



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**QUIMIOTAXONOMÍA COMO HERRAMIENTA PARA LA
ENTOMOLOGÍA FORENSE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Alexis Piedras Frias



CDMX

AÑO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Díaz Arista Patricia**

VOCAL: **Profesor: Tapia Mendoza Everardo**

SECRETARIO: **Profesor: Quijano Mateos Alejandra.**

SUPLENTE: **Profesor: Zúñiga Villareal Noe**

2° SUPLENTE: **Profesor: González Tepale Ma. Rosa**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EDIFICIO DE LA LICENCIATURA CIENCIA FORENSE, FACULTAD DE MEDICINA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA:

Mtra. Alejandra Quijano Mateos

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María Elena Bravo Gómez

SUSTENTANTE:

Alexis Piedras Frias

Índice

Índice.....	2
1-Introducción.....	5
1.1-Familia Calliphoridae	7
1.2-Familia Sarcophagidae	7
2-Planteamiento del Problema.	8
2.1-Entomología forense y sus retos para establecer el IPM.	9
3-Identificación y datación de insectos	13
4-Objetivos	15
5- Metodología.....	15
5.1-Procedimiento de búsqueda	15
6-Información general del tema	16
6.1-Quimiotaxonomía.....	16
6.2- Fundamentos morfoanatómicos comunes de los insectos.....	16
7-Técnicas empleadas para hacer los análisis Quimiotaxonómicos	19
7.1-Cromatografía de gases	19
7.2-Espectrometría de masas e instrumentación	21
7.3-Espectrometría de Fluorescencia	23
8-Métodos quimiotaxonómicos para datar las especies.	25
8.1-Análisis de los hidrocarburos cuticulares.....	26
8.1.1 Metodología general de análisis de hidrocarburos cuticulares.	26
8.2-Compuestos Orgánicos volátiles	36
8.2.1-Micro extracción en Fase Solida (SPME).	36

8.2.2- <i>Metodología para los compuestos orgánicos volátiles.</i>	39
8.3- <i>Análisis de fluorescencia de pteridina.</i>	44
8.3.1- <i>Metodología del estudio por fluorescencia de pteridina.</i>	45
9-Discusión.....	50
10- Conclusiones.....	54
11-Referencias.....	55

1-Introducción.

La entomología es una rama de la zoología cuyo objeto de estudio son los artrópodos. Los artrópodos son animales invertebrados dotados de un esqueleto externo con apéndices articulados, algunos ejemplos de artrópodos son: insectos, arácnidos y crustáceos. La entomología se ocupa del estudio de estos animales y de sus interacciones con el ambiente que ocupan(1)(2).

Una de las áreas de gran interés en el campo de la ciencia forense es la entomología ya que aporta información de utilidad a la investigación criminalística porque algunos insectos se ven vinculados a la escena del crimen.

La entomología forense es la disciplina que estudia a los insectos y otros artrópodos que acuden a los cadáveres y que aportan información útil en investigaciones policiales y judiciales, siendo su contribución más importante la estimación del intervalo postmortem (IPM), el cual se basa en la tasa de desarrollo de determinada especie de insecto (sobre todo dípteros) y en los patrones de sucesión ecológica de insectos sarcosaprófagos en un cuerpo en descomposición.
(3)

La entomología forense interpreta la información que suministran los insectos como testigos indirectos de un deceso como:

- Identificar las especies de entomofauna cadavérica.
- Describir la sucesión cadavérica.
- Estimar la edad de las especies al momento del descubrimiento del cuerpo.
- Aportar información para calcular el intervalo post mortem.
- Proporcionar información sobre el posible movimiento de un cuerpo del lugar de los hechos al lugar del hallazgo.

El estudio de los insectos en el ámbito forense se inicia cuando los insectos se ven vinculados a la escena de un crimen(1), principalmente cuando el cuerpo es encontrado en un espacio abierto, o cuando este se encuentra en un lugar cerrado de difícil acceso, o bien cuando el cuerpo es encontrado en un avanzado estado de descomposición (2).

La descomposición de un cuerpo se caracteriza por la destrucción de tejidos mediante procesos de autólisis y descomposición microbiana. Después de estos procesos, suceden periodos con duración variable de degradación de materia orgánica. En el periodo de descomposición inicial, el cadáver luce fresco. Durante el periodo enfisematoso o de putrefacción, el cadáver se hincha por gases producidos durante la fermentación de sustancias orgánicas de los tejidos corporales. Durante el periodo de descomposición activa, la carne toma una consistencia cremosa. Con el periodo de putrefacción avanzada el cadáver se seca extremadamente y finalmente en el periodo de reducción esquelética, lo que resta del cadáver queda seco (3).

Los primeros insectos en llegar al cadáver son atraídos por el olor de los gases desprendidos en el proceso de degradación de azúcares y lípidos. Los gases principales desprendidos son el amoníaco (NH_3), el ácido sulfhídrico (H_2S), nitrógeno (N_2) y anhídrido carbónico (CO_2) (4).

Los insectos que normalmente se encuentran en la carroña en descomposición se clasifican en:

- ✓ Especies necrófagas que se alimentan de los tejidos.
- ✓ Depredadores y parásitos que se alimentan de las especies necrófagas, este grupo también contiene especies esquizofágicas que se alimentan primero del cuerpo y se vuelven predadoras en las etapas posteriores.
- ✓ Especies omnívoras que se alimentan de la carroña como hormigas, avispas, algunos escarabajos y otros artrópodos.
- ✓ Otras especies como colémbolos y arañas que usan el cadáver como una extensión de su entorno.

Las especies con mayor relevancia son las especies necrófagas, (ya que se utilizan para estimar el IPM); pero estas especies obran de un modo sucesivo, regulado y predecible ya que las especies depredadoras y las parásitas de especies necrófagas, se alimentan de las especies necrófagas asimismo encontramos a las especies omnívoras que son aquellas que se nutren tanto del cadáver como de los

colonizadores (hormigas, avispas y algunos escarabajos); y por último existen las especies oportunistas que aprovechan el espacio para alojarse, así esta sucesión de insectos ayuda a deducir la temporalidad de la muerte. (13,3)

El orden más importante es sin duda el de los dípteros, que significa “dos alas”. De este orden, las familias de importancia son:

1.1-Familia Calliphoridae

Son moscas ovíparas, con característico abdomen de color metálico brillante (figura 1); alas con celda discal siempre cerrada y angosta hacia el ápice. Las larvas de esta familia poseen en el extremo posterior cóncavo, rodeado de papilas cónicas y placas espiraculares visibles con hendiduras oblicuas (5,6).



Figura 1.- Mosca de la familia *Calliphoridae* tomada de (Jones, 2019) (5)

1.2-Familia Sarcophagidae

Son adultos con cinco bandas negras en el tórax algo plateado o con reflejos metálicos azulados débiles. Generalmente se trata de moscas grandes (más de 10 mm de longitud) (Figura 2). Presentan un abdomen con manchas tornasoladas, plateada a negras es lo que le dan un aspecto cuadrículado. Las larvas muestran un extremo posterior en forma de embudo profundo, papilas cónicas importantes y placas espiraculares sin botón y hendiduras casi verticales (6–8).



Figura 2.- Mosca *Sarcophagidae* foto tomada de (ADW, 2020) (9).

Los primeros dos grupos son los más importantes para la entomología forense, así como las especies que pertenecen al orden *Diptera* (moscas) y *Coleoptera* (escarabajos) ya que son de las primeras especies en llegar al cadáver porque detectan el olor emanado por un cadáver (10).

Las aportaciones de la entomología a las ciencias forenses pueden ser mayores considerando la incipiente ciencia de “Entomotoxicología” (11)(1). Esta nueva rama emplea los insectos como una matriz alternativa para identificar sustancias como drogas de abuso u otros venenos que pudiesen estar relacionados con la causa de muerte, que difícilmente se identificarían en un cadáver en avanzada descomposición.

El campo de la entomología forense es muy amplio, pero poco explorado; a nivel nacional hay pocos especialistas en esta rama debido a las deficiencias en el entrenamiento y a la poca difusión de información; pero es sin duda un área que tiene un gran futuro por lo que se requiere de más estudios y de más profesionistas interesados y bien capacitados para llevar a cabo las investigaciones criminalísticas (12).

2-Planteamiento del Problema.

Existen muchas preguntas cuando se llega a una escena del crimen, pero la más importante para el entomólogo forense es: ¿Cuánto tiempo lleva el cadáver en la escena? En otras palabras, ¿Cuál es el intervalo post mortem?

Aunque los métodos clásicos para estimar el intervalo post mortem se basan en la temperatura corporal, las etapas de descomposición del cuerpo o los signos cadavéricos; estos no son aplicables cuando es reciente el descubrimiento del cuerpo; es decir, que el cuerpo lleva menos de 24 horas en ese estado, dado que

la temperatura del cadáver se equilibra con la del ambiente (2).

En algunas ocasiones, cuando se localiza el cadáver que lleva meses en estado avanzado de descomposición estos métodos clásicos no darán un resultado confiable debido a que muchos factores están involucrados, por ejemplo el clima, el lugar donde se encuentra como un bosque, la fauna presente, ya que esta puede alimentarse directamente del cadáver. Por lo tanto, para establecer el tiempo de muerte en esos casos, la entomología da las herramientas posibles; pues serán los insectos los que brinden la información necesaria para hacer dicha estimación.

Mediante la entomología se obtienen las herramientas necesarias para hacer posible una datación de la muerte, estudiando a las especies halladas en el lugar y con los análisis taxonómicos correspondientes se puede hacer la estimación del intervalo post mortem con mayor precisión. Esta estimación se puede realizar mediante los patrones de sucesión cadavérica o con la datación de las especies (dípteros).

2.1-Entomología forense y sus retos para establecer el IPM.

Los insectos son con frecuencia los primeros en llegar a la escena del crimen y arriban con una predecible frecuencia (14). La muerte conlleva una crisis completa de todos los sistemas de mantenimiento vital, desencadenando una serie de procesos; el principal es la descomposición, que pasa por diversas etapas, y atraen a los dípteros que son los primeros en colonizar el cadáver. El denominado intervalo post mortem (IPM), es equivalente al lapso de tiempo que transcurre entre la muerte del individuo y el momento en que es hallado su cadáver.

La tarea más relevante y más usada de la entomología forense es la estimación del intervalo post mortem (10,15,16), tradicionalmente se realiza por medio de: La sucesión cadavérica y la estimación de la edad de las pupas y/o larvas a partir

de la observación junto con la descripción morfológica:

- **Sucesión cadavérica de insectos:** en este método se tienen tablas del estado de descomposición del cuerpo y las especies de moscas habitualmente encontradas en este estado (3,17).

- **Conocer la especie y su ciclo de vida:** se hace un muestreo de los insectos presentes en el cuerpo, se dejan crecer hasta llegar a su forma adulta y se identifican por su morfología. Después de la identificación se tiene que recordar la forma en que fue colectada la mosca ya sea huevo, larva o pupa y con el tiempo que dura cada estadio se tiene una estimación del tiempo que lleva ahí el cadáver (método clásico) (5).

A partir de la sucesión cadavérica se puede estimar cuánto tiempo lleva un cadáver en el lugar del hallazgo. Para hacer la estimación del Intervalo Post Mortem (IPM) se tienen dos métodos; el primero utiliza la sucesión de insectos en el cuerpo y se compara con otros patrones conocidos para ese mismo hábitat o condiciones similares, para el segundo método se ocupan los análisis de datación de las especies que fueron recolectadas (10,15).

Para conocer la especie y el ciclo de vida en que fue recolectada, se emplea el método clásico que se describió anteriormente o bien con métodos quimiotaxonómicos cuyo fundamento es describir la composición química exclusiva para cada especie (para la identificación) medir la abundancia de ciertos compuestos (para la datación) y relacionarlo con la etapa del ciclo de vida de la especie.

Para hacer una estimación del IPM se necesitan incluir numerosos factores que intervienen en el ciclo de vida de la especie como la temperatura del cuerpo y del ambiente, así como, los nutrientes disponibles para los insectos o bien, la presencia de algunos xenobióticos. Estos factores afectan principalmente el ciclo de vida de las moscas; a temperatura altas (30 °C) las pupas pueden eclosionar antes de lo esperado según su ciclo de vida. Lo contrario pasa a temperaturas bajas (menores de 10 °C) puesto que la ovoposición disminuye (4)(13). Los nutrientes impactan el tamaño que tendrán las larvas y pupas, si los tejidos del cadáver presentaban xenobióticos como alguna sustancia de abuso, estos pueden afectar el crecimiento y tamaño de las moscas, un ejemplo es la aceleración en su ciclo de vida (estadio larvario) por presencia de cocaína (11).

En la figura 3 se ilustra el tipo de insectos que llegan al cadáver y el orden cronológico en que las diferentes especies de la entomofauna van colonizando el cuerpo.

Los datos obtenidos de los análisis de datación se pueden usar para estimar el IPM; ya que se conocen los ciclos de vida de las diferentes clases de insectos involucradas en la descomposición de un cadáver y también se pueden determinar las diferentes etapas de deterioro de este. Además, al identificarse una especie no endémica en la escena del crimen, se pueden hacer inferencias sobre el traslado de cuerpos, descubriéndose así la existencia de otras “escenas del crimen”

Las limitaciones para el cálculo del IPM se deben a factores externos en los análisis que implican a los insectos. En primera instancia la recolección de los especímenes para su posterior uso; difícilmente los entomólogos son los primeros en llegar a una escena de crimen y recoger evidencia; por lo que algunos peritos criminalistas hacen este trabajo por ellos y pueden no hacer una buena recopilación de la información sobre los lugares anatómicos de donde son recolectados los insectos, ni la temperatura a la que se encuentra, tanto el cadáver como el ambiente. Las condiciones climáticas son muy importantes para el crecimiento de ciertas especies, pues influyen en la presencia o ausencia de ciertas moscas sobre el cadáver (14). No se encontrarán las mismas especies en una zona montañosa donde las temperaturas son bajas y es un lugar abierto, que en una ciudad donde la temperatura es más alta y hay lugares cerrados con poca accesibilidad para los insectos, dando a entender que los climas afectan el crecimiento de las moscas pues a menores temperaturas se desarrollan en menor proporción y todas las especies tiene un clima predilecto para desarrollarse (4,18). Debido a esto encontraremos distintas especies en ambos lados.

Otro problema en la obtención de muestras para los análisis es el tiempo que llevan los insectos sobre o dentro del cuerpo. Los expertos en el tema buscan obtener los insectos más viejos pues son los que pueden dar una fecha precisa del deceso (1); si las muestras no las toman los entomólogos o personas tengan este conocimiento, se dificultan las identificaciones de los animales presentes y, en consecuencia, la estimación del intervalo post mortem (19)

3-Identificación y datación de insectos

La función primordial del entomólogo forense es lograr la identificación precisa de los insectos u otros artrópodos asociados a la escena de un crimen. Llevar a cabo la identificación no es una tarea sencilla ya que las muestras recolectadas son larvas y pupas de diferentes especies de moscas u otros insectos cuyo crecimiento depende de la temperatura y el lugar geográfico donde se están desarrollando(2).

