
- Bushby, S.K., Thomas, N., Primel, P.A., Coulter, C.V., Rades, T. and Kieser, J.A. 2012. Determination of methylphenidate in Calliphorid larvae by liquid-liquid extraction and liquid chromatography mass spectrometry—Forensic entomotoxicology using an in vivo rat brain model. *J Pharm Biomed Anal.* 70:456-61.
- Byrd, J.H. 1998. Temperature dependent development and computer modeling of insect growth: its application to forensic entomology. Unpublished dissertation. Department of Entomology and nematology, University of Florida, Gainesville FL 196 pp.
- Byrd J.H. and J. L. Castner. 2001. Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations *CRC Press* Florida USA pp 331-340.
- Byrd. R.W. 2005. Autopsy Problem Associated With Postmortem Ant Activity. *Forensic Science, Medicine, and Pathology.* 1:37–40.
- Cabanellas-de Torres, G. 1993. Diccionario Jurídico Elemental. 11<sup>a</sup> Edición. Editorial Heliasta. pp. 222 – 223; 284.
- Chen, C.D., Nazni, W.A., Ramli, R., Min Chia, K.H. and Sofian-Azirun, M. 2011. First study on the larval growth parameter and growth rate of a forensically important blow fly, *Hypopygiopsis violacea* (Macquart, 1835) (Diptera: Calliphoridae). *IPCBE* 11: 159-163

- Calderon-Arguedas, O.; A. Troyoy M.E. Solano. 2007. Estimación del intervalo postmortem basada en la sucesión de larvas de muscoideos en modelos controlados. Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Entomología Forense, Sociedad Mexicana de Entomología pp 92-97.
- Camacho, G. 2005. Sucesión de la entomofauna cadavérica y ciclo vital de *Calliphoravicina* (Diptera:Calliphoridae) como primera especie colonizadora, utilizando cerdo blanco (*Sus scrofa*) en Bogotá. Revista Colombiana de Entomología. 31(2):189-197.
- Campobasso, C.P.; G. Di Vella and F. Introna. 2001. Factors affecting decomposition and diptera colonization. Forensic Sciences International 120:18-27.
- Campobasso, C.P.; R.H. Disney and F. Introna. 2004. A case of *Megascelia scalaris* (Loew) (Dip., Phoridae) breeding in human corpse. Aggrawal's, Int J Forensic Med & Tox 5:3-5.
- Campobasso, C.P.; M. Gherardi, M. Caligara, L. Sironi and F. Introna. 2004. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. International Journal of Legal Medicine 118:210-214.
- Centeno, N. 2007. Desarrollo de experiencias de descomposición con modelos porcinos y su contraste con dictámenes judiciales, incluyendo la protección de la vida salvaje. Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Entomología Forense, Sociedad Mexicana de Entomología pp 14-27.
- Coe, M. 1978. The decomposition of elephant carcass in tsavo (East) National Park, Kenya. Journal of Arid Environment 1:71-86.
- Cornaby, B.W. 1974. Carrion reduction by animals in contrasting tropical habitats. Biotropica 6:51-63.

- Davis, J.B. and M.L. Goff. 2000. Decomposition patterns in terrestrial and intertidal habitats on Oahu Island and Coconut Island, Hawaii. *Journal of Forensic Sciences* 45:836-842.
- De Jong, G.D. and W.W. Hoback. 2006. Effect of investigator disturbance in experimental forensic entomology: succession and community composition. *Journal of Medical and Veterinary Entomology* 20(2):248-258
- deCarvalho, L.M.L. and A.X. Linhares. 2001. Seasonality in insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. *Journal of Forensic Sciences* 46:604-608.
- deCarvalho, L.M.L.; P.J. Thyssen, A.X. Linhares and F.A.B. Palhares. 1999. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 95:135-138.
- Denno, R.F. and W.R. Cothran. 1975. Competitive interactions and ecological strategies of sarcophagid and calliphorid flies inhabiting rabbit carrion. *Annals of Entomological Society of America* 69:109-113.
- Deonier, C.C. 1940. Carcass temperatures and their relation to Winter blowfly populations and activity in the southwest. *Journal of Economic Entomology* 33:166-170
- Diaz Marín, I.; J.G. Sarabia Negrín, Z. Fernández Marroquin, y M. Rosales Matamoros. 2011. Miasis cutánea. Reporte de caso. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Rio*. 15:269–279.
- Early, M. and M.L. Goff. 1986. Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of O`hau, Hawaiian Island, USA. *Journal of Medical Entomology* 23:520-531.

