



Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación

Universidad Nacional de Córdoba

DETECCIÓN DE COCAÍNA EN LARVAS DE MOSCAS. PROPUESTA METODOLÓGICA PRELIMINAR EN EL USO DE LARVAS COMO MATRIZ BIOLÓGICA ALTERNATIVA EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS POST MORTEM

Trabajo Final Integrador

Especialización en Criminalística y Actividades Periciales

Bioq. Farm. Lic. en Qca. Fernanda Soledad Luna

Bioq. Esp. Marta Inés Biagi Bistoni

Córdoba – 2020



Este trabajo se distribuye bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 2.5 Argentina. Para ver una copia de esta licencia,
visitar: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/ar/>



El Trabajo Final Integrador (TFI) **“Detección de cocaína en larvas de moscas. Propuesta metodológica preliminar en el uso de larvas como matriz biológica alternativa en estudios toxicológicos post mortem”**, desarrollado por la Bioq. Farm. Lic. en Qca. Fernanda Soledad Luna y por la Bioq. Esp. Marta Inés Biagi Bistoni, alumnas de la ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA Y ACTIVIDADES PERICIALES, ha sido dirigido por:

.....
Dra. Biol. Moira Battán Horenstein
Directora del Proyecto Integrador

.....
Méd. Esp. Germán Ignacio Prado
Co - Director del Proyecto Integrador

*Dame, Señor,
agudeza para entender,
capacidad para retener,
método para aprender,
sutileza para interpretar,
gracia y abundancia para hablar.*

*Dame, Señor,
acierto al empezar,
dirección al progresar
y perfección al concluir.*

Santo Tomás de Aquino

A mis tres soles: Jaz, Nahu y Fede

A mi amor, Gera

A mi mamá Hilda, mi hermana Noe

y a mi ahijado Facu

(Fernanda)

A mis dos hijos: Lucio y Rami

A mi esposo, Agustín

A mis padres, Eduardo y Silvia,

mis hermanos, Euge y Fran

y sobrinos

A mi madrina, María de los Ángeles

(Marta Inés)

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de esta investigación contamos con la ayuda de muchas personas, a las que debemos nuestra gratitud.

En primer lugar, queremos agradecer especialmente a nuestra directora, Dra. Biól. Moira Battán Horenstein, por su dedicación, su paciencia, su empuje y sus correcciones. Por haber inspirado a través de sus clases, la elección de este tema.

A nuestro co-director, Med. Esp. Germán Prado por contar siempre con su apoyo, sus acertadas observaciones y por todas las gestiones realizadas para obtener los permisos necesarios, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de los experimentos planteados en el proyecto.

Al Tribunal Superior de Justicia de la Provincia de Córdoba a través de su Secretaría Penal por las facilidades brindadas y a la Dirección General de Policía Judicial, por el apoyo económico y por otorgarnos la posibilidad de cursar esta Especialidad.

A los miembros del Tribunal Examinador, por su tiempo y predisposición para participar en la evaluación de este trabajo.

A nuestra Jefa de División, Bioq. Laura Oviedo, por permitirnos realizar este trabajo y usar las instalaciones y equipos de la División Química Legal.

A nuestras familias por toda la paciencia y apoyo en estos años.

A nuestros compañeros de trabajo, especialmente a Javier y Leticia, por todos sus aportes científicos compartidos y a todas las áreas de la División Química Legal que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
SUMARY	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Entomotoxicología.....	2
1.2 Importancia del tema bajo estudio.....	3
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo General.....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Reactivos.....	7
3.2 Preparación del sustrato artificial	8
3.3 Obtención y cría de las larvas	9
3.4 Recolección y tratamiento de las larvas.....	11
3.5 Identificación taxonómica de las larvas.....	12
3.6 Detección de cocaína.....	13
3.6.1 En sustratos.....	13
3.6.2 Métodos de extracción en matriz larval	14

3.6.2.1 Extracción líquido- líquido (ELL).....	14
3.6.2.2 Extracción en fase sólida (SPE).....	15
3.6.3 Análisis Instrumental.....	17
3.6.3.1 Condiciones cromatográficas	17
3.6.3.2 Concentración mínima teórica detectable	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 Cría y obtención larvas	19
4.2 Tratamiento de las larvas para análisis	20
4.3 Identificación taxonómica	21
4.4 Detección de cocaína.....	22
4.4.1 En los sustratos.....	22
4.4.2 En la matriz larval	23
4.4.2.1 Extracción líquido-líquido (ELL)	23
4.4.2.2 Extracción en fase sólida (SPE).....	23
4.5 Análisis cromatográfico.....	24
4.5.1 Concentración mínima teórica detectable	30
4.6 Propuesta de protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas para la detección de cocaína	32
5. CONCLUSIONES.....	45
6. ANEXO.....	46
7. BIBLIOGRAFÍA.....	47

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BZE: Benzoilecgonina

COC: Cocaína

EME: Ecgonina metil éster

EF: Entomología Forense

ELL: Extracción líquido-líquido

ESI-MS/MS: Espectrometría de masas en tándem con Ionización por Electrospray (por sus siglas en inglés *Electrospray Ionization Tandem-Mass Spectrometry*)

etc.: etcétera

GC/MS: Cromatografía Gaseosa/Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*)

HPTLC: Cromatografía en capa delgada de alta performance (por sus siglas en inglés *High Performance Thin-layer Chromatography*)

IPM: Intervalo *post mortem*

LD: Límite de detección

LC-MS-MS: Cromatografía líquida/Espectrometría de masas en tándem (por sus siglas en inglés *Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry*)

msnm: metros sobre el nivel del mar

MS: Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, *Mass Spectrometry*)

m/z: Relación masa/carga

NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (por sus siglas en inglés *National Institute of Standards and Technology*)

rpm: Revoluciones por minuto

SIM: Monitorización selectiva de iones (por sus siglas en inglés *Selective Ion Monitoring*)

S/N: Señal/ruido (por sus siglas en inglés, *Signal/Noise*)

SPE: Extracción en fase sólida (por sus siglas en inglés *Solid Phase Extraction*)

tR: Tiempo de retención

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Representación de la distribución de las jaulas donde se muestran los diferentes lotes por triplicado10
2. Representación de la disposición del sustrato dentro de las jaulas. A) Sustrato seco. B) Sustrato en bolsa de polietileno11
3. Larvas dispuestas para su sacrificio por congelamiento, luego de su proceso de lavado. A) Larvas de lote blanco. B) Larvas “control lavado”12
4. A (arriba): Cromatograma de la inyección de una muestra de larvas blanco adicionadas con cocaína. B (debajo): Espectro de masa del pico de cocaína con sus iones 82, 182 y 303 m/z25
5. Cromatograma de la inyección de una muestra de larvas lote blanco, con ampliación de la zona entre los minutos 13 y 14, no se observa señal al tR de la cocaína.....26
6. Cromatograma de muestra de larvas del experimento N° 3 del lote A) de 5.00 mg/kg28
7. Cromatograma de muestra de larvas del experimento N° 5 del lote C) de 1.00 mg/kg28
8. Cromatograma de muestra de larvas del experimento N° 5 del lote A) de 10.00 mg/kg29
9. A (arriba): Cromatograma de muestra de larvas blanco adicionada con cocaína (0.75 µg/g de larva). B (debajo): Espectro de masa del pico de cocaína con sus iones 82, 182 y 303 m/z31

ÍNDICE DE TABLAS

1. Asignación de la concentración de cocaína en los sustratos de los distintos lotes8
2. Crecimiento de las larvas en los diferentes experimentos realizados19
3. Especies y familias del orden Diptera identificadas taxonómicamente22

RESUMEN

La entomotoxicología, desde una perspectiva forense, utiliza a los insectos o artrópodos presentes en el cuerpo como muestra alternativa en la asociación de tóxicos con el cadáver. Esta disciplina es particularmente importante cuando el cuerpo se encuentra en avanzado estado de descomposición y/o carece de tejidos o fluidos y no es posible realizar un estudio toxicológico de rutina. La cocaína, potente estimulante del sistema nervioso central, es ampliamente consumida en América y es uno de los tóxicos que puede estar presente en los restos en descomposición susceptible de ser incorporado por las larvas. El objetivo principal del presente trabajo fue desarrollar un método analítico cualitativo en el uso de larvas de moscas como matriz biológica alternativa en estudios toxicológicos *post mortem*, para la detección de cocaína. Las larvas se obtuvieron por colonización y cría artificial a partir de la oviposición/larviposición de moscas de la región sobre el sustrato seleccionado. Se utilizaron lotes de hígado vacuno adicionados con diluciones de cocaína hasta obtener concentraciones teóricas de cocaína en el rango 0.05 - 10.00 mg/kg de hígado. Se seleccionó la extracción en fase sólida (previo *clean up*) para extraer al compuesto de interés de manera adecuada y con la obtención de un extracto compatible con el procedimiento analítico final. Se estimó una concentración mínima teórica detectable de cocaína en 0.75 µg/g de larva con un tamaño de muestra de 5 g. Se detectó la presencia de cocaína en los lotes de hígado con concentraciones de cocaína de 10.00, 5.00 y 1.00 mg/kg. Se observó la colonización de ejemplares del orden Diptera, de las familias Calliphoridae y Sarcophagidae. Se propuso una metodología preliminar en el uso de larvas de moscas en estudios toxicológicos cualitativos *post mortem* y se redactó el correspondiente protocolo de trabajo para la detección de cocaína en la matriz larval. La aplicación del presente

protocolo puede significar una mejora al momento de formular conclusiones respecto a los casos y facilitar la resolución de los mismos. Es de esperar que la importancia de la entomotoxicología aumente cuando se apliquen sistemáticamente protocolos y se sumen más laboratorios que realicen estos análisis entomotoxicológicos.

Palabras claves: entomotoxicología, larvas, cocaína, *post mortem*, protocolo

SUMMARY

Title: Detection of cocaine in fly larvae. Protocol on the use of larvae as an alternative biological matrix in *post mortem* toxicological studies

Entomotoxicology, from a forensic perspective, uses insects or arthropods present in the body as an alternative sample in the association of toxins with the corpse. This discipline is particularly important when the body is in an advanced state of decomposition and/or lacks tissues or fluids so a routine toxic testing is not possible. Cocaine, a powerful stimulant of the central nervous system, is widely consumed in America and is one of the toxins that may be present in decaying remains that can be incorporated by larvae. The main objective of the present work was to develop an qualitative analytical method for the use of fly larvae as an alternative biological matrix in post-mortem toxicology studies, for the detection of cocaine. The larvae were obtained by colonization and artificial rearing from the oviposition/larviposition of local flies on the selected substrate. Different lots of bovine liver previously added with cocaine dilutions were used to obtain cocaine concentrations in the range 0.05 - 10.00 mg/kg of bovine liver. It was established that the solid phase extraction (previous clean up) fulfilled the objective of extracting the compound of interest in an optimal way, without matrix effects and the gathering of a compatible extract with the final analytical procedure. A theoretical minimum detectable concentration of cocaine was estimated at 0.75 µg/g of larvae with a sample size of 5 g. The presence of cocaine was detected in all substrates with cocaine theoretical concentrations of 10.00, 5.00 and 1.00 mg/kg. The colonization of specimens that belong to Calliphoridae and Sarcophagidae families (Order: Diptera)

was observed. A preliminary methodology was proposed for a qualitative toxicological analysis of fly larvae in post mortem studies, in the detection of cocaine and the corresponding work protocol was written. The application of this protocol might mean an improvement when formulating conclusions regarding cases and facilitating their resolution. It is expected that the importance of entomotoxicology increases as protocols are applied systematically and more laboratories join in to perform these entomotoxicology analysis.