Una primera identificación se realiza generalmente por medio de un análisis morfológico mediante claves taxonómicas que son distinciones en el cuerpo de las moscas, lo que ayuda a diferenciar entre las familias y subfamilias. Las claves para identificar 23 familias de *Díptera*, especies que se alimentan u ovipositan con carroña o con larvas criadas con carroña, son las propuestas por De Carvalho y De Mello-Patiu (20). Al realizar la identificación mediante estas claves solo se tiene que relacionar el tiempo en que tardaron en llegar a su forma adulta y el estadio en que fue recolectada esa especie, con el ciclo de vida respectivo de cada mosca identificada para obtener su edad.

Las claves taxonómicas se van adquiriendo mediante la observación de los especímenes al microscopio y la confirmación de un experto entomólogo. Diversos artículos dan las claves taxonómicas para hacer una distinción entre familias de moscas (5)(21). Estas claves se enfocan principalmente en la cabeza, tórax y alas.

Algunas desventajas de identificar por medio de las claves taxonómicas son:

- ✓ Las especies que se identifican deben estar en su forma adulta.
- ✓ La observación en el microscopio puede ser compleja.
- ✓ Se debe conocer la anatomía de la mosca.
- ✓ Muchas moscas son similares y se tendría que buscar claves específicas.
- ✓ Se pueden identificar familias con relativa facilidad, pero es complicado distinguir entre subfamilias.

Junto con el análisis morfológico para clasificar las especies, es posible realizar una secuenciación de ADN para determinar los marcadores genéticos que tiene la especie en cuestión y se compara con una biblioteca, a fin de identificar la especie correctamente. La identificación por las claves taxonómicas y el análisis de ADN se complementan, y con ello se tiene una mayor probabilidad de acertar en la identificación de la especie correctamente. Sin embargo, al realizar la identificación genéticamente, también se tienen un par de inconvenientes:

- 1) Es costoso realizarlo.
- 2) Se necesita tener una base de datos robusta.

Existen proyectos para generar estas bases de datos y mantenerlas actualizadas como la International Barcode of Life (iBOL) o Barcode of Life Database (BOLD) (22) pero aún quedan especies por secuenciar y generar los códigos genéticos para su identificación por esta técnica (23).

La identificación de la especie entomológica es crucial para poder estimar cuánto tiempo lleva el cuerpo en ese estado y en esa ubicación (24). Por esta razón se necesitan hacer la datación de los especímenes recolectados en el estadio que fueron encontrados. Es importante recordar que las muestras en su mayoría son larvas y/o pupas, las cuales no se pueden identificar y diferenciar por medio de análisis morfológico en ese estado (25) por lo que el método clásico empleado no se puede usar más que en especies adultas; lo que conlleva la necesidad de utilizar análisis más específicos como los análisis quimiotaxonómicos.

Es por esto que se proponen en la literatura y en este trabajo los análisis quimiotaxonómicos de moscas para ahorrar tiempo y esfuerzo en la caracterización morfológica y la datación de las especies presentes en el cadáver. Al realizar estos análisis quimiotaxonómicos, se tiene mayor certeza de hacer la estimación del IPM, brindando con una mayor certeza sobre la fecha en que pudo ocurrir el deceso.

El presente trabajo se enfocará en algunos análisis quimio-taxonómicos para las identificaciones de diversas especies de moscas que pueden ayudar al entomólogo forense sin necesidad de emplear largos periodos de tiempo; como los necesarios para realizar un análisis morfológico y que permite distinguir especies de una manera relativamente más económica que los análisis de ADN.

4-Objetivos

- ✓ Realizar una revisión bibliográfica sobre los usos de la quimiotaxonomía en la entomología forense para la identificación y datación de insectos de interés forense.
- ✓ Describir las técnicas empleadas en la identificación y datación de especies entomológicas de interés forense.
- ✓ Discutir los alcances y limitaciones de las técnicas revisadas.
- ✓ Dar a conocer estas técnicas para que sean empleadas en las investigaciones forenses correspondientes.

5- Metodología

5.1- Procedimiento de búsqueda

Se efectuó una revisión de información actualizada acerca del tema a investigar, en bases de datos como Pubmed (NCBI/Medline), Google Academic, Science Direct (Elsevier), Scopus, etc. Cada artículo o fuente se descargó mediante el programa Mendeley. Posteriormente, con el mismo programa se revisaron, seleccionaron y clasificaron los artículos y documentos mediante los criterios de búsqueda propuestos: intervalos post mortem, análisis de insectos para establecer el IPM, hidrocarburos cuticulares, entomología forense, fauna cadavérica, y tiempo de muerte dado por insectos. Por último, se seleccionó y ordenó la información relevante que cumpliera con los criterios de selección planteados. En total se revisaron 104 artículos.

6- Información general del tema

6.1- Quimiotaxonomía

La quimiotaxonomía es el estudio de la clasificación e identificación de organismos de acuerdo con sus diferencias y similitudes demostrables en su composición química (26). Esta clasificación se basa en los compuestos químicos presentes en las especies; en este caso se trata de las larvas y pupas de moscas que se hallan en cadáveres. A diferencia de una clasificación morfológica, que puede llegar a tener errores debido a la similitud entre las especies, al caracterizar una especie por medio de los compuestos en ellas, se hace más selectivo el análisis, disminuyendo así la probabilidad de cometer errores al realizar la identificación.

Para obtener una buena clasificación se debe trabajar con especies puras, manteniendo su linaje, para poder hacer una comparación entre las especies encontradas en el lugar de los hechos y poder distinguir correctamente especies diferente.

6.2- Fundamentos morfoanatómicos comunes de los insectos

La cutícula de los insectos forma parte de un tegumento externo, es una capa no celular que cubre el cuerpo de los insectos e interviene en diversos procesos fisiológicos y mecánicos (27). La cutícula es un exoesqueleto que proporciona soporte al cuerpo del insecto y un esquema de ella se ilustra mejor en la figura 6 (28).

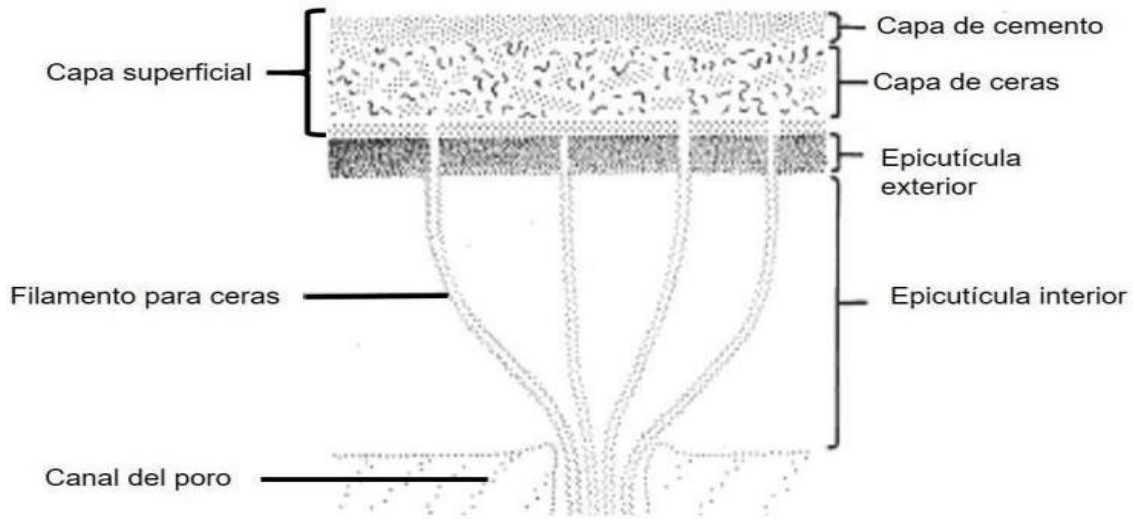


Figura 4.- Capas de la epicutícula tomado de Peralta, 2018 (29)

La epicutícula que se muestra en la figura anterior tiene un grosor entre 0.1 y 4 μm , constituida generalmente por tres capas: la interior, la exterior y la capa superficial. La epicutícula exterior y la capa interior son barreras permeables selectivas y poco elásticas que limita el crecimiento. La capa superficial, sirve para protección y está construida por dos secciones; la primera está formada de capas lipídicas o ceras que evita la pérdida de humedad y funciona como barrera contra microorganismos y rayos ultravioleta; la segunda capa sirve como soporte (30).

Las capas superficial externas de la cutícula proveen al insecto regulación de la entrada de agua al cuerpo. En la capa superficial en la cutícula están depositados lípidos hidrofóbicos, así como ésteres de cera, cetonas, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos e hidrocarburos de cadena lineal, que en conjunto son llamados hidrocarburos cuticulares.

La estructura de los hidrocarburos en insectos es compleja, debido a que estos compuestos tienen diferentes ramificaciones y dobles enlaces en diferentes posiciones.(31).

Los hidrocarburos cuticulares pueden dividirse en tres grupos:

- ✓ N- alcanos.
- ✓ Alcanos metil ramificados.
- ✓ Hidrocarburos insaturados.

Los n-alcanos corresponden al más del 60% de los compuestos de hidrocarburos cuticulares presentes en los insectos e intervienen en la regulación del agua. El resto, hidrocarburos insaturados y los alcanos metil-ramificados están relacionados en la comunicación entre insectos (31).

La cutícula forma el exoesqueleto que se ilustra en la figura 5 y la componen tres capas: La epicutícula, la exocutícula y la endocutícula.

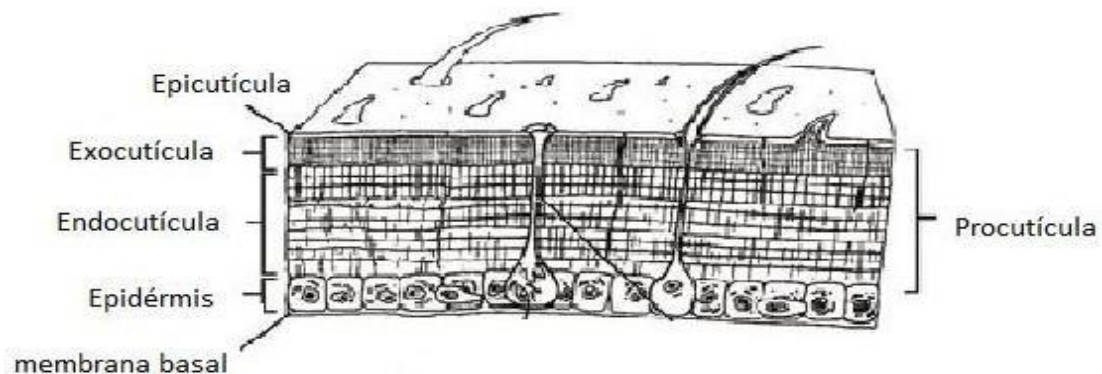


Figura 5.- Capas del exoesqueleto tomada de Peralta, 2018 (29).

El cuerpo de los insectos está formado por veinte segmentos primitivos. La cabeza presenta la cápsula cefálica y los apéndices. El exterior de la cabeza está formado por varios escleritos soldados, constituyendo así una cápsula dura, en el dorso se encuentra la sutura epicraneal. El tórax, se divide en tres segmentos: protórax, mesotórax y metatórax. Las patas están unidas al tórax y se dividen, normalmente, en cinco segmentos: coxa, trocánter, fémur, tibia y tarso (32). Algunas de estas partes se ilustran en la figura 6.

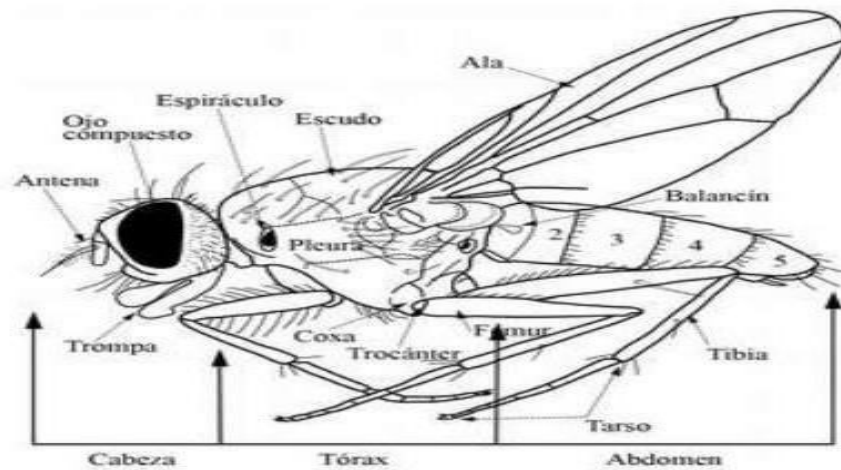


Figura 6.- Estructura general de una mosca tomado de Calle, 2009 (6).

Las especies principales de interés forense y cuyos estudios son relevantes para este escrito son: *Lucilla sericata*, *Lucila cuprina*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria*, *C. rufifacies*, *Calliphora vicina*, *Sarcophagahaemorrhoidales* y *Megaselia scalairs*.

Estas especies son importantes ya que son necrófagas y por su morfología fisiología son capaces de llegar a lugares con poca accesibilidad como un baúl o una habitación cerrada.

7-Técnicas empleadas para hacer los análisis Quimiotaxonómicos

7.1-Cromatografía de gases

De acuerdo con la unión internacional de química pura y aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), la cromatografía se define como un método de separación físico en el que los componentes a separar son distribuidos entre dos fases: una parte que se encuentra fija (fase estacionaria) y otra que va en una dirección definida (fase móvil) (33), los componentes de una mezcla son transportados por la fase móvil hacia la fase estacionaria y debido a que cada compuesto tiene una afinidad diferente en ambas fases, esto produce su separación (34).

Específicamente, la cromatografía de gases (GC por sus siglas en inglés) utiliza un gas inerte (normalmente que H₂, He o N₂), como fase móvil y un sólido o líquido como fase estacionaria. La cromatografía gas-líquido es la más utilizada (35). En GC no existe una interacción entre los compuestos a separar y la fase móvil, la retención de los compuestos depende de su presión de vapor y a su afinidad a la fase estacionaria (28). En esta cromatografía, los analitos deben encontrarse en fase gaseosa para separarse por lo que es necesario que sean volátiles o semivolátiles. La volatilidad de una especie depende de su tamaño y polaridad: a mayor masa molar y polaridad, la volatilidad será menor.

Un cromatógrafo de gases (figura 7) consiste básicamente en un sistema de manómetros, un inyector *split/splitless*, un horno en el que se encuentra una columna capilar, un detector y un ordenador (36). Los solutos que eluyen de la columna cromatográfica son registrados por el detector y la representación gráfica de las señales de este detector a través del tiempo constituye un cromatograma. En un cromatograma se observan curvas en forma de picos y cada pico representa un analito cuando la separación fue completa (figura 8). El tiempo en el que se registra la señal más intensa de cada pico se conoce como tiempo de retención del analito y es característico para cada compuesto en esas condiciones de trabajo.