- Easton, A.M. and K.G.V. Smith. 1970. The entomology of the cadaver. *Medical & Science Law* 10:208-219.
- Excell. 2007. Microsoft Office Enterprises. Version 12.0.4518.1014, Santa Rosa, California, Microsoft Corporation.
- FAO. 1993. Guía para la identificación de las moscas del género *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae) en: Manual para el control de la mosca del gusano barrendor del ganado. Vol 2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma. pp 4–6.
- Faucherre, J.; D. Cherixand and C. Wyss. 1999. Behavior of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) under extreme conditions. *Journal of Insect Behavior* 12:687-690.
- FDA. 2001. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S.: FDA
- Flores-Pérez, L.R.; H. Sánchez-Arroyo, S. Ibañezand M.D. García. 2007. Insectos asociados a la descomposición cadavérica del cerdo blanco (*Sus scrofa* L.). Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Entomología forense, Sociedad Mexicana de Entomología pp 111-115.
- Florez, E. y M. Wolff, 2009. Descripción y Clave de los Estadios Inmaduros de las Principales Especies de Calliphoridae (Diptera) de Importancia Forense en Colombia. *Neotropical Entomology* 38(3):418-429
- Gallagher, M.B.; S. Sandhu and R. Kimsey. 2010. Variation in developmental time for geographically distinct populations on common green bottle fly, *Lucilia sericata* (Meigen). *Journal of Forensic Sciences* 55:438-442.
- Gennard, D.E. 2007. Forensic Entomology. An Introduction. John Wiley & Sons. England. pp 1.

- George, K.A., Archer, M.S., Green, L.M., Conlan, X.A. and Toop, Tes. 2009. Effect of morphine on the growth rate of *Calliphorastygia* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology. *Forensic Science International*. 193(1-3):21-25.
- Gillot, C. 2005. Postembryonic development in: *Entomology*. 3 eds. Springer. Canada. pp. 628 -631.
- Goff ML. 2003. Forensic Entomology. In: *Encyclopedia of Insect*, Resh VH and Cardé RT. Academic Press. California, pp. 437- 442
- Goff, M.L. and W.D. Lord. 2010. Insect as toxicological Indicator and the Impact of Drugs and Toxin on Insect Development in: *Forensic Entomology The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. 2 eds. CRC: Florida. 427–434.
- Gosselin, M., M. Ramírez Fernández, S.M.R. Wille, N. Samyn, G. Boeck and B. Bourel, 2010. Quantification of Methadone and its Metabolite 2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in third instar larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) Using Liquid Chromatography-Tandem Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 34(7): 374-380.
- Grassberger, M. and Reiter, C. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegale-and isomorphen-diagram. *Forensic Science International*. 120: 32-36.
- Greenberg, B. 1990. Nocturnal oviposition behavior of blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 27:807-810.
- Gruner, S.V.; D.S. Slone and J.L. Capinera. 2007. Forensically important Calliphoridae (Diptera) associated with pig carrion in rural north-central Florida. *Journal of Medical Entomology* 44:509-515.

- Gupta, R.C., 2006. *Tóxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Elsevier Academic Press. California. pp. 3 - 24
- Hall, R.D. and K.E. Doisy. 1993. Length of time after death: effect on attraction and oviposition or larviposition of midsummer blow flies (Diptera: Calliphoridae) and flesh flies (Diptera:Sarcophagidae) of medical importance in Missouri. *Annals of Entomological Society of America* 86:589-593.
- Hall, R.D. 2008. Forensic Entomology. In: *Encyclopedia of Entomology*. Capinera, J.L. 2da edición. Springer: Florida, pp. 1518-1519
- Hall, R.D. 2010. Introduction: Perceptions and Status of Forensic Entomology. In: *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. Byrd, H., Castner, J.L., 2da edición. CRC: Florida, pp. 1-17
- Haskell, N.H. 1989. Calliphoridae of pig carrion in northwest Indiana: a seasonal comparative study. Unpublished Thesis, College of Agriculture, Purdue University, Lafayette pp. 57
- Jiron L.F. and V.M Cartin. 1981. Insect succession in the decomposition of mammal in Costa Rica. *Journal of New York Entomological Society* LXXXIX:158-165.
- Johansen, S.S. and H.M. Bhatia. 2007. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 852(1-2):338-344.
- Johnson, M.D. 1975. Seasonal and microseral variations in the insect populations on carrion. *Am Midl Nat* 93:79-80.