Key words: *entomotoxicology, larvae, cocaine, post mortem, protocol*

1. INTRODUCCIÓN

Cuando un organismo muere sufre una serie de cambios físicos y químicos destructivos que incluyen autólisis, autodigestión y putrefacción, lo que produce una rápida alteración en su forma y estructura. Es así que un cuerpo en descomposición provee un hábitat altamente nutritivo para una amplia variedad de organismos que van desde hongos y bacterias hasta vertebrados carroñeros (1). El componente principal de la fauna asociada lo constituyen los artrópodos, y dentro de éstos, los insectos son el grupo predominante tanto en número de individuos como riqueza de especies (2-4). Estas especies, dependiendo de sus hábitos alimenticios, pueden ser clasificadas en: necrófagas, parásitas y predadores, omnívoras, oportunistas y accidentales (5-7). Las especies necrófagas pertenecen principalmente al Orden Diptera y son quienes cumplen el papel principal en el proceso de descomposición ya que utilizan el cadáver como recurso para el desarrollo de sus estados inmaduros. En efecto, las especies de las familias Calliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae (Diptera), principalmente, colonizan rápidamente los restos en descomposición durante las primeras etapas de este proceso, dejando gran cantidad de huevos y larvas que se alimentan activamente de estos. El proceso de descomposición determina la llegada de distintos necrófagos en forma secuencial, siguiendo un patrón de sucesión faunístico determinado y los primeros individuos en arribar, en regiones templadas, son las especies de la familia Calliphoridae: *Lucilia sericata* (Meigen 1826), *Lucilia ochricornis* (Wiedemann 1830), *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann 1830), entre otras.

El conocimiento de la biología de los artrópodos asociados con el proceso de descomposición de un cuerpo ha sido usado en numerosos trabajos en el ámbito de la Medicina Legal, área conocida como Entomología Forense (EF). La EF o entomología médico legal se define como el estudio de los artrópodos asociados a un

cuerpo en descomposición a fin de determinar, principalmente, el intervalo *post mortem* (IPM) (5), es decir, el tiempo transcurrido entre el momento de la muerte y el hallazgo del cuerpo. En cuanto a las diversas aplicaciones de la EF, además de estimar la data de muerte, incluyen la detección de drogas y tóxicos, de traumas *pre mortem*, la determinación de posibles movimientos de un cadáver, etc. (1), y hacen de esta ciencia una herramienta fundamental en las investigaciones forenses.

Además de lo antes descrito, se han establecido nuevos campos o aplicaciones de la EF, entre ellos los estudios toxicológicos y moleculares. Estas aplicaciones se llevan a cabo en los insectos presentes en un cuerpo en descomposición y pueden 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 (8).

1.1 Entomotoxicología

La detección de drogas en larvas puede ayudar a los entomólogos a determinar un IPM más certero, ya que el desarrollo de los insectos puede verse alterado por la presencia de drogas en el cadáver (9-14). Es importante destacar que en muertes por envenenamiento o relacionadas a las drogas en cadáveres esqueletizados, el análisis de las larvas de moscas puede ser el único recurso para que la búsqueda de tóxicos. La disciplina que estudia el uso de insectos en la detección de drogas y otras toxinas en los tejidos en descomposición se denomina Entomotoxicología (9).

Sus principales objetivos han sido la utilización de insectos necrófagos como una muestra toxicológica alternativa 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 (15, 16). En ese sentido, las larvas que se

alimentan de un cuerpo incorporan a sus tejidos sustancias presentes en el individuo, como metabolitos de barbitúricos, cocaína, anfetaminas, etanol e incluso venenos, los cuales quedan depositados en las cutículas de las larvas o en los puparios vacíos (9), por lo tanto, estas matrices son fuentes útiles para el análisis toxicológico *post mortem*. Esto es particularmente importante en aquellos casos en que el cuerpo se encuentra en avanzado estado de descomposición o cuando carece de tejidos o fluidos (esqueletización) y no es posible realizar un estudio toxicológico de rutina (9).

Cabe mencionar que la detección de drogas y otras toxinas en larvas de moscas es de carácter cualitativo y no cuantitativo ya que un porcentaje de lo ingerido es metabolizado por éstas. Algunas investigaciones, que utilizaron animales como modelo de estudio, demostraron una posible correlación entre la concentración de drogas en los tejidos y las diferentes etapas de desarrollo de los insectos criados sobre estos, debido al hecho que parte de la droga que consumen se metaboliza (12, 14, 17, 18, 19, 20). Varios estudios han demostrado que diferentes concentraciones de cocaína, metanfetaminas, heroína, entre otras, pueden acelerar o retardar el desarrollo larvario de los insectos (10, 11, 13, 21, 22), conduciendo a estimaciones del IPM erróneas.

1.2 Importancia del tema bajo estudio

Los análisis toxicológicos en cadáveres putrefactos son a menudo difíciles de realizar, debido a la ausencia de sangre y/u orina (o de cualquier matriz biológica procedente del cadáver), y es en estas situaciones donde los insectos se convierten en una matriz alternativa sumamente valiosa. Es así, que se reportan trabajos donde se han identificado distintas drogas presentes en cadáveres en descomposición o incinerados, mediante el análisis de las larvas que se alimentan de él y también a partir de los puparios vacíos encontrados junto a los restos (23-25). De esta manera,

los peritos forenses encargados del estudio toxicológico, interdisciplinariamente con peritos biólogos y médicos, aportarían a través de sus informes técnicos o periciales, evidencia de suma importancia a la causa.

Dentro de los estupefacientes, la cocaína es una de las drogas ampliamente consumida en América (26) y es considerada como uno de los estimulantes más potentes del sistema nervioso central (27). Está frecuentemente asociada a los accidentes de tráfico y crímenes violentos, junto con otras drogas, tal como lo demuestra un estudio realizado por el Observatorio Argentino de Drogas (28). Este estudio, describe que las muertes relacionadas al consumo de drogas, incluida la cocaína, en la población argentina de individuos de 15 a 64 años representan el 16.3% de las muertes totales para ese grupo de edad durante el mismo período. De ese 16.3%, aproximadamente un 10% se deben a lesiones, que incluye muertes por sobredosis, accidentes de transporte y homicidios, hechos en los que interviene el Servicio de Justicia. En adición, el consumo de cocaína se incrementó en un 100%, en la población argentina de individuos entre 12 y 65 años entre los años 2010 y 2017 (29). En relación a su metabolismo, la cocaína es transformada por hidrólisis enzimática, entre otros mecanismos, para producir benzoilecgonina (BZE), ecgonina metil éster (EME) y posteriormente ecgonina, siendo la BZE su metabolito mayoritario seguido por la EME (27).

Hasta donde conocemos, no hay registros de este tipo de estudios en Argentina, es decir donde se hayan utilizado las larvas de moscas como matriz biológica alternativa para análisis toxicológicos. Sin embargo, Zanetti y col. (30), pertenecientes al grupo de investigación de la Universidad Nacional de Quilmes (Argentina), determinaron experimentalmente fluoxetina en *Dermestes maculatus* De Geer, 1774. En América Latina, Brasil es el país donde se han llevado a cabo más experiencias en el área de la entomotoxicología (10, 21, 31, 32).

Por todo lo expuesto anteriormente, surge la necesidad de contar en el ámbito legal con un protocolo que estandarice los análisis entomotoxicológicos para

contribuir con las investigaciones forenses en Argentina. En el presente trabajo se desarrolló un método de detección de cocaína en larvas de moscas, utilizando como sustrato hígado vacuno, de manera de proponer una metodología preliminar para el análisis toxicológico cualitativo de larvas de moscas en estudios *post mortem*. Para ello fue necesario disponer de larvas las cuales se obtuvieron a partir de una colonización y cría artificial a partir de la oviposición (huevos)/ o larviposición (larvas) de moscas de la región sobre el sustrato seleccionado. El método analítico para la determinación de cocaína involucra extracciones en fase sólida-líquida y líquida-líquida y la determinación se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa (GC/MS). El proceso de extracción de la droga desde la matriz depende de la técnica a utilizar y es muy importante evaluar distintos procedimientos para seleccionar el más adecuado. En este sentido, se siguió un enfoque cualitativo con la finalidad de establecer presencia o ausencia de la droga en la matriz estudiada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo principal del presente proyecto es desarrollar un método analítico en el uso de larvas de moscas como matriz biológica alternativa en estudios toxicológicos *post mortem*, para la detección de cocaína.

2.2 Objetivos Específicos

1. Establecer una técnica que permita detectar cocaína en muestras de larvas alimentadas con hígado vacuno, que contengan diferentes concentraciones de la droga a estudiar.
2. Ensayar distintas condiciones de extracción/purificación, disponibles en el laboratorio de la División Química Legal, para cocaína, teniendo en cuenta la matriz a analizar, seleccionando el método más adecuado para el posterior análisis cromatográfico.
3. Estimar una concentración mínima teórica de cocaína en larvas de moscas detectable con la metodología propuesta.
4. Proponer un protocolo de trabajo para el análisis toxicológico de larvas de moscas en estudios *post mortem*, en la detección de cocaína.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la ciudad de Córdoba, provincia homónima, situada en el centro de Argentina, con una elevación de 400 msnm. Presenta un clima templado mesotermal, con temperaturas promedios de 11 °C en invierno y 24 °C en verano y con una pluviosidad media anual de 800 mm donde las precipitaciones prevalecen en los meses de octubre a diciembre y en el mes de marzo (33).

Los experimentos se llevaron a cabo en los meses de diciembre de 2016, abril y agosto de 2017 y en mayo y setiembre de 2018, con registros de temperatura promedios de 23 °C, 18 °C, 17 °C, 17 °C y 19 °C, respectivamente para cada mes (34). Se realizaron al aire libre, específicamente en la terraza del edificio de la Dirección General de Policía Judicial, ubicado en el centro de la ciudad, a una altura aproximada de 12 m. Se tuvo en cuenta que el período de sol directo no fuera muy prolongado, a los fines de no elevar demasiado la temperatura dentro de las jaulas y evitar la deshidratación del sustrato de cría.

3.1 Reactivos

La cocaína (COC) utilizada para este estudio fue proporcionada por la Sección Narcotráfico de la División Química Legal en respuesta a la solicitud de la Secretaría Penal del Tribunal Superior de Justicia de la Provincia de Córdoba. En un primer momento se utilizó una muestra suministrada de COC con un 41% de pureza y en una cantidad de 1.00 g, cuya sustancia de corte fue identificada como levamisol, de aquí en adelante COC-Levamisol. Debido a que hasta ese momento (mayo de 2017) no se obtuvieron resultados satisfactorios en el cultivo, es que se requirió una nueva muestra con un porcentaje de pureza más elevado y sin la presencia de sustancias de

corte activas. La nueva muestra de cocaína provista fue de 100 mg y presentaba un porcentaje de pureza de 81.5%, de aquí en adelante COC 81.5% de pureza. Se utilizó un estándar de cocaína marca Lipomed para el análisis instrumental.

Se emplearon los siguientes solventes grado HPLC: metanol, ácido acético, éter etílico, hexano, isopropanol, cloroformo, diclorometano y tolueno marca Cicarelli y J.T. Baker. Hidróxido de amonio acuoso y ácido clorhídrico, ambos pro-análisis marca Cicarelli. Se utilizó agua destilada, *buffer* fosfato pH 6 y *buffer* borato pH 9, sulfato de sodio anhidro y reactivo iodoplatínico.

3.2 Preparación del sustrato artificial

Para cada experimento se prepararon cuatro lotes de hígado triturado de 300 g cada uno. A tres de los homogenatos se los adicionó con diluciones de cocaína hasta obtener sustratos con distintas concentraciones teóricas según se detalla en la tabla 1. El lote restante se identificó como lote blanco, en este caso el hígado se mezcló con agua destilada.

Tabla 1. Asignación de la concentración de cocaína en los sustratos de los distintos lotes

Experimentos N°	Concentración de cocaína mg/kg por lote			
	Blanco	A)	B)	C)
1 - 2 - 3	0	5.00	0.50	0.05
4 -5	0	10.00	5.00	1.00

La selección de las concentraciones de cocaína en hígado de los experimentos uno, dos y tres está basada en reportes de investigaciones toxicológicas *post mortem* donde se detectó este estupefaciente en un amplio rango de concentraciones (35-37).

Las concentraciones de los experimentos cuatro y cinco están basadas en investigaciones donde la muerte de las personas se produjo por sobredosis con cocaína (38).

Cada uno de estos lotes fue mezclado manualmente por 10 min con el objeto de homogeneizar totalmente los preparados, dentro de una bolsa de polietileno con cierre hermético. Se tomó una muestra de 20 g de sustrato de cada lote para su posterior análisis de detección de cocaína, las cuales se conservaron en freezer.