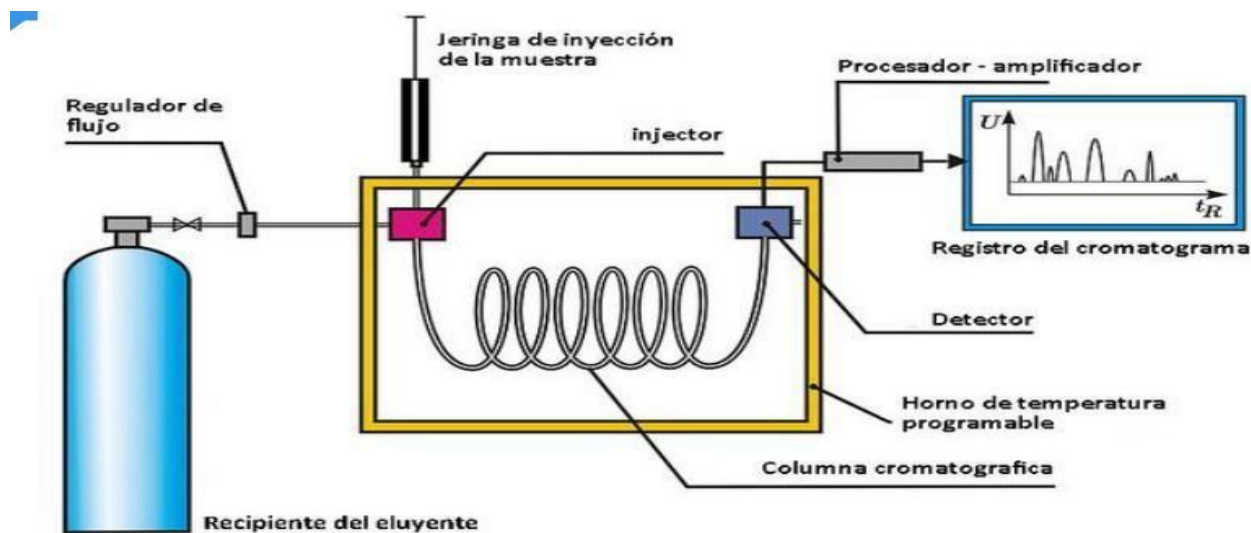


Figura 7.- Partes de un cromatógrafo de gases, esquema tomado de Mendoza; 2018 (37).

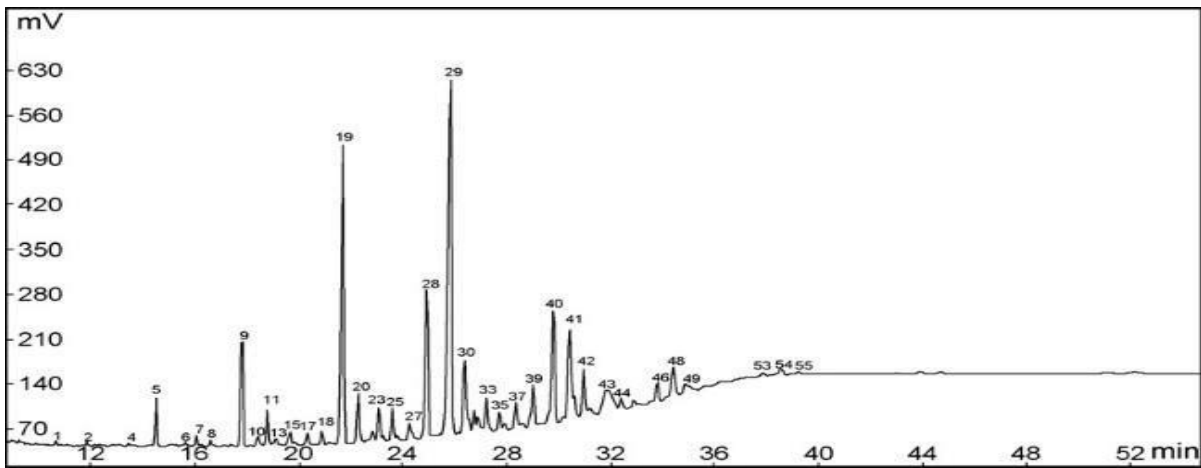


Figura 8.- Cromatograma de los compuestos de *C.Megacephala*, tomado de Zhu; 2006 (38).

NOTA: Se usó un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 con una columna de 25 m Ultra-2 (0.32 mm) y el detector FID con una rampa de temperatura de 55°C a 230°, y luego de 230°C a 320°C.

Las ventajas de la cromatografía de gases son: análisis rápidos (normalmente de algunos minutos), alta eficiencia de separación (debido al amplio uso de columnas capilares), sensibilidad ($\mu\text{g/mL}$ o ng/mL), pequeño volumen de muestra (μL) y más económica que otras técnicas (35).

7.2-Espectrometría de masas e instrumentación

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en ingles), es una técnica analítica de alta sensibilidad utilizada para identificar especies no conocidas a concentraciones muy pequeñas. La MS se basa en la ionización de los átomos o moléculas de una muestra y su posterior análisis como iones gaseosos dependiente de su relación masa/carga (m/z) (39). La colisión de los iones con moléculas del aire provoca alteraciones en la trayectoria y fragmentaciones no deseadas, por lo que la fuente de ionización y el analizador másico deben estar en alto vacío (40,41).

La ionización electrónica (anteriormente conocida como “impacto electrónico”) es una de las técnicas de ionización más utilizada en MS y se ilustra con la figura 9 (41). Consiste en la colisión de los átomos o moléculas de la muestra con electrones acelerados, generados por un filamento incandescente. Normalmente la energía de los electrones es de 70 eV, como la energía de ionización de la mayoría de los compuestos está por debajo de 15-20 eV, la energía de los electrones se encuentra en exceso, lo que ocasiona la fragmentación de las moléculas. Se ha observado que la ionización electrónica a 70eV produce espectros de masas reproducibles e independientes del instrumento utilizado por lo que se han creado grandes bases de datos de espectros de masas para facilitar la identificación de compuestos en una muestra (31,42).

El procesador proporciona un cromatograma y para cada analito un espectro de masas que es característico para cada compuesto. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (figura 10) combina la separación rápida y eficiente de GC con la determinación estructural de la espectrometría de masas, brindando una gran sensibilidad a los análisis alcanzando límites de detección de (ng/L) (35).

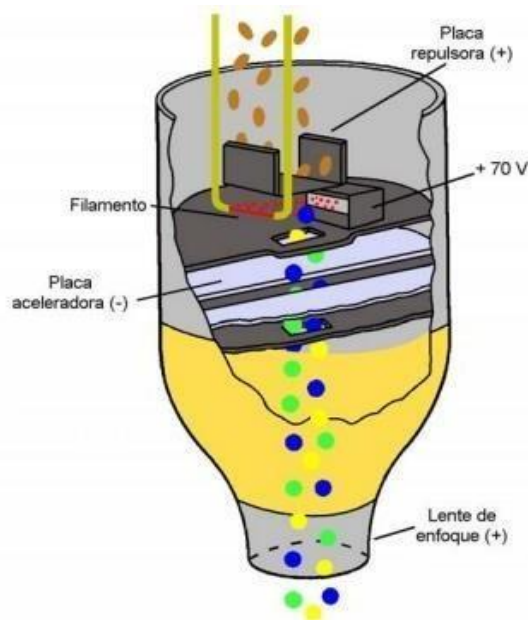


Figura 9.- Esquema de Ionización por impacto electrónico

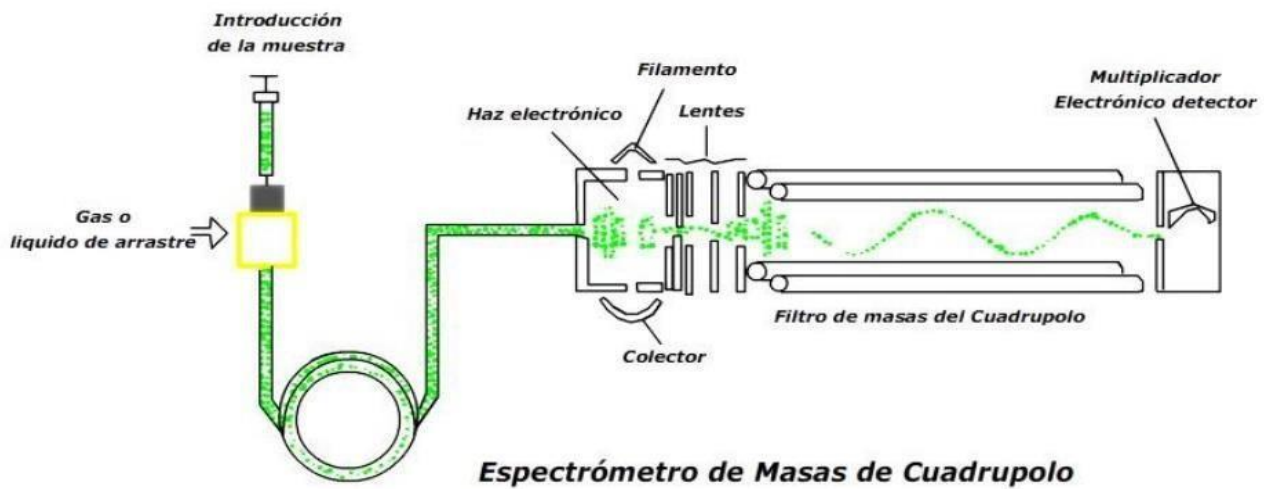


Figura 10.- Ejemplificación de las partes de un espectrómetro de masas de cuadrupolo.

7.3-Espectrometría de Fluorescencia

La espectrometría de fluorescencia (también llamada fluorimetría o espectrofluorimetría) es un tipo de espectroscopía electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra. Las sustancias absorben energía y después emiten parte de esa energía en una onda de longitud diferente. En esta técnica se utiliza un haz de luz, por lo general luz ultravioleta, que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y provoca que emitan luz de una menor energía, generalmente luz visible. Para hacer las mediciones se necesita un espectrofluorímetro (43).

Las partes que componen este instrumento se ilustran en las figuras 11 y 12:

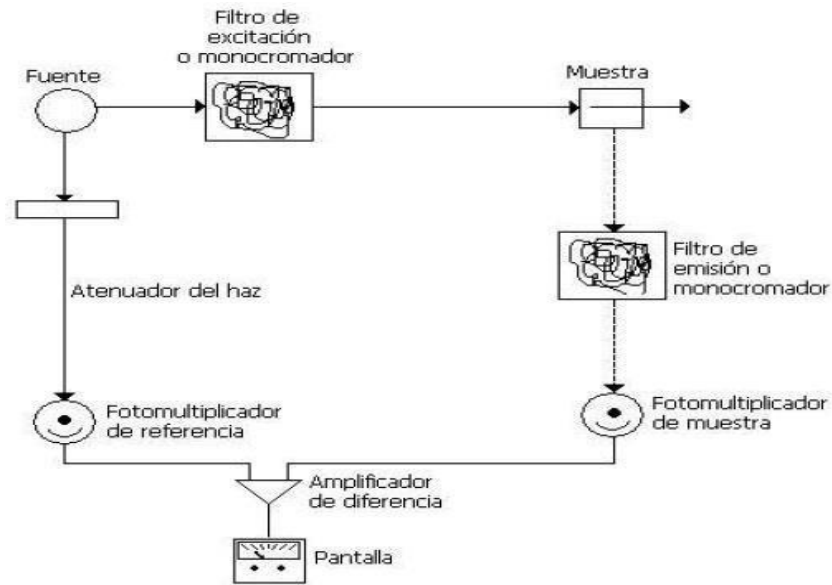


Figura 11.- Partes de un fluorímetro tomado de Skoog; 1994 (44).

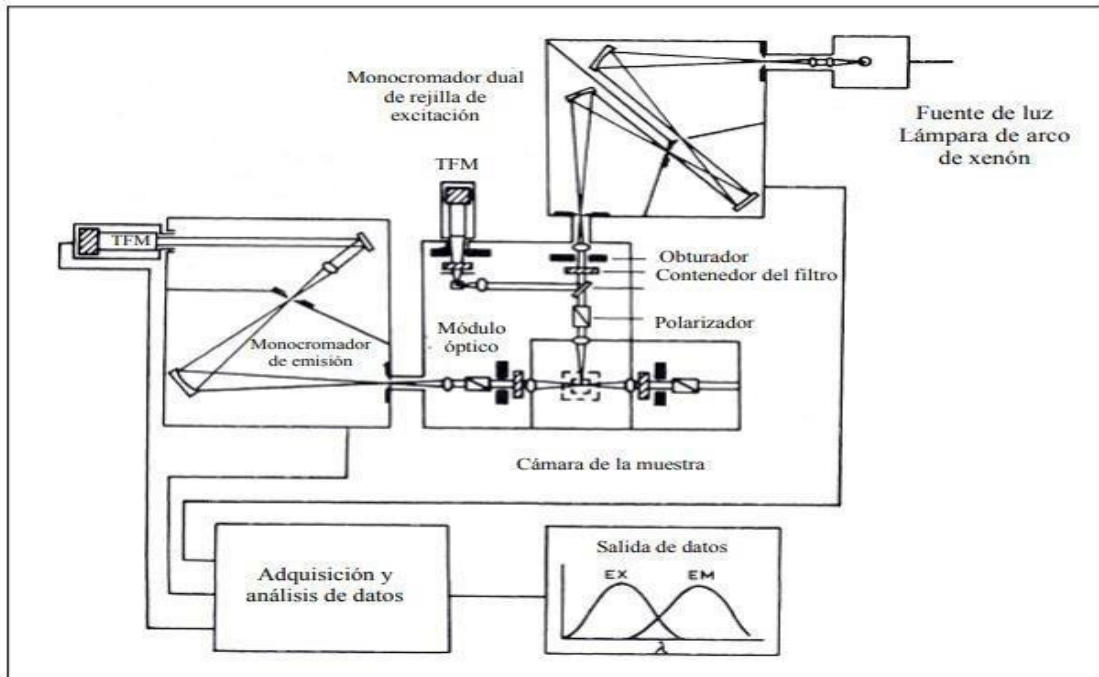


Figura 12 .- Esquema de un espectrofluorímetro con tubo fotomultiplicador (64)

En la medición de fluorescencia, una lámpara fluorescente emite luz ultravioleta (365 nm) que incide sobre la muestra y la excita. La señal resultante es captada por los detectores. Esta técnica también se ha usado para determinar el IPM.

8-Métodos quimiotaxonómicos para datar las especies.

Los entomólogos forenses se basan en el tamaño y desarrollo para estimar la edad de la mosca y, a partir de ésta calcular el intervalo post mortem (45); pero esto no es lo más preciso ya que los estadios de las moscas pueden variar por diversos factores como la temperatura a la que se encuentra el cuerpo, la disponibilidad de nutrientes, el sitio donde son recolectados, etc.

El método más común y que se practica recurrentemente consiste en dejar crecer a las larvas y pupas recolectadas en una cámara climática, para después hacer una identificación morfológica de las especies recolectadas (25), pero un gran inconveniente de este método es el tiempo necesario para realizarlo y el equipo disponible en el laboratorio.

Para tener más información sobre los especímenes es necesario realizar análisis más específicos que puedan estimar una edad y permitan una identificación más exacta sobre las moscas, pupas y larvas recolectadas. Debido a que la mayoría de los especímenes obtenidos son larvas y pupas que resulta difícil identificar la especie, por la falta de caracteres morfológicos.

Algunos de los análisis más específicos que se realizan en estos casos:

- ✓ Análisis de hidrocarburos cuticulares.
- ✓ Análisis de compuestos orgánicos volátiles.
- ✓ Análisis de fluorescencia de pteridina.

El análisis de los compuestos orgánicos, en especial de los hidrocarburos cuticulares de los insectos, es el método más utilizado (25), dado a que ya se han identificado diversos compuestos en el ciclo de vida de estos. Todos los insectos tienen hidrocarburos cuticulares, esos hidrocarburos a menudo son característicos de una especie en particular y proporcionan información del sexo de la especie y/o parte del ciclo de vida.