- Joy, J.E.; M.L. Herrell and P.C. Rogers. 2002. Larval fly activity on sunlit versus shaded raccoon carrion in southwestern West Virginia with special reference to black blowfly (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 39:392-397.
- Kharbouche, H.; M. Augsburger, D. Cherix, F.Sporckert, C. Giroud, C. Wyss, C. Champod, and P. Mangin. 2008. Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development. *Int J Legal Med.* 122:205–211
- Kocarek, P. 2001. Diurnal patterns of postfeeding larval dispersal in carrion blowflies (Diptera: Calliphoridae). *European Journal of Entomology* 98:117-119.
- Lagunes-Tejeda, A., Rodríguez-Maciél, J.C. y De Loera-Barocio, J.C. 2009. Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de artrópodos de México. *Agrociencia.* 43:173-196.
- Lane, R.P. 1975. An investigation into blowfly (Diptera: Calliphoridae) succession on corpses. *Journal of Natural History* 9:581-598.
- Liu, X., Shi, Y., Wang, H. and Zhang, R. 2009. Determination of Malathion levels and its effect on the development of *Chrysomya rufifacies* Fabricius) in South China. *Forensic Science International.* 192(1-3):14–18.
- Lopes de Carvalho, L.M., Linhares, A.X. and Badan, F.A. 2012. The effect of cocaine on the development rate of immature and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic Science International.* 220(1-3) :27-32.
- Lord, W.D. and J.F. Burger. 1984<sup>a</sup>. Arthropods associated with herring gull (*Larus argentatus*) and great black-backed (*Larus marinus*) carrion on islands in the gulf of Maine. *Environmental Entomology* 13:1261-1268.

- Lord, W.D. and J.F. Burger. 1984b. Arthropods associated with harbor seal (*Phoca vitulina*) carcasses stranded on islands along the New England coast. *International Journal of Entomology* 13:1261-1268
- Mahat, N.A., Zafarina, Z. and Jayaprakash, P.T. 2009. Influence of rain and malathion on the oviposition and development of blowflies (Diptera: Calliphoridae) infesting rabbit carcasses in Kelantan, Malaysia. *Forensic Science International*. 192(1-3):19-28.
- Martínez, A.P. y A.F. Hernández. 2010. Investigación Tóxicológica, en: *Medicina legal y toxicología*. Calabuig, G. 6 eds. Elsevier-Masson. España. pp. 778 – 810.
- Martínez, H.; F. Jaramillo, J. Escoto, M.L. Rodríguez, F.A. Posadas y I.E. Medina. 2009. Estudio comparativo preliminar de la sucesión de insectos necrófagos en *Sus scrofa* intoxicado con paratión metílico, en tres periodos estacionales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40(3):5-10.
- Molina-Chávez H.; M. Nava-Hernández, J. Luy-Quijada, S. Gutiérrez-Rodríguez y N. Galindo-Miranda. 2010. Dípteros de interés forense asociados con la putrefacción cadavérica en la ciudad de México. *Entomología Mexicana* 9:761-765.
- Mulieri, P.R.; J.C. Mireles and F.H. Aballay. 2012. Two species of *Microcerella* (Diptera: Sarcophagidae) found in highland arid landscapes of Argentina, during forensic studies. *Journal of Medical Entomology* 49:183-191
- Murthy, C.R. and M. Mohanty 2010. Entomotoxicology: A Review. *J Indian Acad Forensic Med*. 32 82 -84

- Musshof, F.; S. Padosch, S. Steinborn and B. Medea. 2004. Fatal blood and tissue concentration of more than 200 drugs. *Forensic Science International*. 142(2):161-210.
- Nava-Hernández, M.; H. Molina-Chávez, J.A. Luy-Quijada y N.E. Galindo-Miranda. 2007. Retrospectiva y expectativa de la Entomología Forense en México. La experiencia en el Distrito Federal. *Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Entomología Forense, Sociedad Mexicana de Entomología* pp 48-59.
- Payne, J.A. 1965. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology* 46:592-602.
- Peters, S.L. 2003. Temperature variations of dipteran larval masses analyzed on Florida black bear carcasses. Unpublished Thesis, Department of Entomology and Nematology, University of Florida, Gainesville pp 93.
- Putnam, R.J. 1978. The role of carrion-frequenting arthropods in the decay process. *Economic Entomology* 3:133-139.
- Quintero-Martínez, M.T.; A.E. Villa, S. Gutiérrez-Rodríguez, F.G. Alcantara, G. Juárez-Vega y V. Cisneros-Flores. 2007. Observaciones sobre la sucesión de diferentes insectos en cadáveres en granjas de gallinas y de cerdos en Tepatitlan, Jalisco, México; así como ovejas del Edo. de Morelos. *Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Entomología Forense, Sociedad Mexicana de Entomología* pp 92-97.
- Quiroz-Martínez, H. y V.A. Rodríguez-Castro. 2007. Entomología forense en Nuevo León. *Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Entomología Forense, Sociedad Mexicana de Entomología* pp 61-71.