3.3 Obtención y cría de las larvas

Para seleccionar el lugar donde se colocarían las jaulas para la oviposición/larviposición de moscas, cría y obtención de las larvas, se llevó a cabo una prueba ubicando una jaula con sustrato, sin el adición de cocaína, en la terraza del edificio de Policía Judicial. Esto se realizó para evaluar si era factible la llegada de moscas hasta la terraza, la cual se ubica a una altura aproximada de 12 m. Se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que se decidió disponer las jaulas de los experimentos en ese lugar.

Cada lote de sustrato se distribuyó equitativamente en tres contenedores plásticos transparentes de seis litros de capacidad, que hicieron de jaula, con una pequeña abertura lateral por la cual las moscas ingresaron a depositar sus huevos/larvas (Figura 1). Dentro de los mismos se colocó una base de material absorbente de humedad (vermiculita) y una bandeja descartable de plástico en la cual se acomodó el sustrato. Las jaulas se dispusieron al aire libre, durante 7-10 días aproximadamente para garantizar la colonización y oviposición/larviposición de los sustratos por partes de las moscas las cuales son atraídas por los compuestos que se liberan durante la descomposición. Una vez que las larvas eclosionaron de los huevos y comenzaron a alimentarse del hígado, se cerró el ingreso a nuevas moscas y

se tomó como tiempo final el momento en que las larvas comenzaron a migrar para pupar.

Es importante destacar que en esta investigación se le otorgó valor a la utilización de larvas con la cocaína incorporada en sus tejidos, de manera de asemejar el contexto de análisis lo más cerca posible a los casos reales.



Figura 1. Representación de la distribución de las jaulas donde se muestran los diferentes lotes por triplicado.

Entre el experimento N° 1 y N° 2 se realizó una prueba de cultivo con el objetivo de evaluar la retención de humedad por parte del sustrato. Para ello se utilizaron dos jaulas: una con sustrato más el agregado de COC-Levamisol y otra con sustrato sólo. En esta ocasión se incorporó la utilización de una bolsa de polietileno transparente, en la cual se colocó cada sustrato; de esta manera se obtuvieron resultados positivos en relación al desarrollo larval, en ambas jaulas. En las figuras 2 se muestra el sustrato dentro de las jaulas.

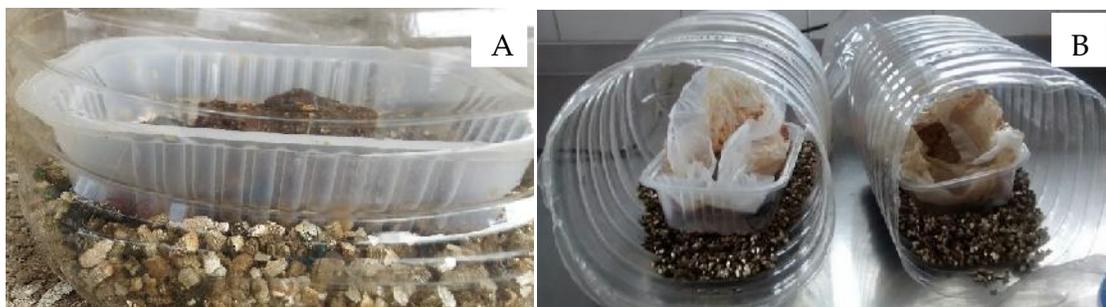


Figura 2. Representación de la disposición del sustrato dentro de las jaulas. A) Sustrato seco.
B) Sustrato en bolsa de polietileno

3.4 Recolección y tratamiento de las larvas

Se probaron dos metodologías de sacrificio de las larvas para su posterior análisis toxicológico. Los procedimientos se realizaron en distintos momentos, en larvas de diferentes experimentos.

Se recolectaron todas las larvas activas de cada una de las jaulas utilizando pinzas de plástico, los ejemplares fueron sacrificados siguiendo dos procedimientos:

1. Primero se sacrificaron con agua caliente y luego, para eliminar toda la contaminación externa, se lavaron bajo el grifo, con abundante agua corriente y un enjuague final con agua destilada. Finalmente, se secaron en papel absorbente y se llevaron a freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su análisis.
2. Primero se lavaron bajo el grifo, con abundante agua corriente y un enjuague final con agua destilada. Luego se secaron en papel absorbente y se llevaron a freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sacrificándolas por muerte por congelamiento, conservándolas allí hasta su análisis.

El primer método se aplicó en los primeros tres experimentos, en tanto que el segundo método se utilizó en los experimentos restantes. Estos procedimientos se llevaron a cabo para seleccionar el método de sacrificio más adecuado para el

posterior análisis toxicológico, ya que ambos se documentaron en la bibliografía consultada (39, 40-42). Para descartar que los resultados positivos de cocaína en las larvas se deban a contaminación externa por parte del sustrato, debido a un ineficiente lavado de los especímenes, es que se procedió a realizar un control del proceso y se colocaron larvas del lote blanco en contacto con el sustrato adicionado con cocaína en la concentración más alta (5.00 y 10.00 mg/kg). Posteriormente, se procedió al exhaustivo lavado y al correspondiente análisis al que se sometieron las larvas de los distintos experimentos, estas larvas se identificaron como “control lavado”. En la figura 3 se observan algunas de las larvas obtenidas en los experimentos, dispuestas para su sacrificio por congelamiento.



Figura 3. Larvas dispuestas para su sacrificio por congelamiento, luego de su proceso de lavado. A) Larvas de lote blanco. B) Larvas “control lavado”.

3.5 Identificación taxonómica de las larvas

Para la identificación de las larvas obtenidas de los experimentos se tuvo en cuenta caracteres taxonómicos citados en la bibliografía (39, 43). Complementariamente, se determinaron moscas adultas que quedaron capturadas en las jaulas (40, 44) y otras que emergieron de las pupas obtenidas del experimento N° 3.

Las larvas y moscas adultas se observaron bajo un microscopio de disección (Stemi 305, Zeiss). Se usó una fuente de luz de fibra óptica para iluminar muestras sobre un fondo contrastante. Cada muestra se fotografió con una cámara digital (ERc 5s Axiocam, Zeiss) y el software Zen lite para medir los parámetros de longitud y anchura al 0.001 mm más cercano.

Todas las observaciones taxonómicas tanto de larvas como de los adultos recolectados fueron realizadas por la Dra. Moira Battán Horenstein (CONICET-UNC).

3.6 Detección de cocaína

3.6.1 En sustratos

Para confirmar la presencia de cocaína en los sustratos adicionados con esta droga se analizaron 10 g de homogeneizado de cada lote por extracción líquido-líquido y confirmación por GC/MS, correspondientes a cada experimento con desarrollo larval positivo. En recipientes plásticos con tapa se colocaron los sustratos y se le agregaron 15 ml de agua destilada y se llevó a pH 2 con HCl. Se agitó manualmente y se dejó reposar 24 horas. Luego el macerado se acondicionó para centrifugarlo a 3000 rpm por 15 min. El sobrenadante se filtró en papel Whatman N° 40 y se alcalinizó a pH 11 con hidróxido acuoso de amonio y se incorporó a una columna Extrelut (Merck). Se dejó interactuar 15 min, finalmente se eluyó con 20 ml de cloroformo. El eluato fue evaporado y se reconstituyó con 200 µl de diclorometano y se colocó en un inserto de vidrio con resorte para vial de vidrio de 2 ml, tapa a rosca marca Agilent Technologies. Posteriormente se analizó por GC/MS.

3.6.2 Métodos de extracción en matriz larval

La preparación de la muestra es un paso vital del proceso analítico ya que asegura que las muestras sean adecuadas para la determinación cromatográfica de la sustancia de interés. Es por ello que se deben controlar las condiciones de extracción/purificación del analito. Para la elección de la técnica, solvente o sistema de solventes de extracción se utilizaron procedimientos que se realizan actualmente en el Laboratorio de la División Química Legal para la detección de cocaína en muestras biológicas y otros descriptos por la literatura (14, 38, 40). En los ensayos de las distintas condiciones de extracción, además de las larvas del lote blanco, se incluyó una muestra de larvas blanco fortificada con un extracto con cocaína, ya confirmado por GC/MS; esta muestra cumplió el rol de un control positivo.

A los fines de determinar la metodología más adecuada, se realizaron técnicas de extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida (SPE) descriptas a continuación.

3.6.2.1 Extracción líquido- líquido (ELL)

En una primera instancia se realizó la extracción en tubo de vidrio y en columnas de Extrelut (Merck), de manera simultánea, para los lotes de mayor concentración (5.0 mg/kg) del experimento N° 3. Las extracciones se realizaron por duplicado.

Extracción en tubo: 2 g de muestra de larvas se trituraron con 3 ml de agua destilada en mortero de porcelana y se colocaron en tubo de vidrio HACH, se llevó a pH 2 con HCl y se agregaron 6 ml de hexano, se agitó vigorosamente por un minuto y se desechó la fase orgánica, esto se realizó en una segunda ocasión. La fase

inorgánica se alcalinizó a pH 11 con hidróxido de amonio acuoso y se le agregaron 6 ml de éter etílico como solvente de extracción, este procedimiento se realizó dos veces más, la fase recuperada en las tres extracciones se filtró con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad por corriente de aire bajo campana.

Extracción en columna Extrelut: 2 g de muestra de larvas se trituraron con 6 ml de agua destilada en mortero de porcelana y se colocaron en tubo de vidrio HACH. Se agitó en vortex por un minuto y se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. El sobrenadante se filtró en papel Whatman N° 40 y se alcalinizó a pH 11 con hidróxido de amonio acuoso y se incorporó a una columna Extrelut. Se dejó interactuar 15 min, para la elución se utilizó cloroformo.

Los extractos se analizaron por cromatografía en capa delgada de alta performance (HPTLC). Se sembraron sobre placas de Sílica 60 F254, en plancha calefactora a 30 °C. Se utilizó como fase móvil metanol/amoniaco (100:1,5). La placa cromatográfica se reveló mediante aspersion de solución al 10% de HCl y se observó a la luz UV, luego se calentó en plancha calefactora a 80 °C por 5 min, se observó nuevamente fluorescencia al UV y por último se roció con reactivo iodoplatínico ácido. Este *screening* tuvo el objetivo de revelar la presencia de grasa y de alguna otra sustancia que pudiera interferir para el análisis de cocaína por GC/MS.

3.6.2.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Se realizó la extracción con columnas de intercambio iónico Bond-Elut 130 mg marca Varian, con un sistema de bomba de vacío, evaluando el resultado obtenido (de acuerdo a la señal cromatográfica) en distintos tamaños de muestras de larvas. Se analizaron tamaños de muestra de 1, 2 y 5 g de larvas de cada lote. Cada tamaño de muestra se analizó por duplicado. Las larvas se trituraron en mortero y se colocaron en un tubo HACH.

Previo a la utilización de las columnas de SPE, se ensayaron las siguientes metodologías para el *clean up*:

1. Cada 2 g de larva se agregaron 5 ml de *buffer* borato pH 9 y se homogeneizó agitando 5 min en vortex, luego se agregaron 5 ml de éter etílico, se agitó nuevamente por 2 min más y se centrifugó a 3000 rpm por 20 min. Posteriormente, la fase orgánica se transfirió a un tubo de vidrio y se agregaron 2 ml de HCl 2 M, se agitó por 2 min en vortex y nuevamente se centrifugó a 3000 rpm por 20 min. Separada la fase acuosa ácida, se le agregaron nuevamente 4 ml de éter etílico y se agitó por 2 min y se centrifugó a 3000 rpm por 20 min, se descartó la fase orgánica y se reservó la fase acuosa para su análisis por SPE.

2. Cada 2 g de larvas se agregaron 5 ml de metanol y se homogeneizó agitando 5 min en vortex. Se dejó reposar unos minutos y luego se centrifugó a 3000 rpm por 20 min. Para 2 y 5 g se realizó nuevamente este procedimiento. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio y se agregaron 4 ml de ácido acético 1 N, se homogeneizó en vortex. A continuación se agregaron 3 ml de mezcla etér etílico:hexano (3:1) y se agitó en vortex durante 2 min. Finalmente se centrifugó a 1500 rpm durante 20 min, se desechó la fase orgánica y se reservó la fase acuosa para su análisis por SPE.