8.1-Análisis de los hidrocarburos cuticulares

Los compuestos cuticulares son componentes de la capa superficial de ceras que están en la epicutícula de los insectos (46,47) y sirven para proteger al insecto de diversas maneras, en particular, al proporcionar una barrera para la infiltración de insecticidas y toxinas (48).

Los hidrocarburos cuticulares son específicos de cada especie ya que varían cualitativa y cuantitativamente dependiendo de la especie y su edad (38,46), por esto es posible diferenciar y datar la edad de los insectos o artrópodos mediante la obtención de los perfiles de hidrocarburos cuticulares.

Los hidrocarburos cuticulares, que están contenidos en la capa cerosa de la epicutícula han sido estudiados en diversas familias de dípteros, y se ilustra en la tabla 1, en dichos estudios se usaron las pupas ya que la degradación química es lenta en esta etapa de vida de las moscas.

8.1.1 Metodología general de análisis de hidrocarburos cuticulares.

De acuerdo con la literatura revisada (24, 25,26,32, 46) el análisis de hidrocarburos cuticulares se puede simplificar en los siguientes pasos:

- 1- Obtener las muestras para el análisis (moscas adultas, larvas o pupas).
- 2- Sacrificar las especies (por congelación).
- 3- Realizar la extracción de los compuestos, principalmente con hexano mediante una extracción sólido-líquido
- 4 - Concentrar los compuestos extraídos (opcional).
- 5- Adicionar un estándar interno (opcional).
- 6- Hacer la inyección de 1-2 μL en modo splitless.
- 7- Obtener el cromatograma y la identificación de los picos por medio de bibliotecas (NIST).
- 8- Efectuar el análisis de los datos obtenidos.

Tabla 1.- Compuestos presentes en las especies de importancia forense (pupas)
tomado de Ye G; 2007 (49)

Compuesto	ESPECIE					
	<i>A.grahami</i>	<i>C.megacephala</i>	<i>L.sericata</i>	<i>A.rufifacies</i>	<i>B.peregrina</i>	<i>P.crassipalpis</i>
Tricosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2-metilquadracosano	✓					
Pentacoteno a	✓					
Pentacoteno b	✓					
Pentacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9,11,13-trimetilpentacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7-metilpentacosano	✓					
3-metilpentacosano	✓	✓	✓	✓		✓
Hexacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3,7-dimetilpentacosano	✓					
2-metilhexacosano	✓	✓	✓	✓		
Heptacoteno a	✓			✓		
Heptacoteno b	✓			✓		
Heptacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2,4-dimetilhexacosano	✓					
9,11,13-trimetilheptacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7-metilheptacosano	✓	✓	✓			✓
5-metilheptacosano	✓	✓	✓			✓
3,4-dimetilheptacosano	✓					
11,13-dimetilheptacosano						✓
3-metilheptacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Octocosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6-metiloctocosano	✓				✓	
4-metiloctocosano						✓
2-metiloctocosano	✓	✓	✓	✓		

3-metiloctocosano	✓				✓	✓
Nonacotene	✓					
Nonacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2,4-dimetiloctocosano	✓	✓		✓		
9,11,13,15-tetrametilnonacosano	✓	✓	✓		✓	✓
7-metilnonacosano	✓	✓	✓		✓	✓
5-metilnonacosano	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11,17-dimetilnonacosano	✓	✓			✓	✓
9,17-dimetilnonacosano	✓		✓	✓		
7,11-dimetilnonacosano	✓					
3-metilnonacosano	✓		✓	✓	✓	✓
Triacotano		✓	✓	✓	✓	✓
12,14,15-trimetiltriacontano	✓		✓		✓	✓
2-metiltriacontano	✓	✓	✓	✓	✓	
Hentriacontano		✓	✓	✓	✓	✓
9,11,13,15-tetrametilhentriacontano	✓		✓	✓	✓	✓
7-metiltriacontano					✓	
3-metilhentriacontano				✓	✓	

Los compuestos marcados en rojo tienen gran importancia, ya que estos son los que sólo están presentes en ciertas especies y son característicos para diferenciar las especies, así que, si en algún análisis se detectan estos compuestos se podrá identificar una especie en particular.

A primera vista se observa en la tabla que las seis especies empleadas tienen un perfil de hidrocarburos cuticulares similares entre sí; en su mayoría son n-alcános seguidos de monometil-alcános, pero los compuestos marcados en rojo son específicos para una sola especie en particular. Es importante mencionar que este tipo de análisis quimiotaonómicos presentan las siguientes ventajas:

- 1) Las pupas dañadas se pueden utilizar para el análisis.
- 2) Los hidrocarburos cuticulares son moléculas relativamente estables que se pueden utilizar para muestras más antiguas.
- 3) Se pueden analizar especímenes de museo con alfileres
- 4) Las muestras individuales proporcionan un patrón GC-MS útil.

Este método es simple, factible y rentable en comparación con la identificación tradicional utilizando caracteres morfológicos, especialmente para especialistas forenses con pocos conocimientos entomológicos.

Diferentes estudios como los hechos por Zhu (49,38) pueden indicar la composición de los hidrocarburos de una especie, es importante mencionar que al realizar la identificación se puede hacer una distinción entre subfamilias de la especie, para esto se buscan compuestos específicos en los perfiles de hidrocarburos cuticulares, ya que los perfiles pueden ser muy similares (50). Siguiendo esta línea de estudios también se ha comprobado que la composición cambia debido a la edad del espécimen (51), es por ello que este análisis químico de hidrocarburos cuticulares tiene alta relevancia en la entomología forense.

La determinación de estos compuestos mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permite monitorear los diferentes compuestos en sus otras etapas de vida (45,38,52,53).

La mayoría de los compuestos son alcanos y alquenos de cadenas largas (20- 30 carbonos), la abundancia de alcanos de alta masa molar, de longitud de cadena mayor que C₂₅ aumenta gradualmente con la edad (54). En la figura 13 se muestra la proporción de algunos compuestos en función de la edad para la especie *Aldrichina grahami*.

En el estudio realizado por Hong (54) se seleccionaron varios hidrocarburos y se usaron para establecer una ecuación de regresión múltiple para la determinación exitosa de la edad de las larvas. En esta investigación se descubrió que algunos cambios fisiológicos y bioquímicos son indicadores potenciales de la edad de las moscas, en la figura 13 X se muestra que la abundancia relativa de ciertos picos tiende a incrementar conforme pasan los días y esto es un indicador y un

diferenciador de la edad que tendrían las moscas de acuerdo con el día en que son recolectadas y analizadas.

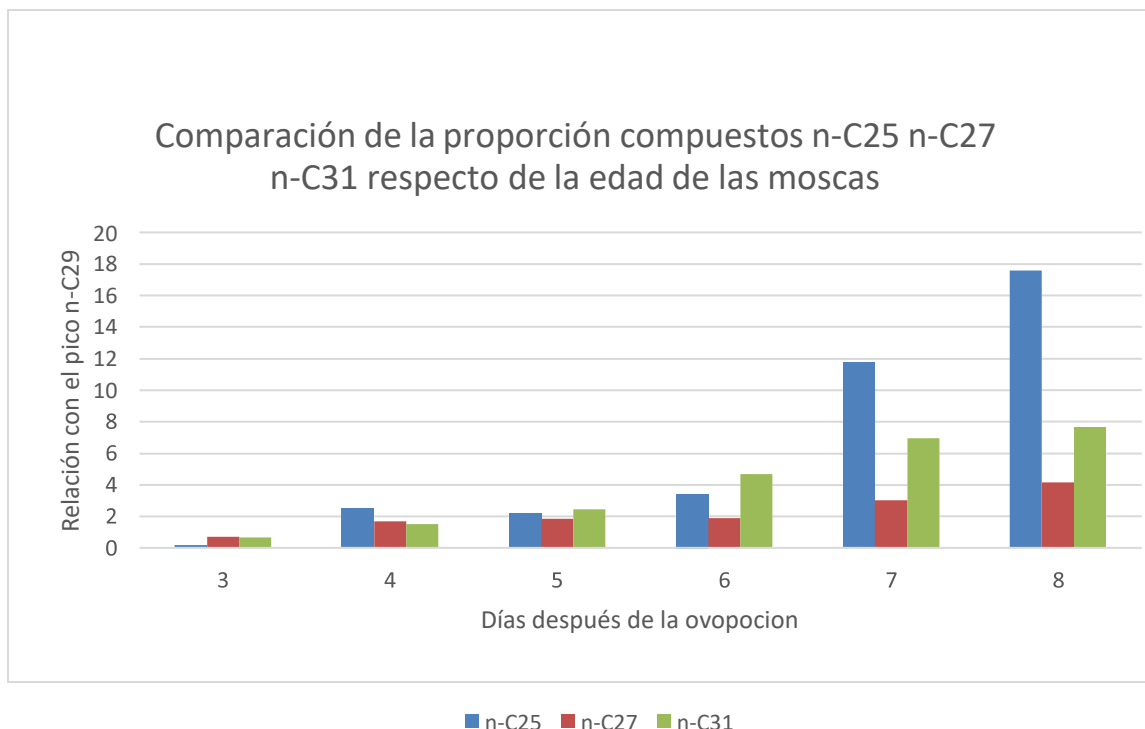


Figura 13.- Gráficos elaborados a partir de lo reportado por Hong, 2014 (54).

En lo reportado hay un incremento en el contenido de los hidrocarburos de alta masa molar (cadenas de más de 25 carbono), este aumento de hidrocarburos puede mejorar la impermeabilización y protegerlos de los ambientes adversos, especialmente a temperaturas más altas y de menor humedad. Se ha observado que a mayor temperatura se produce una mayor cantidad de hidrocarburos cuticulares, además a temperaturas altas se incrementa la tasa de desarrollo de las larvas y puede hacer que cambie el perfil de los hidrocarburos cuticulares, al igual que la humedad, ya que al deshidratarse los especímenes habrán bastantes compuestos que protejan al cuerpo y con ello evitar la pérdida de agua en ellos.

A continuación, se muestra una tabla que compara los perfiles de los compuestos presentes en la especie *Crhysomya putoria*, del día 1 al 5 después de eclosionar. En la tabla 2 (marcado con negritas), se mencionan los compuestos presentes en un solo día de crecimiento de *Crhysomya putoria*.

Tabla 2.- Comparación de las abundancias relativas de los compuestos de una hembra de *Crhysomyaputoria* a través de 5 días después de eclosionar. (Vianna, 2016) (55).

PICO	COMPUESTO	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
1	nC21	0.20	0.16	0.13	1.14	0.13
2	nC23	0.26	0.21	Nd	Nd	0.29
3	11MeC23	0.18	Nd	Nd	Nd	0.1
4	3MeC23	0.11	Nd	Nd	Nd	Nd
5	C25:2	Nd	Nd	Nd	0.13	0.15
6	C25:1	0.70	0.11	Nd	Nd	0.11
7	nC25	0.63	0.32	0.22	0.25	0.66
8	13,11MeC25	2.03	0.54	0.47	0.35	1.49
9	3MeC25	0.42	0.16	0.11	Nd	0.12
10	nC26	0.11	0.16	0.14	0.14	0.16
11	13MeC26	0.19	0.12	0.11	0.54	0.15
12	2MeC26	0.32	0.79	0.5	Nd	0.39
13	C27:1	1.19	0.87	1.25	1.26	0.92
14	nC27	2.61	2.86	3.10	3.57	4.11
15	13,11MeC27	3.43	1.49	1.70	1.25	1.99
16	7MeC27	0.60	0.27	0.39	0.40	0.22
17	2MeC27	0.42	0.21	0.13	Nd	0.14
18	3MeC27	2.04	1.05	0.82	0.63	0.85
19	Nc28	0.54	0.79	0.73	0.74	0.88
20	14-,13MeC28	0.28	Nd	0.15	0.12	0.11
21	2MeC28	14.63	15.19	9.29	8.19	7.31
22	C29:1	Nd	2.97	5.17	6.63	3.54
23	nC29	10.73	13.31	13.40	17.48	19.32
24	15-,13MeC29	7.69	5.53	6.42	5.36	4.07
25	13,17DiMeC29	1.30	Nd	Nd	Nd	Nd
26	2MeC29	0.89	0.49	0.43	0.22	0.26
27	3MeC29	1.91	1.48	1.30	1.08	0.98

28	nC30	0.96	0.86	1.02	0.92	1.27
29	15-,14MeC30	1.05	0.29	0.29	0.26	0.25
30	C31:2	Nd	Nd	0.14	Nd	Nd
31	2MeC30	14.11	18.18	11.46	8.28	9.03
32	C31:1	6.22	14.34	21.63	26.72	21.80
33	6,16DiMeC30	3.25	Nd	Nd	Nd	Nd
34	nC31	4.01	5.76	5.85	5.81	8.16
35	15-,13MeC31	10.89	7.01	8.21	5.69	6.49
36	13,17DiMeC31	1.87	1.02	0.91	0.29	0.48
37	15,21DiMeC31	0.67	Nd	Nd	Nd	Nd
38	3MeC31	0.41	0.27	0.27	0.14	0.16
39	nC32	Nd	0.11	0.18	0.14	0.19
40	15MeC32	0.18	0.20	Nd	Nd	Nd
41	C33:2	0.16	0.43	0.69	0.18	0.34
42	2MeC32	0.42	0.47	0.37	0.19	0.26
43	C33:1	0.99	1.26	1.99	1.90	2.21
44	17-15MeC33	0.60	0.27	0.39	0.25	0.38
45	13,19DiMeC33	0.33	Nd	Nd	Nd	Nd
45	11,19DiMeC33	Nd	Nd	Nd	Nd	0.17
El pico 45 representa un alcano diferente del día 1 y el 5. Tienen el mismo tiempo de retención, pero tienen un metilo en una posición diferente.						

NOTA: Estos compuestos son hidrocarburos y el número a lado de la C (carbono) es el número de átomos de carbono que conforma dicho compuesto, si tiene un número antes indica que tiene una ramificación en ese número de carbono del compuesto mencionado

Nd :significa No detectable

En la tabla 2, se han marcado en negritas los compuestos presentes en un solo día de crecimiento de *Crhysomya putoria*. Esta información sirve para hacer la datación de la especie ya que al tener el comparativo de las abundancias relativas de ciertos compuestos junto con los compuestos presentes en solo un día de crecimiento se puede estimar exactamente la edad del espécimen cuando fue encontrado.

En seguida, se muestran los cromatogramas de las muestras que contienen los hidrocarburos cuticulares correspondientes a los diferentes tiempos del ciclo de vida de *Chrysomia putoria*. (Figuras 14 a 18).