- Rashid, R.A.; K. Osman, M.I Ismail, and R.M. Zuha. 2008. Determination of malathion levels and the effect of malathion on growth of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) in malathion-exposed rat carcass. *Tropical Biomedicine* 25(3):184-190.
- Richards, E.N. and M.L. Goff. 1997. Arthropod succession on exposed carrion in three contrasting tropical habitats on Hawaii Island, Hawaii. *Journal of Medical Entomology* 34:328-338.
- Rosatyi, J.Y., VanLaerhoven, S.L. 2007. New record of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Canada: predicted range expansion and potential effects on native species. *Canadian Entomologist*. 139(5):670–677.
- Sabanoglu, B. and O. Sert. 2010. Determination of Calliphoridae (Diptera: fauna and seasonal distribution on carrion in Ankara Province. *Journal of Forensic Sciences* 55:1003-1007.
- SSA. Secretaria de Salud. 1999. NOM-147-SSA1-1996. Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. *Diario Oficial de la Federación*. México, D.F.
- SSA. Secretaria de Salud. 2010. NOM-251-SSA1-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. *Diario Oficial de la Federación*. México, D.F.

- Semarnat. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2012. NOM-144-SEMARNAT-2012. Que establece las medidas fitosanitarias reconocidas internacionalmente para el embalaje de madera, que se utiliza en el comercio internacional de bienes y mercancías. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- Shaid, S.A.; R.D. Hall, N.H. Haskell and R.W. Merritt. 1999. *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) established in the vicinity of Knoxville, Tennessee, USA. *Journal of Forensic Sciences* 45:896-897.
- Simmons, T; P.A. Cross, R.E. Adlamand C. Moffatt. 2010. The influence of insects on decomposition rate in buried and surface remains. *Journal of Forensic Sciences* 55:889-892.
- Smith, K.G.V. 1975. The faunal succession of insects and other invertebrates on a dead fox. *Entomological Gazzete* 26: 277-287.
- SENESICA. 2011, Listado de Plaguicidas de uso Agrícola. [senesica.gob.mx](http://senesica.gob.mx).
- Silva-Mello, R. and Aguiar-Coelho. 2009. Durations of immature stage development period of *Nasionia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. *Parasitology Research* 104(2): 411-418.
- SPSS Inc. Released 2008. SPSS Statics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.
- Sukontason, K.L.; K. Sukontason, P. Narongchai, S. Lertthamnontham, S. Piangjai and J.K. Olson. 2001. *Chrysomya rufifacies* (Macquart) as a forensically-important fly species in Thailand: a case report. *Journal of Vector Ecology* 26:162-164.

- Sukontason, K.L., K. Sukontason, S. Lertthamngtham, B. Kuntalue, N. Thijuk, R.C. Vogtsberger and J.K Olson. 2003. Surface Ultrastructure of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) Larvae (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 40(3):259-267.
- Sukontason, K.L., P. Narongchaib, C. Kanchaib, K. Vichairatb, S. Piangjaia, W. Boonsriwonga, N. Bunchua, D. Sripakdeea, T. Chaiwonga, B. Kuntaluec, S. Siriwattananurungseea and K. Sukontason. 2006. Morphological comparison between *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Chrysomya villeneuvei* Patton (Diptera: Calliphoridae) puparia, forensically important blow flies. *Forensic Science International* 164(2-3):230-234
- Sukontason, K.; S. Piangjaia, S. Siriwattananurungseea and K.L. Sukontason. 2008. Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. *Parasitol Res* 102:1207-1216
- Tantawi, T.I.; E.M. El-Kady, B. Greenbergand H.A. El-Ghaffar. 1996. Arthropod succession on exposed rabbit carrion in Alexandria, Egypt. *Journal of Medical Entomology* 33:566-580.
- Tarone, A.M. and D.R. Foran. 2008. Generalized Additive Models and *Lucilia sericata* Growth: Assessing Confidence Intervals and Error Rates in Forensic Entomology. *Journal of Forensic Sciences*. 53(4): 942-948.
- Tenorio, F.M; J.K. Olsonand J. Coates. 2003. Decomposition studies, with a catalog and description of forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) in Central Texas. *Southwestern Entomology* 28:37-45.