La fase acuosa obtenida se pipeteó en las columnas de SPE siguiendo las especificaciones del fabricante para el análisis de cocaína y metabolitos. A 5 ml de la fase acuosa se le adicionó 2 ml de *buffer* fosfato pH 6, se homogeneizó en vortex controlando que el pH se encuentre entre 4 y 6. La columna se acondicionó añadiendo de manera secuencial: 2 ml de metanol y 2 ml de *buffer* fosfato pH 6 sin dejar que la columna se seque. Luego se dejó pasar por la columna la fase acuosa obtenida sin aplicar vacío. Para limpiar la columna se hizo pasar 6 ml de agua destilada, 3 ml de HCl 0.1 M y luego se dejó secar la columna aplicando vacío (15 mmHg) por 15 min. Una vez seca, se agregaron 9 ml de metanol. Se utilizó como

solvente de extracción 2 ml de una mezcla de diclorometano/alcohol isopropílico (80/20) y 2% de hidróxido de amonio acuoso. La fase orgánica obtenida se dejó evaporar durante toda la noche bajo campana.

Cada extracto obtenido en ambas técnicas de extracción (ELL y SPE) se reconstituyó con 200 μ l de diclorometano y se colocó en un inserto de vidrio con resorte para vial de vidrio de 2 ml, tapa a rosca, para su posterior análisis por GC/MS. Aquellos extractos que presentaron una gran cantidad de ácidos grasos, no fueron inyectados en el cromatógrafo.

3.6.3 Análisis Instrumental

La detección e identificación de la droga estudiada se realizó por GC/MS, metodología de referencia para el analito que se pretende detectar en este trabajo. En cada secuencia de análisis se inyectó un estándar de cocaína como un control para el análisis por GC/MS.

3.6.3.1 Condiciones cromatográficas

Se colocó el vial de vidrio en el carrusel de inyección automática del GC marca Agilent Technologies modelo 7890B, acoplado a un MS marca Agilent Technologies modelo 5977A, con ionización por impacto electrónico a 70 eV. La columna capilar utilizada fue HP-5MS (5 % fenilmetil siloxano) ultra inert (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m MSD). El volumen de inyección fue de 2 μ l y las condiciones de operación fueron las siguientes: la temperatura del inyector fue de 250 °C con un *split* 5:1, la temperatura inicial del horno fue 70 °C con un incremento de 19 °C/min hasta 250 °C (se mantiene

por 17 min) con un tiempo total de corrida de 26.5 min. Se utilizó Helio ultrapuro (Air Liquide) como gas carrier con un flujo de columna de 1.0 ml/min.

La operación del MS se realizó en forma *Scan* con un intervalo de detección de masa menor de 45.0 m/z y de masa mayor de 450.0 m/z . Durante el análisis se adquirieron todos los espectros. Los iones selectos para la detección de la cocaína fueron 82, 182 y 303 m/z . La identificación de la cocaína se realizó por comparación con testigo de cocaína marca Lipomed y por comparación de los iones por biblioteca NIST, incorporada al software del equipo.

3.6.3.2 Concentración mínima teórica detectable

Se estimó una mínima concentración teórica con base en la señal cromatográfica de la cocaína cuya altura de pico pudiera diferenciarse del ruido, es decir, con una relación señal/ruido (S/N) igual o mayor que 3:1. Para ello se utilizaron larvas del lote blanco adicionadas con cocaína en concentraciones decrecientes del analito de interés ($n=3$). Estas concentraciones fueron establecidas con base en la bibliografía (9, 20).

Una vez seleccionada la técnica de extracción, muestras de larvas del lote blanco se trituraron en mortero y se dividieron en tres lotes a los cuales se les adicionó cantidades de una solución madre de cocaína de concentración 299.2 mg/l de manera de obtener concentraciones de cocaína teóricas de 0.50, 0.75 y 1.00 $\mu\text{g/g}$ de larva. Finalmente se procedió al análisis de 5.00 g de larvas por SPE (previo *clean up*) y luego por GC/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cría y obtención larvas

En el presente estudio se llevaron a cabo cinco experimentos a lo largo de dos años (2016 a 2018) en todas las estaciones: verano, otoño, invierno y primavera con el objetivo de criar y obtener larvas de moscas para su utilización como matriz para la detección de cocaína. Previamente se realizaron dos ensayos a modo de prueba para poner a punto la metodología de cría y obtención de larvas. En la tabla 2 se detallan los resultados obtenidos de cada experimento.

Tabla 2. Crecimiento de las larvas en los diferentes experimentos realizados

Fecha	Sustrato	Desarrollo larval	Observaciones
Experimento N° 1 09/12/2016	Hígado + COC- Levamisol	Se observó oviposición/larviposición, no hubo crecimientos de larvas	El sustrato se secó, no logró retener humedad
Experimento N° 2 22/04/2017	Hígado + COC- Levamisol	Se obtuvieron pocas larvas (02/05/2017)	El sustrato se colocó dentro de una bolsa de polietileno con apertura superior
Experimento N° 3 05/08/2017	Hígado + COC- Levamisol	Se recolectaron larvas, pupas y moscas adultas (17/08/2017)	Se identificaron moscas que quedaron atrapadas y adultos que emergieron de las pupas
Experimento N° 4 12/05/2018	Hígado + COC 81.5% pureza	Se observó oviposición/larviposición, no hubo crecimientos de larvas	El sustrato se secó a pesar de la bolsa de polietileno
Experimento N° 5 11/09/2018	Hígado + COC 81.5% pureza	Se recolectaron larvas (22/09/2018)	Se realizó un duplicado por cada lote

En el experimento N° 1, si bien se constató la llegada de moscas y hubo oviposición/larviposición en la mayoría de las jaulas, no se observó desarrollo larval en ninguno de los sustratos. En el experimento N° 2 no hubo crecimiento de larvas en varias de las jaulas, incluso no se observó desarrollo en uno de los lotes control, a pesar de la utilización de las bolsas de polietileno.

En el experimento N° 3 se obtuvo desarrollo de larvas en todas las jaulas, incluso en las concentraciones más elevadas. Las larvas recolectadas presentaban distintos tamaños, también se extrajeron moscas muertas que quedaron atrapadas en las jaulas y varias pupas.

En los experimentos N° 4 y N° 5, la cocaína adicionada a los sustratos (COC 81.5% de pureza) presentaba mayor porcentaje de pureza además de no contener levamisol ni ninguna otra sustancia de corte activa, asimismo los sustratos se colocaron en bolsas de polietileno similar al experimento anterior.

En cuanto al experimento N° 4, el sustrato se preparó con la nueva muestra de cocaína y a pesar de la utilización de la bolsa, se secó en la mayoría de las jaulas debido a la falta de humedad en la preparación original y a las temperaturas ambiente elevadas. Esto trajo como consecuencia que no hubo desarrollo larval en ninguna jaula, no obstante, se observó oviposición/larviposición en algunos sustratos.

Finalmente se decidió realizar el último experimento, disponiendo cada lote por duplicado. En este experimento final se aseguró que la preparación de hígado, colocada dentro de la bolsa de polietileno, presentara una suficiente humedad para evitar el resecamiento. De esta manera se logró obtener nuevamente oviposición/larviposición y desarrollo larval. Al cado de 11 días se recolectaron larvas en todos los tratamientos.

4.2 Tratamiento de las larvas para análisis

En un primer momento no se obtuvieron resultados satisfactorios en las larvas de lotes adicionados con cocaína, sacrificadas con agua caliente, para la detección de este estupefaciente. Es decir, no se logró detectar la cocaína en los primeros ensayos de evaluación de las técnicas de extracción. Esto puede deberse que a temperaturas elevadas las proteínas son rápidamente desnaturalizadas, se afecta la estabilidad del tejido larvario y de la hemolinfa, lo que disminuiría la disposición del tóxico ante el contacto del solvente de extracción (45). Por consiguiente, se decidió utilizar otro método de sacrificio de las larvas de los posteriores experimentos.

Se obtuvieron resultados positivos en la detección de cocaína en las larvas del experimento N° 5, las cuales fueron sacrificadas por congelamiento. En adición, una vez que se seleccionó la técnica de extracción, larvas recolectadas de los experimentos N° 2 y N° 3 que se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ también fueron positivas en el análisis de cocaína por GC/MS. Por lo tanto, un resultado positivo en la detección de esta droga en la matriz larval depende, principalmente, de la técnica de extracción empleada y no tanto del método de sacrificio utilizado. De todas maneras, el congelamiento es el procedimiento sugerido por la literatura para este tipo de estudio toxicológico (9, 45).

En relación a las larvas “control lavado”, en el análisis cromatográfico no se detectó la presencia de cocaína en las mismas, por lo tanto, el lavado fue eficiente. De este modo se descartan resultados falsos positivos debido a contaminación externa por contacto con los sustratos adicionados con cocaína.

4.3 Identificación taxonómica

Se observó la colonización de ejemplares del orden Diptera, de las familias Calliphoridae y Sarcophagidae.

Se identificaron larvas en el tercer estadio que correspondieron a individuos de las especies *Lucilia sericata*, *Calliphora vicina*, *Sarconesia chlorogaster* y ejemplares de la familia Sarcophagidae sp. Asimismo se realizó la identificación de los adultos presentes en las jaulas de los experimentos N° 2 y N° 3. En la tabla 3 se detallan las familias identificadas en los diferentes experimentos, en los cuales se obtuvo desarrollo.

Tabla 3. Especies y familias del orden Diptera identificadas taxonómicamente.

Experimento	Larvas estadio III	Adultos
	Orden Diptera	Orden Diptera
Experimento N° 2 Mayo 2017	<i>Calliphoridae: Lucilia sericata</i> Sarcophagidae sp.	Sarcophagidae sp.
Experimento N°3 Agosto 2017	<i>Calliphoridae: Calliphora vicina</i>	<i>Calliphora vicina</i>
Experimento N° 5 Septiembre 2018	<i>Calliphoridae: Lucilia sericata</i> <i>Calliphoridae: Sarconesia chlorogaster</i> Sarcophagidae sp.	-

4.4 Detección de cocaína

4.4.1 En los sustratos

Se detectó la presencia de cocaína en todos los sustratos analizados preparados a partir de las concentraciones de cocaína teóricas de 10.00, 5.00 y 1.00 mg/kg. En las concentraciones de 0.5 y 0.05 mg/kg de cocaína en hígado se observó una señal cromatográfica con mucho ruido y no se logró detectar la cocaína en

algunos de estos sustratos. Mientras que no se detectó la presencia de cocaína en ninguno de los sustratos correspondientes a los lotes blanco de cada experimento.

4.4.2 En la matriz larval

4.4.2.1 Extracción líquido-líquido (ELL)

Utilizando esta metodología, tanto en la extracción en tubo como en columna se obtuvieron extractos con gran contenido lipídico, lo cual se observaba macroscópicamente. El alto contenido de grasas dificultaba la identificación de la cocaína en las muestras, en las corridas cromatográficas HPTLC.

De acuerdo a las características de los extractos obtenidos, los mismos no fueron inyectados en el cromatógrafo, debido a que no se obtuvo un buen *clean up* con esta técnica de extracción. Sin embargo, algunos investigadores obtuvieron resultados satisfactorios para la detección de cocaína en larvas aplicando esta metodología (47,48).

4.4.2.2 Extracción en fase sólida (SPE)

De los métodos de extracción evaluados en este trabajo, se obtuvieron mejores resultados utilizando SPE, con un tamaño de muestra de 5 g (homogenización en mortero) y realizando el procedimiento de *clean up* que utiliza metanol, ácido acético y una mezcla de etér etílico:hexano (3:1).

Fue necesario utilizar tres columnas de intercambio iónico en la extracción de la fase acuosa obtenida, de esta forma se evitó saturar la columna.

Se lograron extractos limpios a simple vista para todos los tamaños de muestra analizados, con menor contenido de lípidos y de interferentes, aptos para una inyección cromatográfica. Estos resultados se corresponden con lo citado en bibliografía en relación a esta metodología para el analito estudiado en la matriz larval (14, 49).