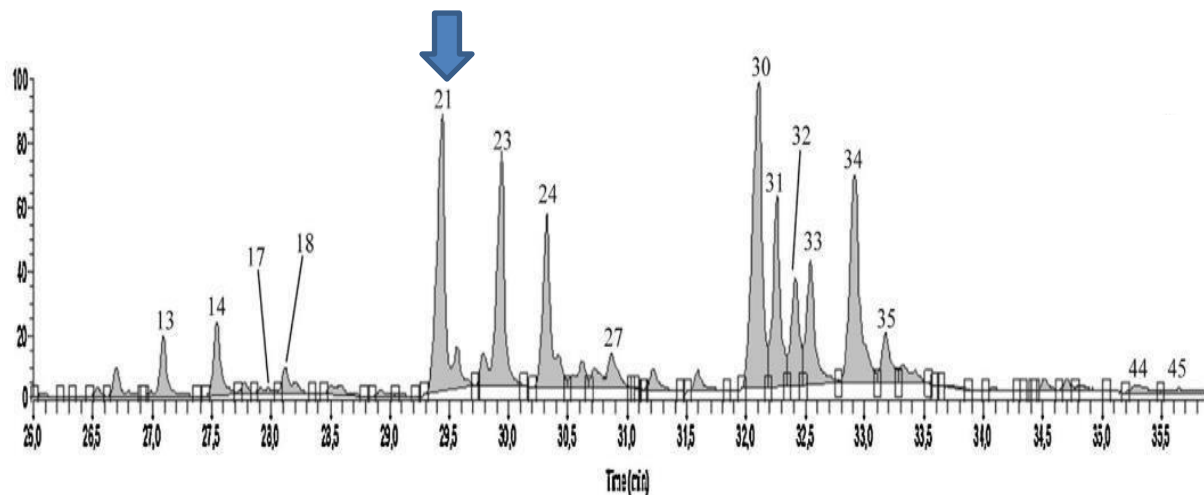


Figura 14.- Cromatograma de los hidrocarburos cuticulares de *Chrysomia putoria* de un día de edad (Braga, 2016) (55).

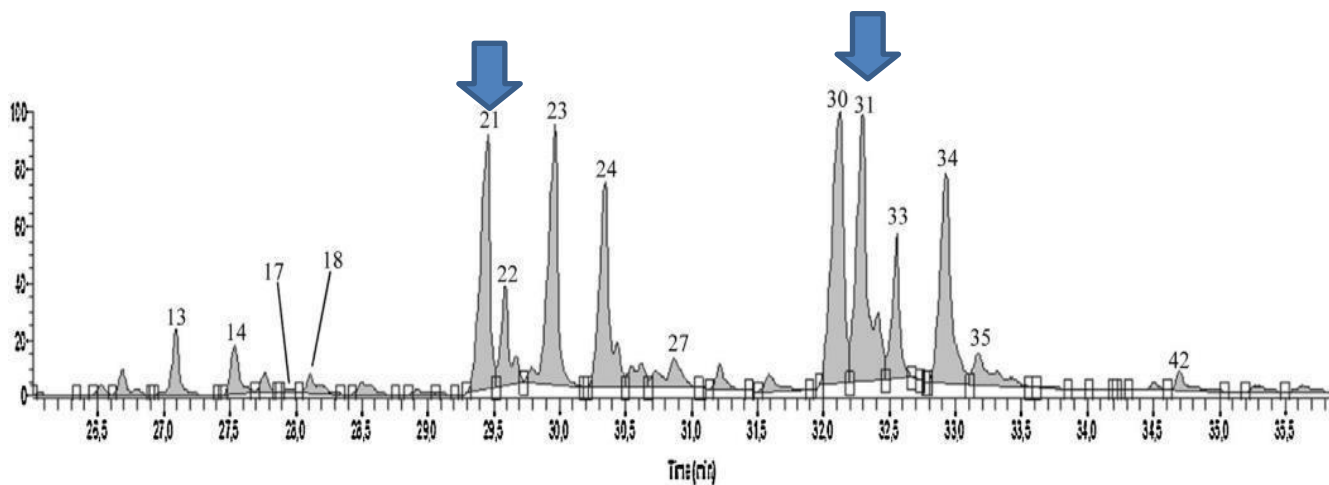


Figura 15.- Cromatograma de los hidrocarburos cuticulares de *Chrysomia putoria* de dos días de edad (Braga, 2016) (55).

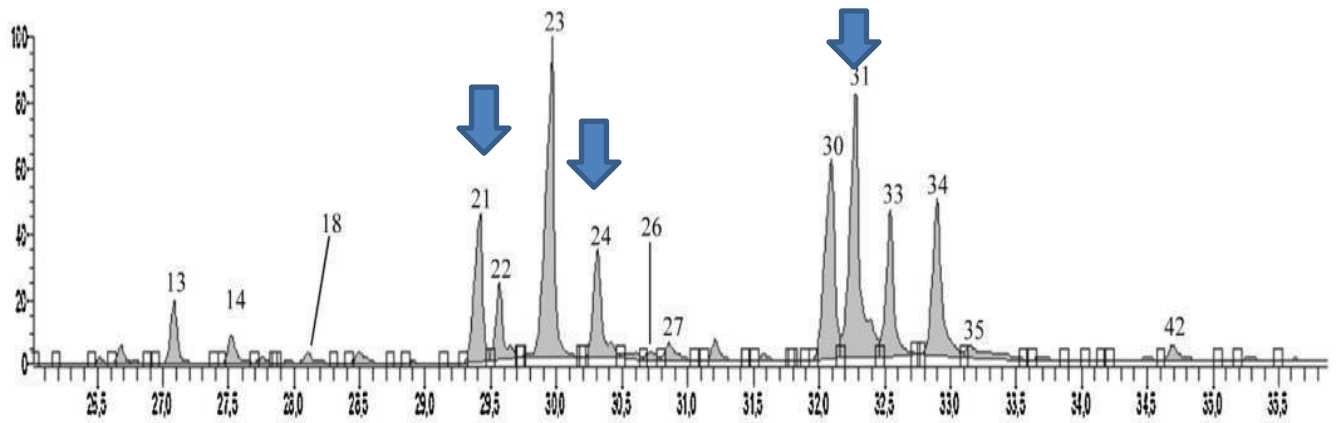


Figura 16.- Cromatograma de los hidrocarburos cuticulares de *Chrysomia putoria* de tres días de edad (Braga, 2016) (55).

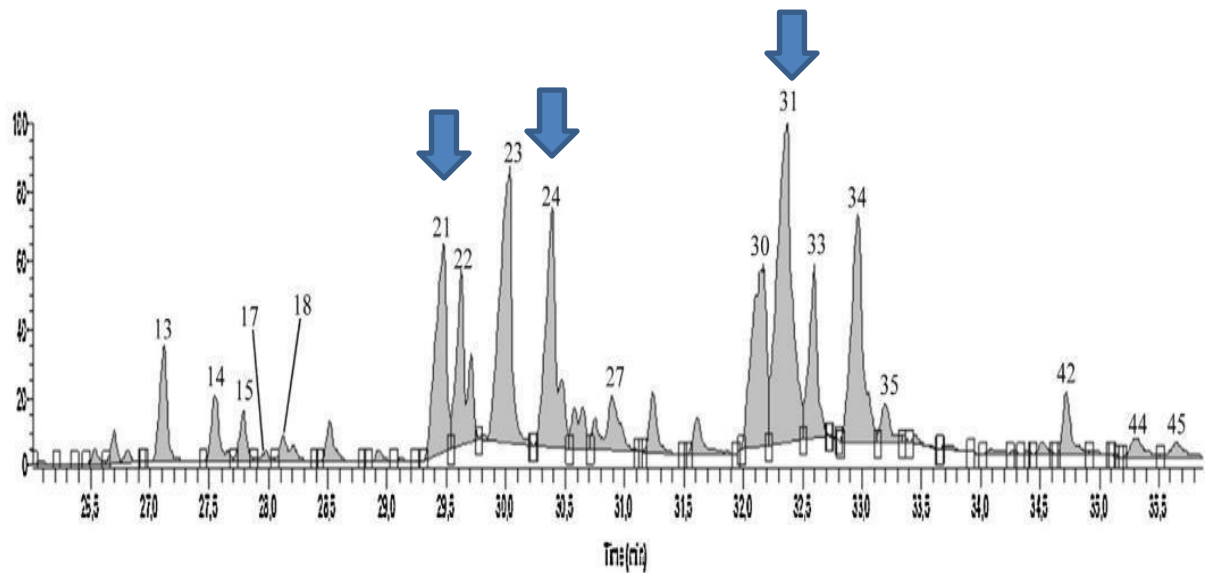


Figura 17.- Cromatograma de los hidrocarburos cuticulares de *Chrysomia putoria* de cuatro días de edad (Braga, 2016) (55).

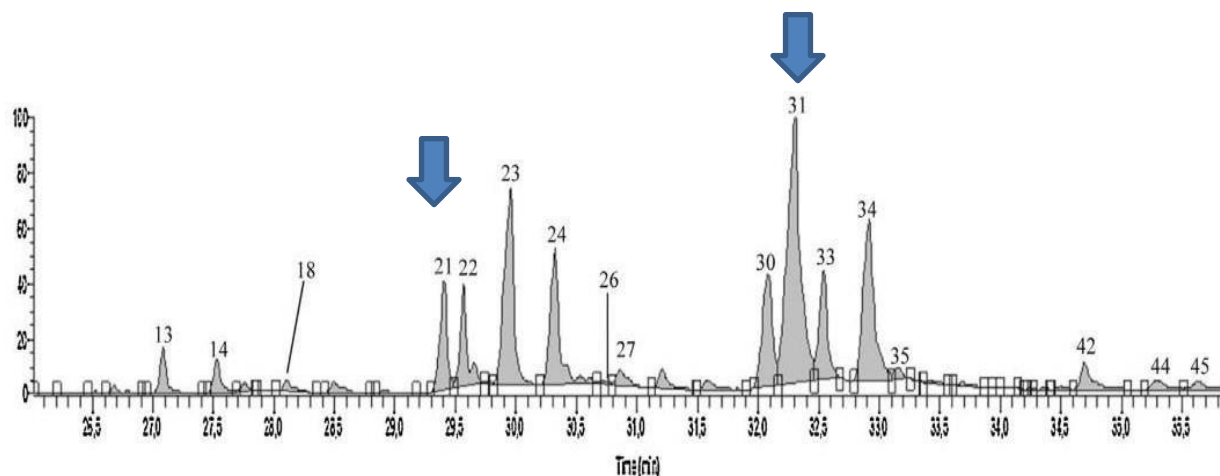


Figura 18.- Cromatograma de los hidrocarburos cuticulares de *Chrysomya putoria* de cinco días de edad (Braga, 2016) (55)

Nota: Se utilizó un cromatógrafo Thermo-Finnigan Trace acoplado a un espectrómetro de masas Polaris Q Mass para obtener estos cromatogramas

Estos cromatogramas ilustran cómo hay variación en la proporción presente de los compuestos, días después de la eclosión de la mosca, por ejemplo, los compuestos 21(2-metil octacosano), 22(1-nonacoseno), 30 (hentriaconteno) y 31 (2-metil triacontano) los cuales presentan variación de abundancia que tienen entre los días. Esta variación en la abundancia de los compuestos indica que en ciertos días se encontrará en mayor proporción un compuesto que el otro, sin embargo, el perfil de los hidrocarburos seguirá constante, por lo que se puede inferir que no importa el día en que sean encontrados los especímenes, la identificación del espécimen, en este caso una hembra, será correcta. Asimismo se encuentran compuestos específicos en el primer, tercer y quinto día después de eclosionar. Los cuales son los compuestos 25 (3,17- dimetil nonacosano), 30 (hentriaconteno), 33 (6.16-dimetil triaconteno), 37 (15,21- dimetil hentriacontano) y el 45(11,19-dimetil tritriacontano) que se pueden observar en negritas en la tabla 2, que nos sirven para hacer la datación del insecto.

El ejemplo más evidente en la variación de la abundancia es el compuesto número 22 (1-nonacoseno) ya que no está presente en el cromatograma del primer día de eclosionada la mosca, pero se puede observar en los días posteriores hasta igualar la altura de pico del compuesto 21(2-metil octacosano).

8.2-Compuestos Orgánicos volátiles

La estrategia de cuantificación es muy parecida a la empleada para la determinación de los hidrocarburos cuticulares presentes en las moscas de importancia forense, puesto que también utiliza la técnica analítica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Si bien, ya se tienen estudiados diversos perfiles de los hidrocarburos cuticulares de las moscas y los cambios que se tienen de acuerdo con las edades, los compuestos orgánicos volátiles no han sido muy estudiados, pero al igual que con los hidrocarburos se pueden emplear para hacer una estimación de la edad del espécimen mediante la cuantificación de los compuestos presentes que pueden ser: alcoholes, ésteres y ácidos grasos (56).

También se han aislado ácidos grasos y esteroides de las moscas. De los primeros compuestos en mayor proporción son: el ácido palmítico que es predominante, el ácido palmitoleico, el ácido oleico, el ácido linoleico y pequeñas cantidades de ácido esteárico. Se sabe que estos lípidos proporcionan resistencia a la desecación y a las infecciones por hongos y bacterianas (57). En cuanto a los segundos se han hallado esteroides, incluidos el colesterol, el campesterol y el sitosterol, aunque el colesterol parece ser el más sistemáticamente abundante (58).

El perfil de estos compuestos orgánicos volátiles también puede presentar fluctuaciones como el perfil de hidrocarburos cuticulares, estos cambios pueden ser por la edad, la dieta, factores ambientales.

En la técnica empleada para hacer la estimación del intervalo post mortem (IPM) hace uso de la micro extracción en fase sólida, SPME por sus siglas en inglés.

8.2.1-Micro extracción en Fase Sólida (SPME).

Esta técnica analítica consiste en dos procesos: una extracción y una pre concentración de los analitos contenidos en la muestra. En primera instancia, una fibra de sílice unida generalmente a una fase estacionaria polimérica es expuesta a la muestra, donde existen equilibrios entre la muestra y la fase estacionaria. En la segunda etapa, la fibra con el analito adsorbido se transfiere al instrumento para su desorción, separación y cuantificación (59,60).

Esta técnica se ha empleado principalmente en la extracción de compuestos orgánicos volátiles, semivolátiles, muestras acuosas, generalmente ambientales, biológicas, pero también se puede utilizar en muestras sólidas y gaseosas (61).

El principio de la SPME se basa en un equilibrio de reparto de los analitos entre la muestra y la fibra (fase estacionaria). El dispositivo para SPME (figura 19), consiste en un contenedor de fibra parecido a una jeringa, éste contiene una barra de acero inoxidable semejante a una aguja dentro de la que se halla una fibra de sílice fundida, y que puede ser expuesta o retraída y se tiene una capa relativamente delgada de alguna de las fases estacionarias poliméricas, en la cual los analitos orgánicos son adsorbidos desde la matriz de la muestra.