- Tessmer, J.W; C.L. Meek and V.L. Wriyth. 1995. Circadian patterns of oviposition by necrophilous flies (Diptera: Calliphoridae) in southern Louisiana. *Southwestern Entomology* 20:439-445.
- Tomberlin, J.K. and P.H. Adler.1998. Seasonal colonization and decomposition of rat carrion in water and on land and open field in South Carolina. *Journal of Medical Entomology* 35:704-709.
- Thompson, M., Ellison, S.L. and Wood, R. 2002. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *PureAppl. Chem.* 74(5):835–855.
- Tullis, K. and M.L. Goff. 1987. Arthropod succession in exposed carrion in a tropical rainforest on Oáhu Island, Hawaii. *Journal of Medical Entomology* 24:332-339.
- Propieties Viewer (2013). Chemicalize.org. Recuperado el 5 de mayo de 2013 de:  
[www.chemicalize.org/structure/#!mol=Acetonitrile&source=fp](http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Acetonitrile&source=fp).
- Vanin, S.; A. Lafiscaand M. Turchetto. 2007. Determination of the time of death of a brown bear *Ursus arctosarctos* L. by means of insects. *Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Entomología Forense, Sociedad Mexicana de Entomología* pp 98-105.
- Vélez, M.C. y M. Wolff. 2008. Clave Ilustrada para la Identificación de los Géneros y las Especies de Califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldesia* 30(1): 231-244.
- Vergara-Pineda, S.; H. de Leon-Muzquiz, O. García-Martínez, M. Sifuentes-Cantu, M.H. Badiiy J.K. Tomberlin. 2009. Comportamiento de arribo de moscas necrófagas (Diptera: Calliphoridae) a un cadáver humano. *Entomología Mexicana* 8:792-797.

- Villanueva Cañadas, E. 2010. Data de la muerte y otros problemas tanatológicos médico-legales en: Medicina legal y toxicología. Calabuig, G. 6 eds. Elsevier-Masson. España. pp. 256.
- Watson, E.J. and C.E. Carlton. 2003. Spring succession of necrophilous insects on wildlife carcasses in Louisiana. *Journal of Medical Entomology* 4:338-347.
- Wells, J.D. and Lamotte, L.R. 2010. Estimating the Postmortem Interval in: *Forensic Entomology The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. 2 eds. CRC: Florida. 369 - 374.
- Whitworth, T. 2006. Key to the Genera and Species of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) of America North of Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 108(3): 689-725
- Wolff, M.; A. Uribe, A. Ortiz and P. Duque. 2001. A preliminary of study forensic entomology in Medellin, Colombia. *Forensic Sciences International* 120:53-59.
- Yan-Wei, Shi, Y., Xiao-Shan, Liu, X., Hai-Yang, Wang, H. and Zhang, R. 2010. Effect of Malathion on the Insect Succession and the Development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the Field and Implications for Estimating Postmortem Interval. *American Journal of Forensic Medicine, and Pathology*. 31(1): 46 -51.
- Zepeda-Cavazos, I.G. 2012. Línea de crecimiento de *Musca domestica* (Linnaeus) (Diptera: Musidae) y su uso para la estimación del intervalo post-mortem. Tesis de Licenciatura. UANL
- Zuñiga Carrasco, I.R. 2009. Miasis: un problema de salud poco estudiado en México. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 12: 121 – 125.

Zuha, R.M.; M. Supriyani and B. Omar. 2008. Fly artifact documentation of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) a forensically important blowfly species in Malaysia. *Tropical Biomedicine* 25: 17- 22.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Elton Solís Esquivel

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Entomología Médica

Tesis: ESTUDIO ENTOMOTOXICOLÓGICO DE PARATIÓN, CARBOFURANO Y COCAÍNA EN LARVAS DE MOSCA CARROÑERA DE INTERÉS MÉDICO FORENSE EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN.

Campo de Estudio: Entomología Médica.

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 24 de diciembre de 1979, hijo de Roberto Solís Contreras y Gloria Esquivel Rodríguez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado Químico Clínico Biólogo en 2001, cuarto lugar de generación; Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica en 2005, reconocimiento de alumno distinguido de posgrado Facultad de Medicina.

Experiencia Profesional: Perito Químico por honorarios PGJ del Edo de Nuevo León, 2001. Perito Químico PGJ del Edo de Nuevo León 2004. Encargado del Área Analítica DEBBIOM 2006 a 2007. Perito C, B, A, PGJ del Edo de Nuevo León 2011. Jefe de Grupo PGJ del Edo de Nuevo León 2011. Coordinador de Investigación Científica PGJ del Edo de Nuevo León 2012 a la fecha.