La técnica SPE cumplió con el objetivo de extraer el compuesto de interés de manera óptima, sin efectos de matriz y con la obtención de un extracto compatible con el procedimiento analítico final (GC/MS).

Es preciso aclarar que cuando se realizan procesos de extracción, es necesario realizar ensayos de recuperación y utilizar un estándar interno, el cual se agrega a la muestra al inicio del proceso para controlar y corregir la extracción del analito desde la matriz. El porcentaje de recuperación debe ser estable, preciso y reproducible. En este trabajo no fue posible realizar estos ensayos debido a que este laboratorio no dispone de un estándar interno para este tipo de análisis.

4.5 Análisis cromatográfico

Bajo las condiciones cromatografías establecidas para el análisis, el tiempo de retención (t_R) de la cocaína en la matriz larval fue de 13.195 min. En la figura 4 se observa el cromatograma, con su correspondiente espectro de masa, de una muestra de larvas del lote blanco adicionadas con cocaína (control positivo).

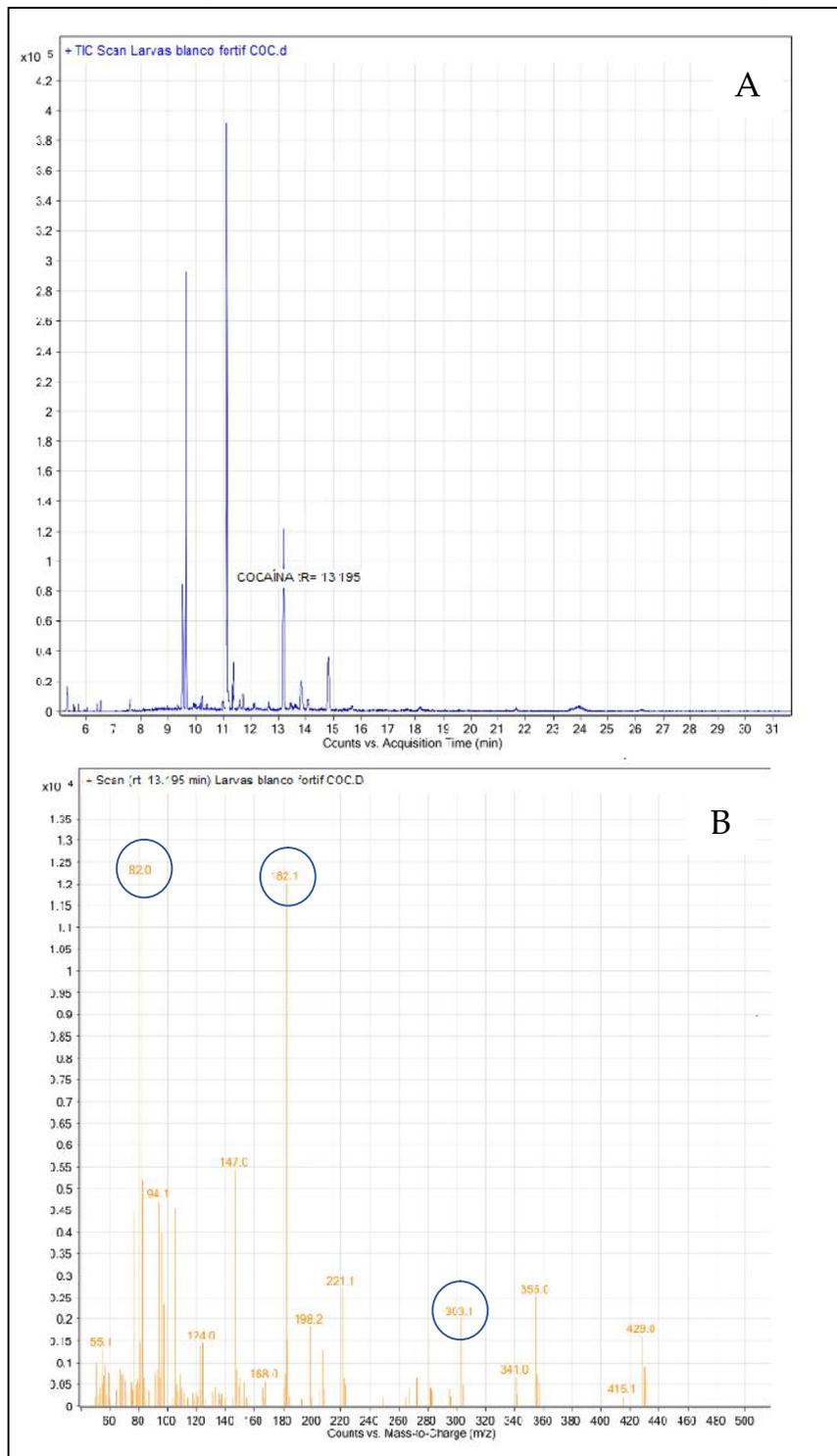


Figura 4. A (arriba): Cromatograma de la inyección de una muestra de larvas blanco adicionadas con cocaína. B (debajo): Espectro de masa del pico de cocaína con sus iones 82, 182 y 303 m/z.

En los cromatogramas obtenidos de los extractos SPE de las larvas blanco de todos los lotes de los experimentos con desarrollo larval, no se observó la presencia de interferentes endógenos en el tR de la cocaína.

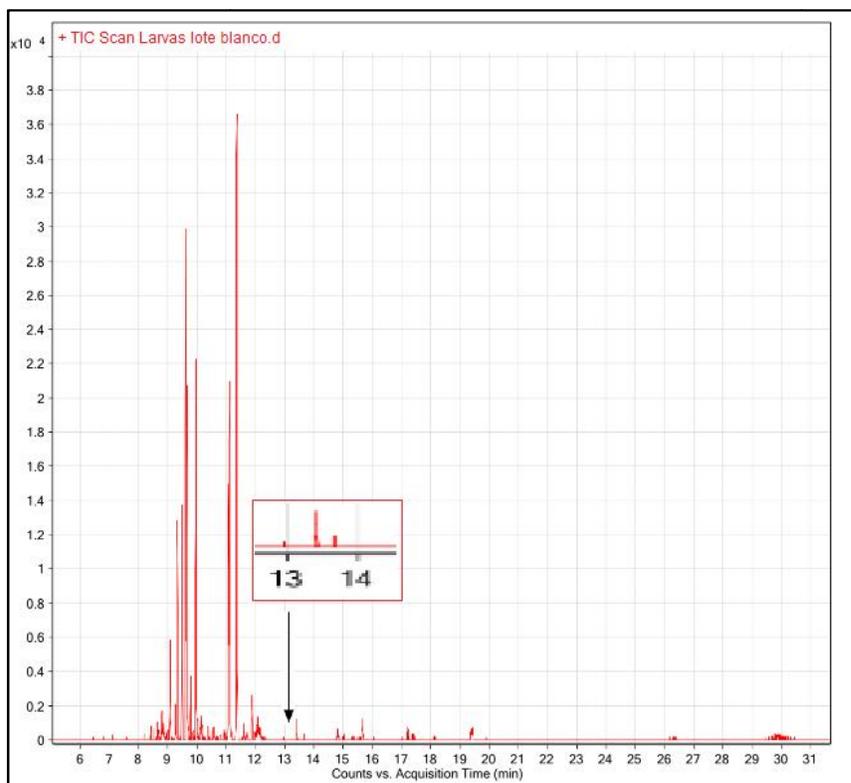


Figura 5. Cromatograma de la inyección de una muestra de larvas lote blanco, con ampliación de la zona entre los minutos 13 y 14, no se observa señal al tR de la cocaína.

No se detectó la presencia de cocaína en los tamaños de muestras de 1 y 2 g de larvas de ninguno de los lotes de los experimentos N° 2, 3 y 5. En el tamaño de muestra de 2 g, si bien no se obtuvo un pico diferenciable de la línea de base, en el tR de la cocaína que pueda distinguirse de la señal del blanco, se observaron algunos iones de este analito (82 y 182 m/z) en el espectro de masas. Es por ello que se decidió aumentar el tamaño muestral hasta 5 g.

Una de las ventajas de automatizar la inyección es que se realiza de manera más precisa, en forma automática y permite el análisis de una secuencia de muestras liberando al operador del proceso de inyección de muestras. No obstante, una de las limitaciones de la inyección automática es que el extracto necesita una mayor dilución frente a una inyección manual. Esto influye en la cantidad de cocaína a detectar ya que en una inyección manual los extractos están mucho más concentrados en comparación con los extractos para inyección automática.

Se detectó la presencia de cocaína en las muestras de larvas correspondientes a los experimentos N° 2 y 3 en los lotes de concentración 5.00 mg/Kg de cocaína en hígado, y en todas las concentraciones evaluadas del experimento N° 5 (1.00, 5.00 y 10.00 mg/Kg). En las figuras 6, 7 y 8 se observan los cromatogramas correspondientes a larvas del experimento N° 3 de los lotes de concentración 5.00 mg/kg y de larvas del experimento N° 5 de los lotes de concentración 1.00 y 10.00 mg/kg, respectivamente. Se identifica a la cocaína de acuerdo al tR que presenta en cada uno de los cromatogramas y al espectro de masa comparado con el de un estándar de cocaína y con el que figura en la biblioteca NIST. En estos espectros de masas se observan los principales iones para este estupefaciente: los iones 82, 182 y 303 m/z.

En relación al tamaño de muestra, en la literatura se mencionan tamaños muestrales de 1 g analizados por GC/MS (40, 47), inclusive se menciona el análisis de los aparatos digestivos de 1 g de larvas (47). En el presente trabajo, fue necesario partir de un tamaño de 5 g para lograr detectar las concentraciones utilizadas en los diferentes experimentos. Esto también se relaciona con la dilución que sufren los extractos para poder ser analizados por GC/MS utilizando inyección automática.

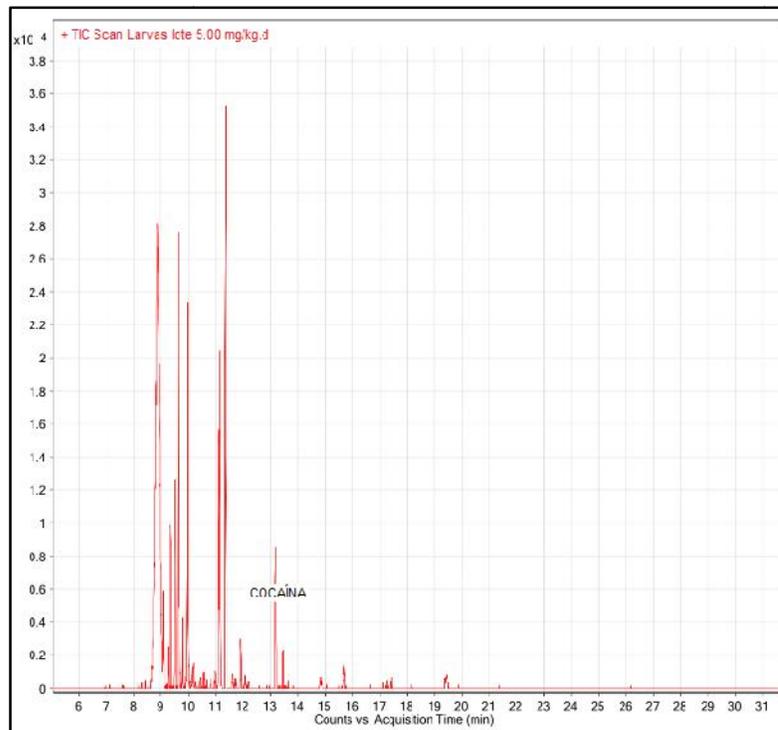


Figura 6. Cromatograma de muestra de larvas del experimento N° 3 del lote A) de 5.00 mg/kg.