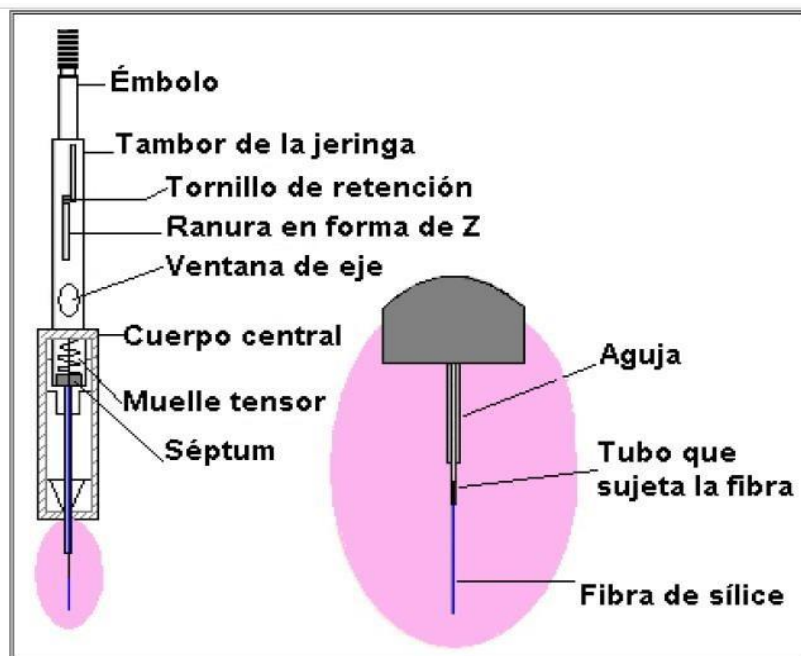


Figura 19.- Esquema del dispositivo de Microextracción en Fase Sólida (SPME)
tomado de Mejia: 2017 (62)

Existen tres tipos de la extracción por SPME:

- **Extracción Directa (SPM/DE)**

En la extracción directa se sumerge la fibra directamente en la muestra líquida.

- **Headspace (SPME/HS)**

En Headspace la fibra se expone sobre la muestra, donde se está generando un vapor mediante un calentamiento de la muestra, esta técnica tiene una ventaja con los compuestos volátiles, puesto que los de alto peso molecular o no volátiles se quedarán en la muestra y no llegarán a la fibra.

- **Extracción Protegida con Membrana (SPME/MP)**

En la técnica de protección con membrana (figura 20), la membrana sirve como barrera para las muestras que son complejas y tienen muchas interferencias, al tener una membrana a extracción es más selectiva para el analito de interés.

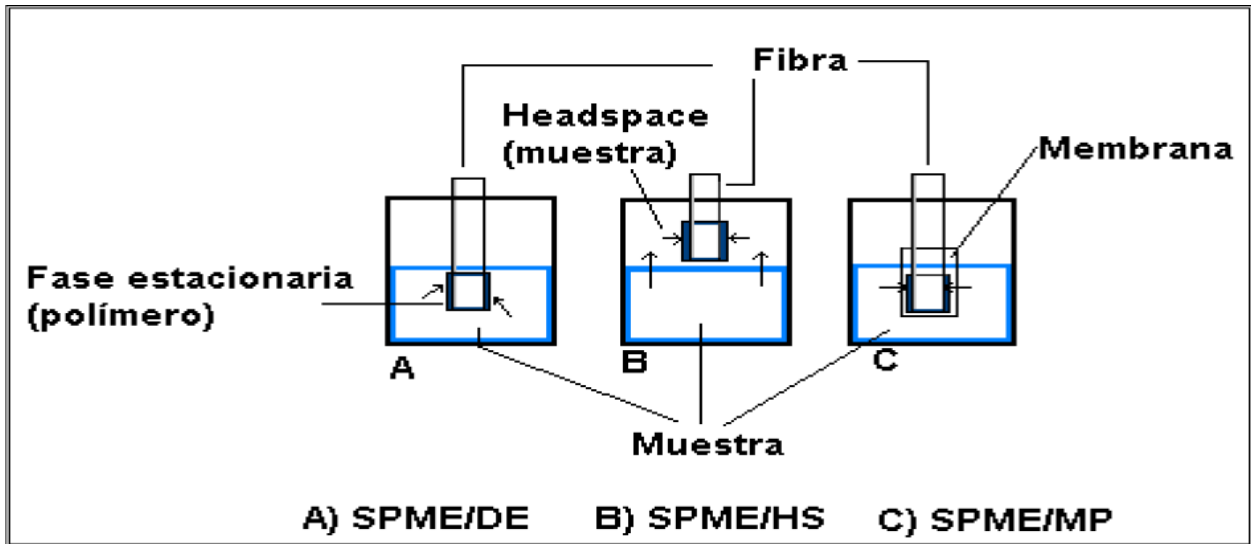


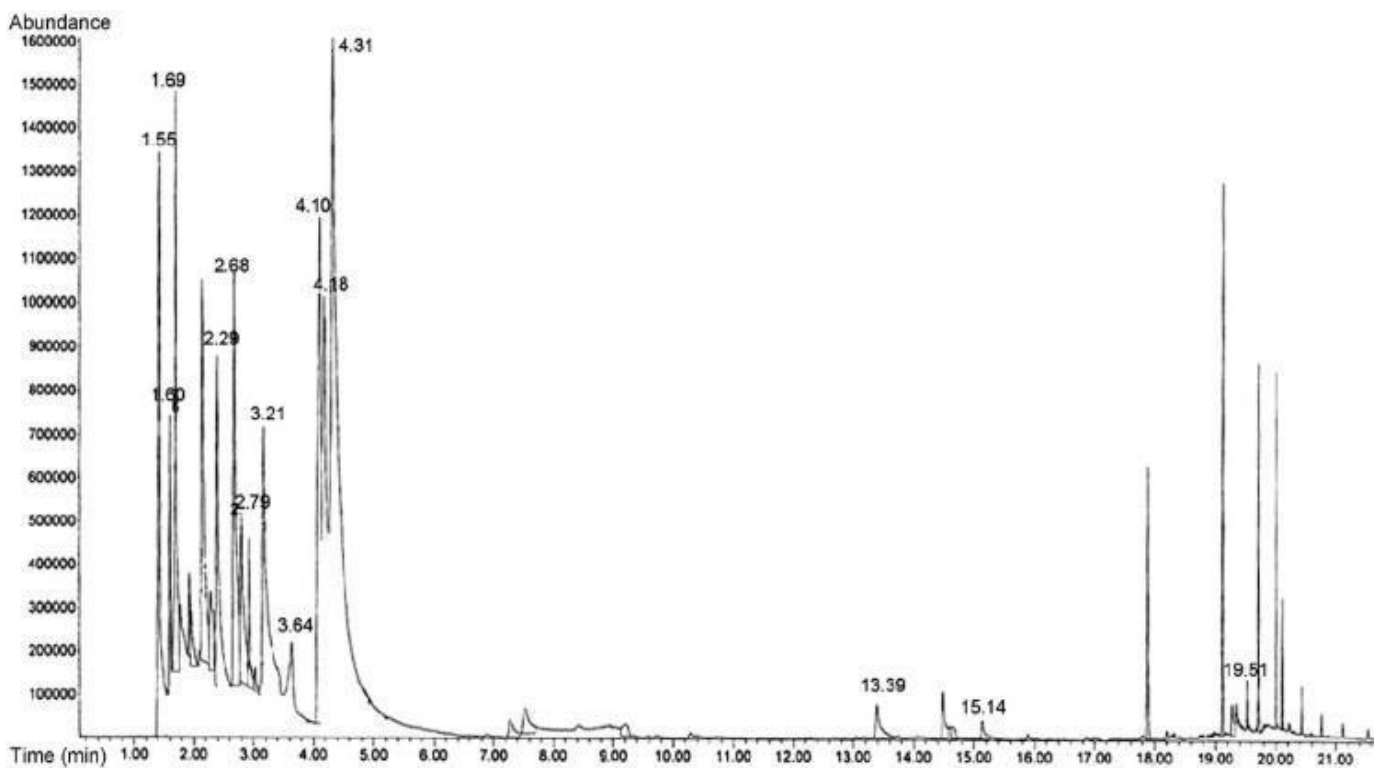
Figura 20.- Representación de los tipos de extracción para SPME tomado de (Vas G: 2004) (60)

8.2.2-Metodología para los compuestos orgánicos volátiles.

En términos generales, el análisis de compuestos orgánicos se puede resumir en los siguientes pasos:

- 1- Tener las moscas para realizar el estudio y sacrificarlas.
- 2- Limpiar con agua destilada.
- 3- Hacer una micro extracción en fase sólida.
- 4- Llevar a cabo la desorción en el inyector del cromatógrafo de gases.
- 5- Realizar el análisis por cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas.

En un estudio realizado por Frederickx (61) se determinó la edad de las moscas necrófagas presentes en un cuerpo, mediante el análisis del perfil de compuestos orgánicos volátiles, empleando a la mosca *Calliphora vicina* que son de las primeras en llegar y colonizar al cadáver. Este estudio busca demostrar la viabilidad del uso de los compuestos orgánicos volátiles para determinar la edad de esta especie y complementar esta técnica en conjunto con el análisis por medio de hidrocarburos cuticulares. En seguida, se muestra un cromatograma obtenido en esta investigación realizado por Frederickx, en el que es posible observar la abundancia de algunos compuestos identificados por su tiempo de retención y posteriormente en la tabla X donde se aprecian los resultados de los perfiles obtenidos de compuestos orgánicos volátiles, de acuerdo al estadio en el que se encontraban las especies analizadas y que con base en la abundancia de los compuestos presentes es posible estimar cada estadio de la especie propuesta.



Se utilizó una extracción SPME (DVB-CAR-PDMS) en un cromatógrafo Agilent 6890N acoplado con un detector masico Agilent 5973 a una energía de ionización de 70 eV con un intervalo m/z de 35 a 350 uma, una columna HP-5 (30m x 0.25mm, 0.25 μ m) con una temperatura de 40°C por 8 minutos, después una primera rampa de temperatura que incrementa 8°C por minuto hasta llegar a 115°C, la segunda rampa incrementa la temperatura 50°C por minuto hasta llegar a 290°C y se mantiene esa temperatura por 8 minutos.

Figura 21.- Cromatograma de los compuestos orgánicos volátiles de *C.vicina* tomado de (Frederickx, C:2012) (63).

En las investigaciones de Frederickz y col. Se realizó el perfil de los compuestos orgánicos volátiles en las tres etapas larvales y en su forma de pupa hasta antes de eclosionar recopilando los datos en la tabla 3.

Tabla 3.- Compuestos orgánicos de C.vicina en su etapa de larva y pupa tomado de Frederickx, C:2012 (63).

Tiempo de retención	Compuesto	Larva			Pupa													
		Estadio larval			Día													
		1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
1.25	N,N-dimetilmetanamina	■	■															
1.55	Metanotiol									■	■	■	■					
1.60	Etanol							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1.64	2 - propanamina	■																
1.69	2 -propanona									■	■	■						
1.79	2 - metil-2 - propanol						■	■	■	■	■							
2.29	Etanoato de etilo									■	■	■	■	■	■	■	■	■
2.31	Ácido acético								■	■	■	■	■					
2.68	3-metilbutanal	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2.79	2-metilbutanal				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2.83	isobutanol											■	■	■	■	■	■	■
3.16	2-butanona											■	■	■	■	■	■	■
3.21	1-metoxi-3-metilbutano									■	■	■	■	■	■	■	■	■
3.64	3-hidroxi-2-butanona								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3.78	Metilciclohexano											■	■					
4.10	3-metil-1butanol								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4.18	2metil-1butanol									■	■	■	■	■	■	■	■	■
4.19	Metil-isobutil-cetona						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4.31	Metildisulfonilmetano			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5.93	Octano	■	■	■														
6.24	Hexanal								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7.30	2,4-dimetilheptano																■	■
7.54	n-etil- 1,3ditiosoindolina	■					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8.15	2-metilpropil-3-metilbutanoato																■	■
8.56	N-(2-aminoetil)-etano-1,2- diamina		■															
9.01	2-metilbutanoato de etilo																■	■
9.12	3-metilbutanoato de etilo																■	■
9.39	Etilbenceno							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
9.65	1,4-dimetilbenceno			■						■	■	■	■	■	■	■	■	■

Compuestos presentes en 3-4 muestras

Compuestos presentes en 2 muestras

Compuestos presentes en 2 muestras

Este experimento permite definir la edad del espécimen en cuestión, si bien hay compuestos que están presentes en la larvas y pupas, hay otros compuestos como los azufrados, cetonas, aldehídos y alcoholes que solo son emitidos por las pupas, en el caso de las larvas, los compuestos ácidos son los que se presentan en esta etapa de su crecimiento.

Con este experimento se puede comprobar que el uso de los compuestos orgánicos volátiles para realizar el perfil de alguna especie, así como determinar la edad de esta, son válidos y se pueden emplear ya que existen diferencias en los estadios de la mosca y asimismo se pueden agrupar por días de pupa al detectar ciertos compuestos presentes solamente en esos días.

Entre los compuestos detectados en este experimento realizado con las larvas y pupas se encontraron compuestos marcadores de descomposición cadavérica, principalmente compuestos de azufre, que por el momento se asocian a la larva, pero que también pueden ser provenientes del propio cadáver.

Con esto se muestra que no solo los hidrocarburos cuticulares se pueden emplear para determinar la edad, o hacer la identificación de un ejemplar, si bien es el método que más se utiliza, los compuestos orgánicos volátiles también pueden cumplir la función de identificación y datación para calcular el IPM.

8.3-Análisis de fluorescencia de pteridina.

Este método se basa en la cantidad de pigmentos fluorescentes presentes en las moscas, es decir, las pteridinas, que son productos de degradación del metabolismo de las purinas y se acumulan con el tiempo en los compuestos de los ojos, tienen la ventaja de ser aplicables tanto a los insectos machos como a los hembras (45).

La pteridina es un compuesto químico cuya composición se basa principalmente en anillos de pirimidina y pirazina. (Figura 20) El nombre “pteridina” es un término de raíz griega, derivado de la palabra “pteron”, que significa ala. Este término se propuso para denominar al sistema de anillos condensados pirazino-(2-3) pirimidino.

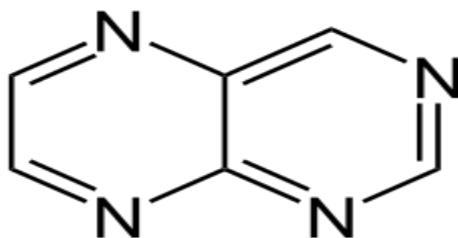


Figura 22.- Estructura de la pteridina (64).

En el experimento descrito por Zhu (65), se hicieron crecer en hígado de cerdo moscas adultas de *C. megacephala* que se reprodujeron para tener una nueva camada de moscas a diferentes condiciones que fueron; 16°C, 20°C, 24°C, 28°C y 32°C, con un periodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Las muestras empleadas en el experimento fueron tomadas en intervalos de 3 días durante 30 días, después de colectadas las muestras se congelaron a -70°C.

A continuación, se describe con detalle la metodología empleada en este artículo.

8.3.1- Metodología del estudio por fluorescencia de pteridina.

- 1- Tener las moscas para realizar el estudio.
- 2- Retirar la cabeza a las moscas
- 3- Adicionar 4mL de amortiguador Tris -HCl pH=8.0 (por cada cabeza analizada)
- 4- Centrifugar a 10000rpm durante 4 minutos
- 5- Medir el sobrenadante en el espectrofluorímetro para obtener el nivel de nivel de fluorescencia de pteridina en la cabeza (HPF por sus siglas en inglés) de una mosca adulta

Se estimó su edad con las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Las hembras: } \mathbf{FP} &= \mathbf{e_f} + (\mathbf{t} - \mathbf{a_f}) \mathbf{d_f r_f}, \\ \text{para los machos: } \mathbf{MP} &= \mathbf{e_m} + (\mathbf{t} - \mathbf{a_m}) \mathbf{d_m r_m} \text{ donde:} \end{aligned}$$

Donde:

F= moscas hembras.

M= moscas macho.

P = nivel de HPF medido como fluorescencia.

e = media de los niveles de HPF de 0 días de edad moscas (es decir, la media de las intersecciones de diferentes ecuaciones de regresión lineal entre el nivel de HPF y edad a diferentes temperaturas constantes).

t = media de la temperatura ambiente del tiempo muestreado al posible tiempo de eclosión.

a_f = límite de temperatura umbral para la producción de pteridina en moscas.

d = edad post eclosión en días para moscas.

r = tasa de acumulación de pteridina por 1 ° C por día para las moscas.

Otro modelo matemático para hacer la estimación de las edades es el siguiente:

$$\begin{aligned} \mathbf{FP_i} &= \mathbf{e_f} + \sum \mathbf{FV_i} \\ \mathbf{MP_i} &= \mathbf{e_m} + \sum \mathbf{MV_i} \end{aligned}$$

Donde:

P = nivel de HPF medido como fluorescencia al tiempo i (horas o días).

V= tasa de acumulación de pteridina por 1 ° C por día u horas para las moscas.

e = media de los niveles de HPF de 0 días de edad moscas (es decir, la media de las intersecciones de diferentes ecuaciones de regresión lineal entre el nivel de HPF y la edad a diferentes temperaturas constantes).

El último método para hacer este cálculo es el siguiente:

$$\begin{aligned} \mathbf{FP} &= \mathbf{e_f} + \mathbf{V_f d_f} \\ \mathbf{MP} &= \mathbf{e_m} + \mathbf{V_m d_m} \end{aligned}$$

Donde:

P = nivel de HPF medido como fluorescencia al tiempo *i* (horas o días).

V= tasa de acumulación de pteridina por 1 ° C por día u horas para las moscas.

e = media de los niveles de HPF de 0 días de edad moscas (es decir, la media de las intersecciones de diferentes ecuaciones de regresión lineal entre el nivel de HPF y edad a diferentes temperaturas constantes).

d = edad post eclosión en días para moscas.

Con estas ecuaciones se sacan las relaciones lineales entre la edad estimada (*y*) y la edad cronológica de las moscas (*x*). Para evaluar este método se hace una comparación estadística con el nivel de fluorescencia obtenido experimentalmente, con el nivel teórico que deberían presentar las moscas, para confirmar que no hay una diferencia significativa, se realiza un análisis ANOVA.

Al incorporar todos los datos para los métodos antes mencionados se obtienen las ecuaciones para la regresión lineal entre los niveles de pteridina (*Y*) y la edad de las moscas (*X*) a diferentes grados de temperatura, éstas se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4.- Ecuaciones de las regresiones lineales a diferentes grados de temperatura para hembras tomada de Zhu;2003 (65)

Temperatura (°C)	Ecuación de regresión lineal	r^2
16	Nivel de HPF= 8.82792 + 0.3939edad	0.8819
20	Nivel de HPF = 9.4313+ 0.4166edad	0.9076
24	Nivel de HPF = 9.4218+ 0.4639edad	0.8901
28	Nivel de HPF = 9.9455 + 0.6802edad	0.9357
32	Nivel de HPF = 9.3044 + 1.0961edad	0.9296

Tabla 5.- Ecuaciones de las regresiones lineales a diferentes grados de

temperatura para machos tomada de Zhu;2003 (65).

Temperatura (°C)	Ecuación de regresión lineal	r ²
16	Nivel de HPF = 8.0316 + 0.6333edad	0.9070
20	Nivel de HPF = 97851 + 0.7133edad	0.9095
24	Nivel de HPF = 9.2160 + 0.9249edad	0.9324
28	Nivel de HPF = 10.2488 + 1.3158edad	0.9518
32	Nivel de HPF = 10.0705 + 1.4796edad	0.9672

A continuación se muestran los gráficos obtenidos del experimento y las ecuaciones a 24°C, con los que se pueden estimar los días de vida de las moscas, hembras y machos, en función del contenido de pteridina contenido en las cabezas de las moscas.

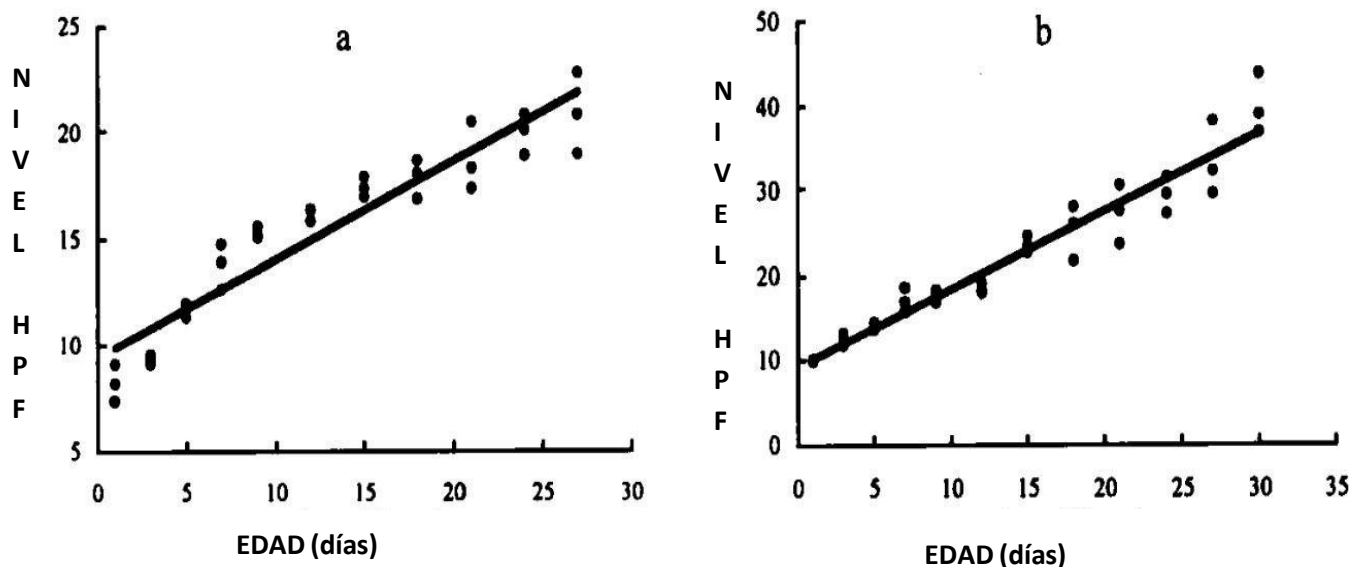


Figura 23.- Gráfico para la estimación de la edad a partir de los niveles de HPF en las cabezas de (a) hembras y (b) machos mediante la ecuación de regresión lineal a 24°C tomada de Zhu;2003 (65).

Con este experimento se demuestra que la estimación de la edad de las moscas es un poco más fácil, ya que, como ilustran los gráficos anteriores, solo se hace la relación del nivel de pteridina presente en los especímenes y se obtiene un estimado de los días que tendría el espécimen recolectado en la escena. En comparación con los otros métodos, en este no se obtiene un perfil o se busca un compuesto específico para obtener la edad de las moscas, solo con la medición de pteridina se obtiene el dato que se busca, además; tampoco requiere una preparación compleja de la muestra para hacer la medición de pteridina de las moscas teniendo así un método más sencillo en la preparación y obtención del resultado requerido.

9-Discusión

Los métodos quimiotaxonómicos permiten identificar y datar la edad de los insectos, con lo que se puede determinar el intervalo post mortem sin seguir el método clásico (dejar crecer a los insectos y hacer una identificación bajo el microscopio). Como ya se revisó anteriormente, los análisis expuestos en este escrito cumplen con el objetivo de poder determinar la especie de insecto y el tiempo que un cuerpo lleva expuesto en la intemperie gracias a la datación que también se puede llevar a cabo sin tomar tanto tiempo para realizar el análisis para obtener un resultado, pues principalmente se trabaja con larvas y pupas de las moscas.

Para hacer la estimación del IPM por los métodos que emplean la cromatografía de gases es necesario conocer el ciclo de vida de las especies encontradas, por lo que su correcta identificación es sumamente importante. Como ejemplo se tomará a la mosca *Lucila Sericata* que tiene un ciclo de vida de 35 días, donde su estado de huevo dura un día, su estadio larval 12 días, su estadio de pupa 10 días; entonces si se recolecta una pupa que mediante el análisis de hidrocarburos cuticulares se identifica como la especie de *Lucila Sericata*, al obtener esta información junto con el ciclo de vida se estima que el cuerpo encontrado puede tener 14 a 23 días.

Los métodos más empleados para reducir el tiempo de análisis sin dejar crecer al insecto hasta su forma adulta, son los que emplean la cromatografía de gases acoplada a masas, y presentan una gran ventaja sobre el análisis que se realiza con pteridina, pues estos experimentos se pueden realizar al llegar al laboratorio con los especímenes recolectados, en contra parte, el análisis que se hace mediante el nivel de pteridina en los ojos de las moscas necesita dejar crecer el insecto hasta su forma adulta para llegar al resultado final esto puede tardar días o semanas, dependiendo en qué fase se encuentre el insecto recolectado en la escena. Aunque cabe mencionar que en el caso del análisis de los compuestos orgánicos volátiles, también hay que dejar un tiempo específico para hacer la micro extracción en fase solida (SPME).

Los análisis entomológicos se ven afectados por diversos factores como: el clima de la región donde fue encontrado el cadáver, qué tan expuesto estaba a la intemperie o si fue en un espacio cerrado de difícil acceso a los insectos. La temperatura en donde están creciendo los insectos es el factor más importante, pues afecta el crecimiento y la eclosión de los mismos. Una vez que se conoce la especie, temperatura y el estadio del insecto, se puede determinar el tiempo que el insecto lleva en el cadáver, mediante los análisis mencionados y, por ende, hacer la estimación del intervalo postmortem; con lo que se hace notar que cumplen el propósito de poder obtener una fecha relativa del tiempo del cadáver.

El análisis más realizado y estudiado es el de los hidrocarburos cuticulares ya que estos hidrocarburos funcionan como una “huella digital” de cada especie (como se puede observar en la Tabla 2, del presente trabajo), hay compuestos que solo están presentes en ciertas especies y por lo tanto son característicos de ellas. Conociendo los compuestos de cada especie se puede contrastar con la información de las tablas y realizar la identificación correcta de los especímenes encontrados en el cuerpo.

Para el análisis de hidrocarburos cuticulares solo se necesitan las muestras en cuestión, por lo que se requiere hacer una extracción con un solvente orgánico e inyectar al cromatógrafo, cabe señalar que esta es la técnica más fácil de realizar en un laboratorio. Posteriormente, se identifican y cuantifican los compuestos a partir de cada cromatograma obtenido, se hace la comparación del perfil de hidrocarburos cuticulares obtenidos y finalmente la identificación.

Otra ventaja del análisis de hidrocarburos cuticulares es que se pueden utilizar pupas dañadas que ya han sido abandonadas por el imago y aun así se puede obtener un perfil de hidrocarburos cuticulares para esa especie, realizando la identificación y datación por igual.

La identificación por compuestos orgánicos volátiles también se puede hacer en cuanto llegan los dípteros al laboratorio, pero se les tiene que hacer un paso de preparación de la muestra que no se hace para obtener el perfil de hidrocarburos cuticulares, sin embargo, este paso sirve para realizar una mejor extracción de

estos analitos y poder obtener mejores resultados a fin de una correcta identificación de las especies.

Algunas desventajas que tienen tanto el análisis de hidrocarburos cuticulares como el de los compuestos orgánicos volátiles son:

- ✓ Necesidad de tener una biblioteca para la identificación de los compuestos
- ✓ Necesidad de crear una base de datos para tener el perfil de cada especie y poder hacer la comparación y búsqueda de los compuestos específicos para realizar la identificación y datación.

Otra limitante a considerar en los compuestos orgánicos volátiles es que no está tan estudiada esta técnica, por lo tanto, se tendría que dar conocer más para que se estudie con la misma recurrencia que los hidrocarburos cuticulares.

El análisis por fluorometría tiene un inconveniente, al igual que la identificación morfológica al microscopio, pues se debe dejar llegar a la etapa de imago de la mosca; sin embargo, su técnica es sencilla, pues se obtienen las cabezas de los adultos, la muestra se homogeniza y centrifuga, para después hacer la lectura al espectrofluorímetro y con el resultado y las ecuaciones pertinentes obtener la edad de los insectos. El tratamiento de los datos se vuelve laborioso ya que se tiene que realizar estadística a fin de conseguir la ecuación de la especie; la temperatura a la que fue encontrada la muestra es necesaria para la medición realizada y se pueda interpolar en la gráfica, brindando el resultado de cuántos días pudo haber estado expuesto el cuerpo a la intemperie.

Para poder seguir este modelo matemático del análisis por fluorescencia y ponerlo en práctica, primero se tendría que realizar el mismo análisis con las condiciones de la región donde se desea poner en práctica ya que los factores van a variar dependiendo la zona geográfica y esto impacta en el ciclo de vida de las especies.

Como se mencionó en la introducción, también se pueden realizar análisis más específicos y puntuales para conocer la edad de las especies, una vez obtenida la correcta identificación, el siguiente paso es identificar la abundancia de los compuestos o continuar buscando algún compuesto específico del perfil de

hidrocarburos cuticulares en la edad correspondiente, según el resultado del análisis. Estos análisis al no ser subjetivos o requerir de una experiencia notable en el área, aportan información más exacta sobre la especie y en qué día de su fase de crecimiento exactamente se encontró en el cuerpo, para así obtener una datación más precisa. Entonces no es necesario ser un entomólogo experto en morfología para poder decir que especie estoy analizando.

Algunas ventajas de estos análisis quimiotaxonómicos son:

- ✓ Las metodologías sencillas de realizar.
- ✓ Los tiempos de análisis cortos.
- ✓ Es posible estimar la edad de las larvas además de la identificación de la especie.

En los análisis que se ocupa la cromatografía se puede realizar la identificación de las especies junto con la datación en las mismas, en cambio en el análisis por medio del espectrofluorímetro solo se hace una datación, pero es importante tener primero la identificación de la especie junto con la temperatura en la que se encontró la especie para realizar la estadística pertinente y tener la estimación del IPM con precisión.

Otro factor relevante para cada laboratorio que se dedica a las investigaciones forenses, es el costo para realizar dichos análisis; que son más económicos en comparación con los análisis genéticos propuestos para poder obtener las secuencias de genes para cada especie y con ello, la identificación. Sin embargo, el costo de emplear esta técnica es muy alto para poder hacer la verificación de la identificación del espécimen. De esta forma la alternativa existente es hacerlo mediante análisis quimiotaxonómicos que tienen un costo más accesible que el de un análisis genético, optando por los hidrocarburos cuticulares, debido a que es la técnica más estudiada y la que conlleva un menor número de pasos para poder obtener un resultado, y con ello el intervalo *post mortem*.

10- Conclusiones.

- ✓ Se realizó una revisión bibliográfica sobre métodos quimiotaxonómicos para la identificación y datación de moscas de interés forense, encontrándose técnicas que pueden resultar más sencillas, precisas y económicas que las empleadas actualmente.
- ✓ Los métodos descritos son fáciles de realizar en un laboratorio y los más rápidos son los que emplean la cromatografía como técnica de análisis.
- ✓ Una limitante de los métodos de hidrocarburos cuticulares y de los compuestos orgánicos volátiles es el uso de las bibliotecas para realizar las comparaciones ya sea sobre el perfil de compuestos presentes en una especie o identificar un compuesto que solo esté presente en una sola especie.
- ✓ Al realizar este trabajo se dan a conocer estas técnicas en el ámbito forense para que sean mayormente empleadas en los laboratorios que se dediquen a esta rama y sean de utilidad para estimar el intervalo *post mortem* de manera eficiente y precisa.