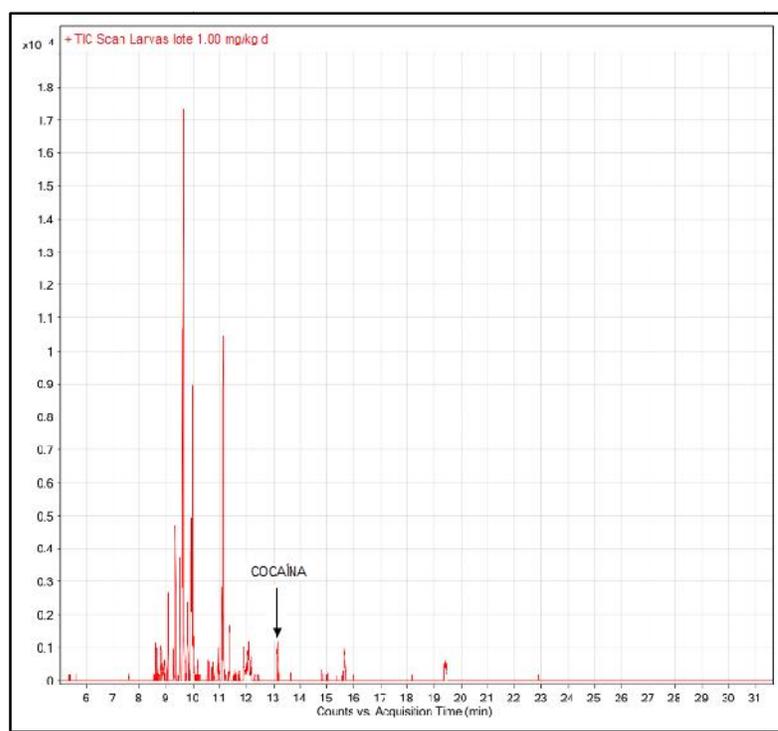


Figura 7. Cromatograma de muestra de larvas del experimento N° 5 del lote C) de 1.00 mg/kg.

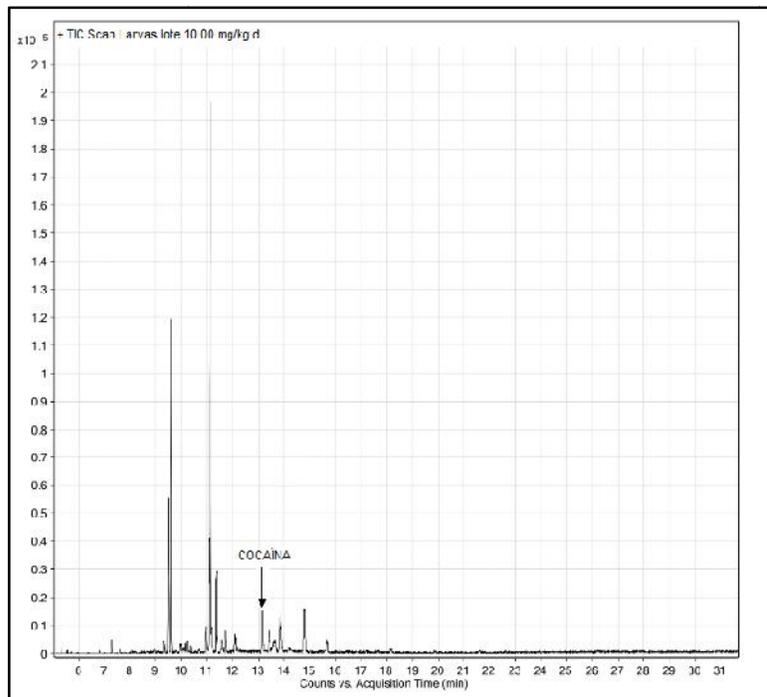


Figura 8. Cromatograma de muestra de larvas del experimento N° 5 del lote A) de 10.00 mg/kg.

Una de las limitaciones de este trabajo es no incluir a la BZE como analito de interés. La razón es que nuestro laboratorio no dispone de un estándar de este metabolito. La BZE es uno de los metabolitos principales de la cocaína y ha sido detectada en larvas de moscas por algunos autores (48, 50) utilizando derivatizantes para su análisis por GC/MS, procedimiento que no se realiza actualmente en el laboratorio, pero se está trabajando en su desarrollo así como también en la adquisición de un estándar de BZE.

No obstante, otros investigadores han utilizado otras técnicas de análisis como radioinmunoensayos (20), inmunohistoquímica (32) y cromatografía líquida acoplada a MS en tandem (LC-MS-MS) (51) en la búsqueda de BZE.

De acuerdo al modo de consumo de la cocaína y a su metabolismo, tanto la droga madre como sus metabolitos, estarán presentes en el organismo de acuerdo a su tiempo de vida media. Si bien la ventana de detección de los metabolitos como la

BZE es mayor a la de la cocaína, es válida la búsqueda y detección de la droga madre ya que la técnica de extracción SPE utilizada para cocaína es la misma empleada para la extracción de sus metabolitos, incluida la BZE.

De la misma manera, en el análisis cromatográfico se detecta a la cocaína y a muchos de sus metabolitos como la EME, cinamoilcocaína, norcocaína y cocaetileno (consumo simultáneo de cocaína y etanol), sin necesidad de utilizar derivatizantes.

4.5.1 Concentración mínima teórica detectable

Esta concentración se estableció como la menor cantidad de cocaína que el método puede distinguir sobre la señal del ruido cromatográfico, obteniéndose un valor teórico de 0.75 µg/g de larva. En la figura 9 se muestra el cromatograma correspondiente a la concentración teórica más baja detectada de cocaína en la matriz larval, con su correspondiente espectro de masa.

En este apartado se presenta otra limitación del trabajo cuando se estima una concentración mínima de cocaína y no el límite de detección (LD), el cual se define como la mínima cantidad mensurable del que se puede deducir la presencia del analito, con un grado razonable de certeza estadística. Para ello es necesario realizar otros ensayos (recuperación, precisión, estabilidad) que no pudieron llevarse a cabo por limitaciones analíticas (falta de estándar interno y disponibilidad de cocaína). En este sentido es requisito indispensable la realización de ensayos de recuperación, estudios de precisión y de estabilidad, además de establecer el límite de detección, para la validación del método cualitativo desarrollado. Con respecto a la estabilidad, algunas drogas sufren degradación post mortem resultado de procesos metabólicos, autolíticos, fermentativos y putrefactivos; por su parte la hidrólisis de la cocaína persiste al menos durante 48 horas posteriores a la muerte (51).

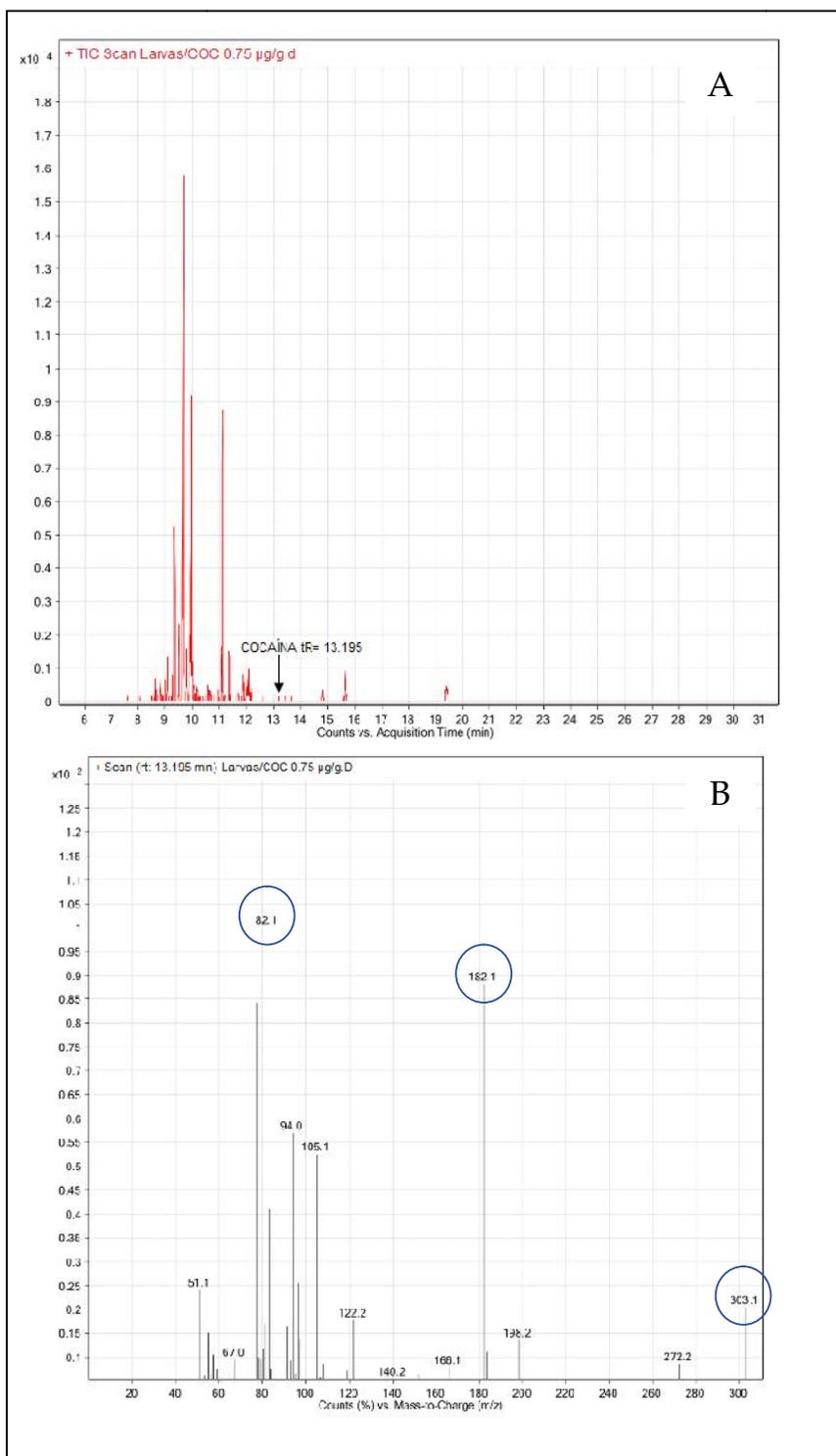


Figura 9. A (arriba): Cromatograma de muestra de larvas blanco adicionada con cocaína (0.75 $\mu\text{g/g}$ de larva). B (debajo): Espectro de masa del pico de cocaína con sus iones 82, 182 y 303 m/z .

En relación a LD, no se encontró información al respecto en la literatura con la técnica instrumental utilizada. Se encontró un sólo trabajo donde se menciona dicho parámetro utilizando HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con una interfase de electrospray (ESI-MS/MS por sus siglas en inglés) (25). En dicha tesis doctoral el LD de COC se estableció en 0,625 ng/g de larvas.

Por otro lado, es importante mencionar los valores de cocaína hallados en larvas obtenidas de experimentos con sustratos adicionados con cocaína (20) y las recolectadas en casos reales (48). Goff y col. (20) encontraron valores de cocaína superiores a 0,3 mg/kg de larvas, en tanto que Nolte y col. (48) reportan un valor de cocaína de 0,49 µg/g de larva.

Si bien no se pudo determinar el LD, se considera que la estimación de la cantidad mínima detectable obtenida, en principio, es una aproximación válida para detectar cocaína en larvas de moscas relacionadas a muertes por posibles sobredosis con este estupefaciente. La concentración teórica mínima hallada en el presente trabajo es alta comparada con los valores hallados en la literatura. La sensibilidad en la detección puede mejorarse modificando condiciones cromatográficas como el modo de operación del MS en forma SIM (monitorización selectiva de iones), utilizado generalmente para análisis cuantitativos, o realizando una inyección más concentrada del extracto (inyección manual).

4.6 Propuesta de protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas para la detección de cocaína

Se redactó el protocolo para estandarizar el uso de la matriz larval en el análisis cualitativo de cocaína para ser utilizado en casos forenses en los cuales no se disponga de las matrices tradicionales.

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 1 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

Control de copias	
Área	Firma

Control de enmiendas		
Nº	Fecha	Firma

Control de revisiones y versiones				
Rev.	Descripción	Fecha	Ver.	Firma

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 2 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

1. INTRODUCCIÓN

Cuando un cuerpo se encuentra en avanzado estado de descomposición o cuando carece de tejidos o fluidos (esqueletización), el uso de insectos que se alimentan del cadáver, puede ser el único recurso para la búsqueda de tóxicos en casos de muertes sospechosas de envenenamiento o sobredosis. Los insectos incorporan a sus tejidos sustancias presentes en el individuo, como metabolitos de barbitúricos, cocaína, anfetaminas, etanol e incluso venenos, los cuales quedan depositados en las cutículas de las larvas o en los puparios vacíos.