11-Referencias

- 1-Petit A. La Importancia de la Entomología en la Investigación Criminal.s.f.
Anuario del Instituto de Derecho Comparado. Venezuela
- 2-Jiménez P, Resumen G .Entomología Forense. Universidad Miguel Hernández 2015. España
- 3-Flores, L. Sucesión de la entomofauna cadavérica a partir de un biomodelo con vísceras de res. Colegio de Postgraduados 2004 Tesis Dr [Internet]. [citado el 30 de octubre de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/264552135_Sucesion_de_la_entomofauna_cadaverica_a_partir_de_un_biomodelo_con_visceras_de_res
- 4-Capó MA, Peinado M V, Mateos J, Anadón Baselga MJ.
Entomofauna cadavérica establecida al aire libre. Med Balear. 2004;19:29–38.
- 5-Jones N, Whitworth T, Marshall SA. Blow flies of North America: Keys to the subfamilies and genera of Calliphoridae, and to the species of the subfamilies Calliphorinae, Luciliinae and Chrysomyinae. Canadian J Arthropod Identif. 2019;39(39) :1-9
- 6-Calle. M. Efecto en el ciclo vital de Dipteros de importancia médico legal en cadáveres de *Cavia porcellus* (conejo cuy) fallecidos por organofosforados y diazepam en la ciudad de Cochamba Bolivia Tesis 2009
- 7- Oliva A. Avispas parasitoides (himenópteros) de puparia de moscas sarcosófago (Diptera: *Calliphoridae*; *Sarcophagidae*) en Buenos Aires, Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 67; 3-4 [Internet]. [citado el 15 de enero de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/228764140_Parasitoid_wasps_Hymenoptera_from_puparia_of_sarcosaprophagous_flies_Diptera_Calliphoridae_Sarcophagidae_in_Buenos_Aires_Argentina
- 8-Meiklejohn KA. Taxonomia y sistematica de la Australiana *Sarcophaga s.l.* (Diptera: *Sarcophagidae*) Universidad de Wollongong 2012[Internet]. [citado el 15 de enero de 2020]. Disponible en: <http://ro.uow.edu.au/theses/3729>

- 9-ADW: Sarcophagidae: FOTOS s.f. [Internet]. [citado el 13 de enero de 2020]. Disponible en: <https://animaldiversity.org/accounts/Sarcophagidae/pictures/>
- 10-Joseph I, Mathew DG, Sathyan P, Vargheese G. The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *J Forensic Dent Sci* 2011; 88-91 [Internet]. [citado el 30 de septiembre de 2019];3(2):89 - 91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22408328>
- 11- Viero A, Montisci M, Pelletti G, Vanin S. Crime scene and body alterations caused by arthropods: implications in death investigation. *Int J Legal Med* [Internet]. enero de 2019 [citado el 30 de septiembre de 2019];133(1):307– 16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29938388>
- 12- Michan, L Llorente , J. Hacia una historia de la entomología en México. B. Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artropodos de México; Hacia una síntesis de su conocimiento 2002 [Internet]. [citado el 9 de marzo de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286337422_Hacia_una_historia_de_la_entomologia_en_Mexico
- 13-González M. Estudio de la entomofauna cadavérica .UIB 2012. España:5-25
- 14- Zamira S, Vanegas Bióloga Y. Entomología forense : Los insectos en la escena del crimen. Luna Azul [Internet]. 2007 [citado el 10 de diciembre de 2019]. Disponible en: http://lunazul.ucaldas.edu.co/index2.php?option=com_content&task=view&id=312&Ite...
- 15-Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJR. Forensic entomology: Applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol.* 2011;7(4):379–92.
- 16-Paula MC, Michelutti KB, Eulalio ADMM, Piva RC, Cardoso CAL, Antonialli-Junior WF. New method for estimating the post-mortem interval using the chemical composition of different generations of empty puparia: Indoor cases. *PLoS One.* 2018;13(12):1–13.

- 17-Camacho, G. Sucesión de la entomofauna cadavérica y ciclo vital de *Calliphora vicina* (Diptera: *Calliphoridae*) como primera especie colonizadora, utilizando cerdo blanco (*Sus scrofa*) en Bogotá. Revista Colombiana de Entomología 2005 31(2)189-197 [Internet]. [citado el 31 de octubre de 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-04882005000200014
- 18-Zamira, S. Vanegas, Y. Evidencia entomológica: Insectos en la escena del crimen Universidades Pedagógica y Tecnológica de Colombia 2006 [Internet]. [citado el 30 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.forensicmag.com/article/2015/12/entomological-evidence-insects-crime-scene>
- 19- Magaña ,C.Entomología Forense y su aplicación a la medicina legal Aracnet 7 -Bol. S.E.A., nº 28 (2001) : 49—57 [Internet]. [Citado.do el 30 de octubre de 2019]. Disponible en: <http://entomologia.rediris.es/aracnet/7/06forense/20-> De Carvalho CJB, De Mello-Patiu CA. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. Rev Bras Entomol. Septiembre de 2008;52(3):390–406.
- 21-Whitworth T. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of America north of Mexico. Proceedings of the Entomological Society of Washington. 2006. (108) 689–725.
- 22-Chimeno C, Morinière J, Podhorna J, Hardulak L, Hausmann A, Reckel F, et al. DNA Barcoding in Forensic Entomology – Establishing a DNA Reference Library of Potentially Forensic Relevant Arthropod Species. J Forensic Sci. el 1 de marzo de 2019;64(2):593–601.
- 23-Charabidze D, Gosselin M, Hedouin V. Use of necrophagous insects as evidence of cadaver relocation: myth or reality? PeerJ 2017 [Internet]. [citado el 30 de septiembre de 2019]Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785513>

- 24-Moore HE, Adam CD, Drijfhout FP. Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. 2014;240:48–53 *Forensic Sci Int* [Internet].. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.04.002>
- 25- Kranz W, Carroll C, Dixon DA, Goodpaster J V., Picard CJ. Factors affecting species identifications of blow fly pupae based upon chemical profiles and multivariate statistics. *Insects*. el 1 de junio de 2017;8(2).
- 26- Paredes E, Gabriel M. Quimiotaxonomía de *Triatoma longipennis* por Análisis de Hidrocarburos 2009 [Internet]. [citado el 13 de enero de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/275036150_Quimiotaxonomia_de_Triatoma_longipennis_por_Analisis_de_Hidrocarburos_Cuticulares_Chemotaxonomy_of_Triatoma_longipennis_by_Analysis_of_Cuticular_Hydrocarbons
- 27- Gullan P.J CP. *The Insects: an outline of entomology*. Wiley-Blackwell. 2010.
- 28- Bereiter -Hahn, J. Maltosty ,A.G. *Biology of the Integument: Invertebrates*(1984) ed Springer-Verlag - Google Libros [Internet]. [citado el 25 de noviembre de 2019]. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=oV7vCAAQBAJ&pg=PA685&lpg=PA685&dq=cuticle:Ecological+significance+hadley&source=bl&ots=Xq3mGhMKCo&sig=ACfU3U1oheBk2rp0IWj_3OjBX4NN2aoCA&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewjKxqug4YbmAhXoHzQIHf7dB4cQ6AEwBnoECACQAQ#v=onepage&q=cuticle%3AEcological%20significance%20hadley&f=false
- 29- Peralta R, Robledo NR. Fisiología, Toxicología y Biología molecular Identificación del perfil de hidrocarburos cuticulares de *Toxotrypana curvicauda* (Diptera : Tephritidae). *Entomologia Mexicana*, 5. 2018 546-551
- 30-Vrkoslav V, Muck A, Cvačka J, Svatoš A. MALDI Imaging of Neutral Cuticular Lipids in Insects and Plants. *J Am Soc Mass Spectrom*. febrero de 2010;21(2):220–31. 31-Pavković-Lučić S, Miličić D, Lučić L. Insect Hydrocarbons. *Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* edited by Gary J. Blomquist, Anne- Geneviève Bagnères. *Insect Sci*. diciembre de 2012;19(6):703-4.

- 32-Piera, AJ . Entomologia Forense s.f. [Internet] Disponible en : <http://www.luciabotin.com/publicaciones/entomologiaforense.pdf>
- 33-Iupac. IUPAC Gold Book - chromatography. 2014 [citado el 25 de noviembre de 2019]; Disponible en: <http://iupac.org/goldbook/C01075.pdf>
- 34-Braithwaite A. Chromatographic Methods 5th ed - A. Braithwaite, F. Smith (Kluwer, 1996) WW.pdf.
- 35-Heftmann. E Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related (2004). Elsevier 6th ed... - Google Libros [Internet]. [citado el 25 de noviembre de 2019]. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=BOlzy9W6l6oC&pg=PR3&lpg=PR3&dq=fundamental+and+applications+of+chromatography+and+related+migration+methods&source=bl&ots=BVyGWf2Kf0&sig=ACfU3U32TsYEK-Bc5leaOm9bUslSoH26g&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwinyIXC6YbmAhUFjQIHag7BI84ChDoATABegQIChAB#v=onepage&q=fundamental and applications of chromatography and related migration methods&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=BOlzy9W6l6oC&pg=PR3&lpg=PR3&dq=fundamental+and+applications+of+chromatography+and+related+migration+methods&source=bl&ots=BVyGWf2Kf0&sig=ACfU3U32TsYEK-Bc5leaOm9bUslSoH26g&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwinyIXC6YbmAhUFjQIHag7BI84ChDoATABegQIChAB#v=onepage&q=fundamental%20and%20applications%20of%20chromatography%20and%20related%20migration%20methods&f=false)
- 36- Theory and Instrumentation of GC Introduction. Crawford Scientific s,f, [Internet]. [citado el 25 de noviembre de 2019]. Disponible en: www.chromacademy.com
- 37-Mendoza E. Métodos de separación.s.f UNAM
- 38-Zhu GH, Xu XH, Yu XJ, Zhang Y, Wang JF. Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. Forensic Sci Int. 2007;169(1):1–5.
- 39-Klaus T. Höfner G. Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Wiley-vch. 200
- 40-Museo nacional de ciencias naturales. Espectometria de masas s.f [Internet]. [citado el 30 de mayo de 2019]. Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf

- 41-Espectrometría de masas Fundamentos y Teoría. Agilent [Internet]. 2016 [citado el 29 de abril de 2019]. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/59915857_Agilent_MS_Theory_ES.pdf
- 42-Plascencia G. Espectrometría de Masas UNAM. 2003
- 43-Martínez, M. Moctezuma, C. Sotock, R. Métodos Físico-químicos en Biotecnología Espectrofluorimetría. UNAM. 2006
- 44-J.J Skoog D.;L. Espectrometría De Fluorescencia Molecular. 1994;
- 45-Bala M, Sharma A. Review of some recent techniques of age determination of blow flies having forensic implications. Egypt J Forensic Sci [Internet]. 2016;6(3):203–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.002>
- 46-Braga MV, Pinto ZT, de Carvalho Queiroz MM, Matsumoto N, Blomquist GJ. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Puparial cases from Sarcophagidae. Acta Trop [Internet]. 2013;128(3):479– 85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.014>
- 47-Lockey KH. Insect hydrocarbon classes: Implications for chemotaxonomy. Insect Biochem. 1991;21(1):91–7.
- 48-Tomson EC, Kuper-simbron R. Laboratory evolution of epicuticular permeability in *Drosophila Pseudoobscura*: Effects on sexual dimorphism and thermal-acclimation ability 1988;(October 1984).
- 49-Ye G, Li K, Zhu J, Zhu G, Hu C. Cuticular Hydrocarbon Composition in Pupal Exuviae for Taxonomic Differentiation of Six Necrophagous Flies. J Med Entomol. 2007;44(3):450–6.
- 50-Lockey KH. Insect hydrocarbon chemotaxonomy: Cuticular hydrocarbons of adult and larval epiphysa species blanchard and adult *Onymacris unguicularis* (HAAG) (tenebrionidae: Coleoptera). Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem. 1992;102(3):451–70
- 51-Zhu GH, Ye GY, Hu C, Xu XH, Li K. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: Potential for determining larval age. Med Vet Entomol. 2006;20(4):438–44.

- 52- Moore HE, Adam CD, Drijfhout FP. Potential use of hydrocarbons for aging *Lucilia Sericata* blowfly larvae to establish the postmortem interval. *J Forensic Sci.* 2013;58(2):404–12
- 53-Pechal JL, Moore H, Drijfhout F, Benbow ME. Hydrocarbon profiles throughout adult *Calliphoridae* aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014; 245:65–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.10.019>
- 54-Xu H, Ye GY, Xu Y, Hu C, Zhu GH. Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: *Calliphoridae*). *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014; 242:236–41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.07.003>
- 55-Braga MV, Pinto ZT, de Carvalho Queiroz MM, Blomquist GJ. Effect of age on cuticular hydrocarbon profiles in adult *Chrysomya putoria* (Diptera: *Calliphoridae*). *Forensic Sci Int* [Internet]. 2016;259:e37–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.11.006>
- 56-Bala M, Sharma A. Review of some recent techniques of age determination of blow flies having forensic implications. *Egypt J Forensic Sci* [Internet]. 2016;6(3):203–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.002>
- 57-Golebiowski M, Urbanek A, Oleszczak A, Dawgul M, Kamysz W, Boguś MI, et al. The antifungal activity of fatty acids of all stages of *Sarcophaga carnaria* L. (Diptera: *Sarcophagidae*). *Microbiol Res.* abril de 2014;169(4):279–86.
- 58-Cerkowniak, M.; Stepnowski P., Golebiowski, M.; Bogus, M.; Wloka, E.; Przybysz E. Developmental Changes in the Sterol Composition and the Glycerol Content of Cuticular and Internal Lipids of Three Species of Flies pressures and may directly or indirectly effect the survival of insects. The lipids have example, during the autumn, the. *Chem Biodivers.* 2013;10:1521–30.
- 59-Rainey CL, Bors DE, Goodpaster J V. Design and optimization of a total vaporization technique coupled to solid-phase microextraction. *Anal Chem.* 2014;86(22):11319–25.

- 60-Gyö G, Vas G, Aroly K, Ekey V. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J Mass Spectrom* [Internet]. 2004 [citado el 5 de febrero de 2020];39:233–54. Disponible en: www.interscience.wiley.com
- 61-Mottaled, MA. Microextracción en fase sólida (SPME) y su aplicación a productos naturales [Internet] 2014. [citado el 5 de febrero de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/282669951_Solid-Phase_Microextraction_SPME_and_Its_Application_to_Natural_Products
- 62-Mejia, R. Análisis de pesticidas organofosforados en muestras biológicas por microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) 2017
- 63-Frederickx C, Dekeirsschieter J, Brostaux Y, Wathelet JP, Verheggen FJ, Haubruge E. Volatile organic compounds released by blowfly larvae and pupae: New perspectives in forensic entomology. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2012;219(1–3):215–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.01.007>
- 64-Thomas, AH Características químicas del ácido fólico y las pterinas. 2001
- 65-Zhu G, Ye G, Hu C. Determining the adult age of the oriental Latrine fly, by pteridine fluorescence analysis *Chrysomya Megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Vol. 10, Entomologia Sinica