Es importante destacar que la presencia de venenos o drogas en el cadáver puede influir en el ciclo de vida de los insectos modificando en algunos casos el intervalo *post mortem* (IPM), con lo cual se podría colaborar para estimar un IPM más certero.

De esta manera, los peritos forenses encargados del estudio toxicológico, interdisciplinariamente con peritos biólogos y médicos, aportarían a través de sus informes técnicos o periciales, evidencia de suma importancia a la causa.

2. OBJETIVO GENERAL

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 3 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

Proporcionar un documento de consulta y cumplimiento para el personal que trabaja en áreas de Toxicología Forense de distintos laboratorios forenses de Argentina, en la utilización de larvas de moscas como matriz alternativa para la detección de cocaína en muestras obtenidas de cadáveres en estado avanzado de descomposición, en casos en los cuales se sospeche muerte por sobredosis por cocaína y en casos de no contar con matrices tradicionales para llevar a cabo la determinación toxicológica.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar los procedimientos para el tratamiento y almacenamiento de las larvas.
- Estandarizar los procedimientos a aplicarse en Laboratorio de Toxicología Forense para el análisis y detección de cocaína en larvas de moscas.

4. ALCANCE

El presente procedimiento aplica a los Laboratorios de Toxicología Forense, en lo que respecta a la obtención y preservación de las larvas y en relación con el análisis

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 4 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

toxicológico.

5. DEFINICIONES Y SIGLAS

Esqueletización: etapa final de descomposición durante la cual los últimos vestigios de los tejidos blandos de un cadáver o carcasa se han descompuesto o secado hasta el punto de que el esqueleto queda expuesto.

Evidencia: es todo indicio que, analizado pericialmente, se relaciona con el hecho que se investiga. La evidencia es, por lo tanto, la certidumbre patente, clara y perceptible. Nadie puede, racionalmente, dudar de ella ya que solo puede obtenerse después de la observación y medición de los acontecimientos.

GC/MS: Cromatografía Gaseosa/Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés, *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*).

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*).

IPM: intervalo *post mortem*, tiempo transcurrido entre el momento de la muerte y del hallazgo del cuerpo.

Muestra entomológica: muestras de insectos (larvas) recolectadas del cadáver (en la escena del hecho o durante la autopsia), así como de sus inmediaciones.

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 5 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

SPE: extracción en fase sólida (por sus siglas en inglés, *Solid Phase Extraction*).

6. RESPONSABLES

Jefe de Laboratorio y/o peritos acreditados de Laboratorios de Toxicología Forense que funcionen bajo la órbita del Poder Judicial.

7. MATERIALES

El personal encomendado al análisis debe utilizar los elementos de protección personal necesarios para llevar a cabo todas las etapas del análisis: guardapolvo, guantes de nitrilo o látex, gafas, entre otros.

- Pinzas de plástico
- Cucharas de metal
- Frascos recolectores de polipropileno
- Etiquetas
- Papel absorbente

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 6 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

- Marcador indeleble
- Pipetas automáticas
- Morteros con pilón
- Tubos HACH
- Tubos de ensayo
- Tubos de doble ensayo
- Columnas de intercambio iónico Bond-Elut de 130 mg extracción en fase sólida (SPE)
- Material de vidrio de laboratorio
- Viales de vidrio de 2 ml con tapa a rosca
- Inserto de vidrio para viales para muestreadores automáticos de 9 mm con resorte

8. EQUIPOS

- Balanza analítica
- Vortex
- Centrífuga para tubo de ensayos
- Sistema de vacío para SPE

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 7 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

- Cromatógrafo gaseoso con detector de masas (GC-MS) (Agilent Technologies modelo 7890B, acoplado a un MS marca Agilent Technologies modelo 5977A)

9. REACTIVOS

- Solventes grado HPLC: metanol, ácido acético, éter etílico, hexano, isopropanol, cloroformo, diclorometano y tolueno
- Reactivos pro análisis: hidróxido de amonio acuoso y ácido clorhídrico
- Tiras reactivas para medir pH
- Buffer fosfato pH 6
- Agua destilada
- Estándar de cocaína marca lipomed

10. MUESTREO ENTOMOLÓGICO

Aunque la mayoría de los investigadores realizan un muestreo al azar, los mejores sitios corporales de muestreo para la detección de drogas en los insectos son

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 8 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

los órganos internos (por ejemplo, hígado), la zona de la cabeza o músculos en los casos en que no hay otros órganos internos disponibles. Se debe recolectar la mayor cantidad de individuos a los fines de llevar a cabo una buena identificación taxonómica y luego realizar el análisis toxicológico.

Se debe completar un formulario de cadena de custodia indicando las personas responsables de la toma de muestra, lugar de donde se recolectan, tipo de especímenes, condiciones de almacenamiento, traslado, recepción en el laboratorio y todo otro dato que se considere necesario indicar (Anexo).

11. OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS ENTOMOLÓGICAS

Se deben recolectar los individuos utilizando pinzas de plástico limpias o con cuchara de metal y colocarlos en un frasco recolector de polipropileno con tapa hermética, rotular e identificar el sitio de la recolección.

12. TRATAMIENTO DE LAS LARVAS PARA ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 9 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

Una vez en el laboratorio, lavar bajo el grifo con abundante agua corriente y realizar un enjuague final con agua destilada. Luego secar con papel de filtro o absorbente y colocar en el freezer a -20°C por una hora, de esta manera se sacrifica las larvas por muerte por congelamiento. Almacenar en freezer hasta la realización del análisis.

Pesar 5.0 g de larvas (previamente lavadas y sacrificadas) y colocarlas en un mortero. Triturar las larvas y trasvasar a un tubo apto para centrífuga (tubo tipo HACH). En lo posible, realizar por duplicado.

12.1 *Clean up*

Agregar al tubo HACH 10 ml de metanol, homogeneizar 5 min en vortex y luego centrifugar a 3000 rpm por 20 min. Transferir el sobrenadante a otro tubo y realizar nuevamente este procedimiento. A la fase metanólica obtenida se le agregan 10 ml de ácido acético 1 N homogeneizando nuevamente en vortex. Posteriormente, esta fase acuosa acidificada se divide equitativamente en tres tubos de vidrio y se agrega a cada tubo 2.5 ml de una mezcla etér etílico:hexano 3:1, luego se agita en vortex durante 2 min. Finalmente se centrifuga a 1500 rpm durante 20 min, se

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 10 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

desecha la fase orgánica y se reserva la fase acuosa para la extracción por SPE, utilizando 3 columnas de intercambio iónico, una por cada tubo de fase acuosa.

12.2 SPE

Cada tubo de fase acuosa se hará pasar por una columna SPE, utilizando tres columnas en total, siguiendo las especificaciones del fabricante para el análisis de cocaína y metabolitos.

Acondicionar 5 ml de la fase acuosa con 2 ml de buffer fosfato pH 6, homogeneizar en vortex controlando que el pH se encuentre entre 4 y 6. Para acondicionar la columna añadir de manera secuencial 2 ml de metanol y 2 ml de buffer fosfato pH 6 evitando que la columna se seque. Luego pasar por la columna la fase acuosa obtenida sin aplicar vacío. Para la limpieza de la columna pasar 6 ml de agua destilada, 3 ml de HCl 0.1 M, de manera secuencial y luego dejar secar la columna aplicando vacío (15 mmHg) por 15 min. Una vez seca, agregar 9 ml de metanol. Como solvente de extracción utilizar 2 ml de una mezcla de diclorometano/alcohol isopropílico (80/20) y 2% de hidróxido acuoso de amonio. Dejar evaporar la fase orgánica obtenida durante toda la noche bajo campana.

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 11 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

13. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Reconstituir los extractos con 200 µl de diclorometano y colocar en un inserto de vidrio de 250 µL con resorte para vial de vidrio de 2 ml, tapa a rosca, para su inyección en el cromatógrafo (GC/MS). Colocar el vial de vidrio en el carrusel de inyección automática del GC/MS con ionización por impacto electrónico a 70 eV.

Se utiliza una columna capilar HP-5MS (5 % fenil metil siloxano) ultra inert (30m x 0.25 mm x 0.25 µm MSD). Se emplea Helio ultrapuro (Air Liquide) como gas *carrier* con un flujo de columna de 1.0 ml/min.

13.1 Condiciones cromatográficas

Ajustar el volumen de inyección a 2 µl y las siguientes condiciones de operación: la temperatura del inyector en 250°C con un Split 5:1, la temperatura inicial del horno es de 70°C con un incremento de 19°C/min hasta 250°C (se mantiene por 17 min) con un tiempo total de corrida de 26.5 min.

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

[LOGO INSTITUCIONAL]	LABORATORIO TOXICOLOGÍA FORENSE	CÓDIGO	Versión: 01 Fecha: 20/09/2020 Página 12 de 12
Protocolo para el tratamiento y análisis de larvas de moscas en la detección de cocaína			

Adquirir los datos en forma *Scan* con un intervalo de detección de masa menor de 45.0 m/z y de masa mayor de 450.0 m/z. Durante el análisis adquirir todos los espectros. Los iones selectos para la detección de la cocaína son 82, 182 y 303 m/z. Para la identificación de la cocaína se deben comparar los espectros obtenidos experimentalmente con el espectro de un testigo de cocaína (marca Lipomed por ejemplo) y por comparación de los iones por biblioteca NIST, incorporada al software del equipo.

14. INFORME DE RESULTADOS

El informe deberá contener la información necesaria respecto al material recibido y la metodología empleada, al igual que cualquier otro informe toxicológico sobre muestras biológicas (en este caso larvas de moscas).

PREPARÓ:

CONTROLÓ:

APROBÓ:

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró detectar cocaína en larvas de moscas por GC/MS a partir de larvas alimentadas con hígado vacuno.

Se ensayaron distintas condiciones de extracción purificación, estableciendo que la técnica SPE (previo *clean up*) extrae la cocaína de manera adecuada y con la obtención de un extracto compatible para su posterior análisis cromatográfico (GC/MS).

Se determinó una concentración mínima teórica de cocaína de 0,75 µg/g de larvas de moscas, cantidad mínima detectable por la metodología presentada.

Se propuso una metodología preliminar en el uso de larvas de moscas como matriz biológica alternativa en estudios toxicológicos *post mortem* y se redactó el correspondiente protocolo de trabajo para un análisis toxicológico cualitativo de larvas de moscas, en este tipo de estudios, para la detección de cocaína. El siguiente paso es la validación de la metodología propuesta realizando los ensayos requeridos en análisis cualitativos para luego comenzar con los cuantitativos.

La aplicación del presente protocolo puede significar una mejora al momento de formular conclusiones respecto a los casos y facilitar la resolución de los mismos; convirtiéndose de esta manera en una herramienta muy útil para las investigaciones forenses.

La utilización de larvas de moscas, incluso si se utilizan sólo para análisis cualitativos, podría desempeñar un papel importante en la detección de drogas de abuso y de este modo, contribuir a establecer la causa, la forma y el mecanismo de la muerte.

Es de esperar que la importancia de esta ciencia aumente cuando se apliquen sistemáticamente protocolos y se sumen más laboratorios que realicen estos análisis entomotoxicológicos.

6. ANEXO

	DIRECCIÓN GENERAL DE POLICÍA JUDICIAL	Gabinete Médico Químico Legal	<i>División Química Legal</i>
	FORMULARIO DE CADENA DE CUSTODIA		

Análisis Requerido: Alcohol Drogas Grupo sanguíneo ADN
 Semen Otros: _____

Solicitado por: _____

Recolección:

Datos de la Víctima/Victimario:			
Nombre y Apellido: _____		DNI: _____	
Tipo de muestra	Sangre <input type="checkbox"/>	Orina <input type="checkbox"/>	Hisopado <input type="checkbox"/> Prendas <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Otros: _____			
Nombre y apellido de la persona que recolecta: _____			
Fecha: ___/___/___		Hora: ___:___	
Nota importante: En caso de muestras indubitadas para análisis de ADN tomar fotos y huellas dactilares en el momento de la recolección.			

Cadena de custodia

Condiciones de conservación: <input type="checkbox"/> Refrigerado <input type="checkbox"/> Temp. Ambiente <input type="checkbox"/> Otros: _____			
Fecha: ___/___/___		Hora: ___:___	
DE			Firma
Nombre y Apellido	Cargo	Repartición oficial	
PARA			Firma
Nombre y Apellido	Cargo	Repartición oficial	

Cadena de custodia

Condiciones de conservación: <input type="checkbox"/> Refrigerado <input type="checkbox"/> Temp. Ambiente <input type="checkbox"/> Otros: _____			
Fecha: ___/___/___		Hora: ___:___	
DE			Firma
Nombre y Apellido	Cargo	Repartición oficial	
PARA			Firma
Nombre y Apellido	Cargo	Repartición oficial	

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) EARLY, Marianne; GOFF, M. Lee. Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of O'ahu, Hawaiian Islands, USA. *Journal of Medical Entomology*, 1986, vol. 23, no 5, p. 520-531.
- (2) PAYNE, Jerry A. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa Linnaeus*. *Ecology*, 1965, vol. 46, no 5, p. 592-602.
- (3) TANTAWI, Tarek I., et al. Arthropod succession on exposed rabbit carrion in Alexandria, Egypt. *Journal of Medical Entomology*, 1996, vol. 33, no 4, p. 566-580.
- (4) RIVERS, David B.; DAHLEM, Gregory A. *The science of forensic entomology*. John Wiley & Sons, 2014.
- (5) SMITH, Kenneth E. G. V. *A Manual of Forensic Entomology*. London: British Museum (NH). 1986.
- (6) CATTS, Elmer P.; GOFF, Madison L.. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 1992, vol. 37, no 1, p. 253-272.
- (7) ANDERSON, Gail S.; VANLAERHOVEN, Sherah L. Initial studies on insect succession on carrion in southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Science*, 1996, vol. 41, no 4, p. 617-625.
- (8) AMENDT, Jens, et al. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 2011, vol. 7, no 4, p. 379-392.
- (9) GOSELIN, Matthias, et al. Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Science International*, 2011, vol. 208, no 1-3, p. 1-9.
- (10) REZENDE, Fábio, et al. Developmental rates of immatures of three *Chrysomya* species (Diptera: Calliphoridae) under the effect of methylphenidate

- hydrochloride, phenobarbital, and methylphenidate hydrochloride associated with phenobarbital. *Parasitology Research*, 2014, vol. 113, no 5, p. 1897-1907.
- (11) VERMA, Kapil; PAUL, Rejct. Assessment of post mortem interval, (PMI) from forensic entomotoxicological studies of larvae and flies. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 2013, vol. 2, no 104, p. 2161-0983.1000104.
- (12) MULLANY, Christina, et al. Effects of methamphetamine and its primary human metabolite, p-hydroxymethamphetamine, on the development of the Australian blowfly *Calliphora stygia*. *Forensic Science International*, 2014, vol. 241, p. 102-111.
- (13) FERRAZ, Adriana C., et al. Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of an Old World screwworm fly, *Chrysomya putoria*. *Journal of Insect Science*, 2014, vol. 14, no 1.
- (14) LOPES DE CARVALHO, Lucila M.; LINHARES, Arício X.; PALHARES, Fortunato A. The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic Science International*, 2012, vol. 220, no 1-3, p. 27-32.
- (15) GOFF, Madison. L.; LORD, Wayne D. Insect as toxicological indicator and the impact of drugs and toxin on insect development. *Forensic Entomology: The Utility of Using Arthropods in Legal Investigations*, 2010, p. 427-434.
- (16) VASUDEVA MURTHY, C. R.; MOHANTY, Manisa. Entomotoxicology: A review. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 2010, vol. 32, no 1, p. 82-84.
- (17) BAIA, Tainá Costa, et al. The Effect of Flunitrazepam (Rohypnol®) on the Development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) and its Implications for Forensic Entomology. *Journal of forensic sciences*, 2016, vol. 61, no 4, p. 1112-1115.
- (18) ELGENDY, Ibrahim S., HASSAN, Nermeen A., ELGENDY, F. S. (2017). Determination of Cause of Death from Toxic Substances Levels in Insect

Specimens in Severely Decomposed Bodies [Internet] [Consultado 21 de May 2018] Disponible en:

<http://repository.nauss.edu.sa/bitstream/handle/123456789/65375/06.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- (19) GEORGE, Kelly A., et al. Effect of morphine on the growth rate of *Calliphora stygia* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, 2009, vol. 193, no 1-3, p. 21-25.
- (20) GOFF, Madison L.; OMORI, Alvin I.; GOODBROD, James R. Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology*, 1989, vol. 26, no 2, p. 91-93.
- (21) SOUZA, Carina M.; THYSSEN, Patrícia J.; LINHARES, Arício X. Effect of nandrolone decanoate on the development of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), flies of forensic importance in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 2014, vol. 48, no 1, p. 111-117.
- (22) ALTUNSOY, Ferhat; AKAY, Furkan, H.; ÖNSOY, Cenk. Preliminary observations of the effects of lorazepam on the development of *Calliphora vicina* and *Calliphora loewi* (Diptera: Calliphoridae) and PMI estimation. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji*, 2014, vol. 3, no 2, p. 45-52.
- (23) BUGELLI, Valentina; PAPI, Luigi; STEFANELLI, Fabio; CHERICONI, Silvio; GIUSIANI, M.; VANIN, Stefano; CAMPOBASSO Carlo, P. Entomotoxicology in burnt bodies: a case of maternal filicide-suicide by fire. *International Journal of Legal Medicine*, 2017, vol. 131, no 5, p. 1299-1306.
- (24) KHAN, Almie A. M., et al. Analysis of Paracetamol In Forensic Blowfly Samples From Intoxicated-Paracetamol Carcass. *Malaysian Applied Biology Journal*, 2015, vol. 44, no 1, p. 31-35.
- (25) SOLÍS ESQUIVEL, Elton. Estudio entomotoxicológico de paratión, carbofurano y cocaína en larvas de mosca carroñera de interés médico forense en el estado de Nuevo León. 2014. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- [Internet] [Consultado 21 de May 2018] Disponible en:
<http://eprints.uanl.mx/4078/1/1080253563.pdf>
- (26) OFICINA DE LAS NACIONES UNIDAS CONTRA LA DROGA Y EL DELITO. (2017). Informe Mundial sobre las Drogas. [Internet] [Consultado 20 de Mar 2018] Disponible en:
https://www.unodc.org/wdr2017/field/WDR_Booklet1_Exsum_Spanish.pdf
- (27) O'BRIEN, Charles P. Adicción y abuso de drogas. En: Brunton, L. I., Lazo, J. S., Parker, K. L., editores. (2007). Goodman & Gilman Las Bases farmacológicas de la Terapéutica. 11^o ed, México: Mc Graw-Hill Interamericana S.A.; 23, 607-627.
- (28) OBSERVATORIO ARGENTINO DE DROGAS. (2014). Principales indicadores relativos al consumo de sustancias psicoactivas. [internet]. Argentina: Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico, Presidencia de la Nación Argentina. [Consultado 15 Mar 2018]. Disponible en:
<http://www.observatorio.gov.ar/index.php/epidemiologia/item/16-estudios-de-poblacion-general>
- (29) OBSERVATORIO ARGENTINO DE DROGAS. (2017). ESTUDIO NACIONAL EN POBLACIÓN DE 12 A 65 AÑOS SOBRE CONSUMO DE SUSTANCIAS PSICOACTIVAS [internet]. Argentina: Secretaría de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina, Presidencia de la Nación Argentina. [Consultado 15 Mar 2018]. Disponible en:
<http://www.observatorio.gov.ar/index.php/epidemiologia/item/16-estudios-de-poblacion-general>
- (30) ZANETTI, Noelia I.; FERRERO, Adriana A.; CENTENO, Néstor D. Determination of fluoxetine in *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) by a spectrophotometric method. Science & Justice, 2016, vol. 56, no 6, p. 464-467.
- (31) OLIVEIRA, Joyce S., et al. Development of a novel non-destructive method based on spectral fingerprint for determination of abused drug in insects: An

- alternative entomotoxicology approach. *Microchemical Journal*, 2014, vol. 115, p. 39-46.
- (32) SOUZA, Carina M., et al. Standardization of histological procedures for the detection of toxic substances by immunohistochemistry in dipteran larvae of forensic importance. *Journal of Forensic Sciences*, 2013, vol. 58, no 4, p. 1015-1021.
- 33) JARSÚN, Bahill.; GORGAS, Juan A.; ZAMORA, Eduardo; BOSNERO, Hémer; LOVERA, Edgar; RAVELO, Andrés & TASSILE, José L. (2003). Recursos Naturales De La Provincia De Córdoba: Los Suelos. Córdoba: Agencia Córdoba, D.A.C. y T.S.E.M Dirección de Ambiente, INTA, Manfredi.
- (34) METEORED. [Consultado 15 Mar 2018]. Disponible en: <https://www.meteored.com.ar>
- (35) SHIMOMURA, Eric T.; HODGE, Gwendolyn D.; PAUL, Buddha D. Examination of postmortem fluids and tissues for the presence of methylecgonidine, ecgonidine, cocaine, and benzoylecgonine using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2001, vol. 47, no 6, p. 1040-1047.
- (36) ALVEAR, Eduardo; VON BAER, Dietrich.; MARDONES, Claudia; HITSCHFELD, Antonieta. Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 2014, vol. 23, p. 37-43.
- (37) JONES, Graham R.; SINGER, Peter P. Drugs-of-Abuse in Liver. En *Drug Testing in Alternate Biological Specimens*. Humana Press, 2008. p. 139-156.
- (38) MAGALHÃES, Elisângela J., et al. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 2013, vol. 1309, p. 15-21.

- (39) KHARBOUCHE, Hicham, et al. Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development. *International Journal of Legal Medicine*, 2008, vol. 122, no 3, p. 205-211.
- (40) CAMPOBASSO, Carlo P., et al. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. *International Journal of Legal Medicine*, 2004, vol. 118, no 4, p. 210-214.
- (41) ROETERDINK, Evan M.; DADOUR, Ian R.; WATLING, R. John. Extraction of gunshot residues from the larvae of the forensically important blowfly *Calliphora dubia* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae). *International Journal of Legal Medicine*, 2004, vol. 118, no 2, p. 63-70.
- (42) WOOD, Michelle., et al. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of benzodiazepines in *Calliphora vicina* larvae and puparia by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 2003, vol. 27, no 7, p. 505-512.
- (43) FLOREZ, Eliana; WOLFF, Marta. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. *Neotropical Entomology*, 2009, vol. 38, no 3, p. 418-429.
- (44) WHITWORTH, Terry. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of America north of Mexico. 2006.
- (45) CHOPHI, Rito, et al. Forensic entomotoxicology: Current concepts, trends and challenges. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 2019, vol. 67, p. 28-36.
- (46) LORD, Wayne D.; BURGER, John F. Collection and preservation of forensically important entomological materials. *Journal of Forensic Science*, 1983, vol. 28, no 4, p. 936-944.
- (47) CERDA GOMEZ, A. G. (2010). Determinación de metabolitos de clorhidrato de cocaína en muestras de entomofauna obtenidas en ratas previamente tratadas (Maestría en Ciencias Quimicobiológicas). Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México. Recuperado de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/9489>.

- (48) NOLTE, Kurt B.; PINDER, Richard D.; LORD, W. D. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. *Journal of Forensic Science*, 1992, vol. 37, no 4, p. 1179-1185.
- (49) MANHOFF, Dion T., et al. Cocaine in decomposed human remains. *Journal of Forensic Science*, 1991, vol. 36, no 6, p. 1732-1735.
- (50) DE AGUIAR FRANÇA, Jéssica, et al. Simultaneous determination of prescription drugs, cocaine, aldicarb and metabolites in larvae from decomposed corpses by LC-MS-MS after solid-liquid extraction with low temperature partitioning. *Forensic Toxicology*, 2015, vol. 33, no 1, p. 93-103.
- (51) DRUMMER, Olaf H. Post-mortem toxicology. *Forensic science international*, 2007, vol. 165, no 2-3, p. 199-203.

