UNIVERSIDAD DE ESPECIALIDADES ESPÍRITU SANTO

FACULTAD DE POSTGRADO

TÍTULO:

"ANÁLISIS ENTOMOTOXICOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DIAZEPAM POR INMUNOENSAYO QUIMIOLUMINISCENTE COMPETITIVO EN CADÁVERES DE COBAYOS EN LA CIUDAD DE MACHALA EN EL MES DE AGOSTO DEL 2022 Y SU APLICACIÓN EN EL CAMPO FORENSE ECUATORIANO."

TRABAJO DE TITULACIÓN QUE SE PRESENTA COMO REQUISITO PREVIO A OPTAR EL GRADO DE

MAGÍSTER EN CRIMINALÍSTICA Y CIENCIAS FORENSES

AUTORES:

BQF. HENRY JOSE ERAZO JAYA

ING. STALIN MAURICIO HOYOS ARIAS

TUTOR:

Mg. SANTIAGO ALEJANDRO ORTEGA GOMERO

SAMBORONDÓN, SEPTIEMBRE DE 2024

Análisis entomotoxicológico para la determinación de diazepam por inmunoensayo quimioluminiscente competitivo en cadáveres de cobayos en la ciudad de Machala en el mes de agosto del 2022 y su aplicación en el campo forense ecuatoriano.

Resumen

Actualmente la entomotoxicología se encuentra en proceso de desarrollo con miras a ser una subdisciplina de la entomología con mayor aplicación en el campo forense, por su acertada inclusión en los procesos de análisis toxicológicos, siendo una alternativa viable a los métodos convencionales. En los últimos años, las investigaciones se han enfocado en explotar esta rama, buscando alcanzar objetivos como la determinación de la causa de muerte mediante el tratamiento de los insectos como medio alternativo para el análisis toxicológico cuando no se dispone de matrices biológicas idóneas, debido a cadáveres que no son encontrados a tiempo y en avanzado estado de descomposición. Por lo que la presente investigación se llevó a cabo con el fin de determinar si la droga diazepam puede ser extraída de larvas provenientes de cadáveres de cobayos que anteriormente fueron suministrados con esta sustancia. Este experimento se logró administrando diazepam a los animales en dosis tóxicas de 240 mg/kg. Una vez alcanzado la putrefacción, se recolectó una cantidad suficiente de larvas, se realizó el proceso de extracción y se analizó mediante inmunoensayo quimioluminiscente competitivo. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el diazepam puede detectarse con éxito mediante técnicas de inmunoensayo quimioluminiscente competitivo**,** demostrando que este tipo de droga puede extraerse y detectarse a partir de muestras de larvas, y a la vez corroborando a la entomotoxicología como una pericia útil para fines de toxicología forense dentro de las investigaciones criminales.

Palabras clave: Entomotoxicología forense, larvas de mosca, diazepam, cadáveres en descomposición, inmunoensayos quimioluminiscentes.

Entomotoxicological analysis for the determination of diazepam by competitive chemiluminescent immunoassay in guinea pig corpses in the city of Machala in the month of August 2022 and its application in the Ecuadorian forensic field.

Abstract

Currently, entomotoxicology is in the process of development with a view to being a subdiscipline of entomology with greater application in the forensic field, due to its successful inclusion in toxicological analysis processes, being a viable alternative to conventional methods. In recent years, research has focused on exploiting this branch, seeking to achieve objectives such as determining the cause of death through the treatment of insects as an alternative means for toxicological analysis when suitable biological matrices are not available, due to corpses that are not found in time and in an advanced state of decomposition. Therefore, the present investigation was carried out in order to determine if the drug diazepam can be extracted from larvae from the corpses of guinea pigs that were previously supplied with this substance. This experiment was achieved by administering diazepam to the animals at toxic doses of 240 mg/kg. Once putrefaction was reached, a sufficient number of larvae were collected, the extraction process was carried out and analyzed by competitive chemiluminescent immunoassay. The results obtained allowed us to conclude that diazepam can be successfully detected using competitive chemiluminescent immunoassay techniques, demonstrating that this type of drug can be extracted and detected from larval samples, and at the same time corroborating entomotoxicology as a useful expertise for the purposes of forensic toxicology within criminal investigations.

Keywords: Forensic entomotoxicology, fly larvae, diazepam, decomposing corpses, chemiluminescent immunoassays.

Introducción

La obtención de evidencia biológica para análisis de drogas o tóxicos en cadáveres en descomposición viene siendo un problema muy latente en estos tipos de casos dentro del ámbito forense, ya que en la práctica habitual del análisis toxicológico de dichas muestras suelen presentar inconvenientes en la detección e identificación de las drogas o tóxicos, ya sea por los mecanismos metabólicos que se producen en la putrefacción dando lugar a nuevas drogas o la degradación de estas.

Por tal motivo, esta investigación es importante por su relevancia práctica en la determinación entomotoxicológica de drogas de abuso en cadáveres de animales y su aplicación en las ciencias forenses, pudiendo ser una alternativa práctica en la recolección de evidencias biológicas provenientes de cadáveres en avanzado estado de putrefacción cuando las mismas son de difícil obtención o no son idóneas para un análisis de laboratorio. Asimismo, esta investigación forma un precedente en la importancia de la entomotoxicología forense en el Ecuador.

La entomotoxicología se refiere a la aplicación del análisis toxicológico a los insectos que se encuentran en los cadáveres (larvas), para identificar la presencia de drogas, fármacos o tóxicos en los tejidos o restos cadavéricos. Esta rama de la entomología a pesar que lleva varias décadas formulada hasta la actualidad no ha sido bien desarrollada y aplicada de manera exclusiva en las prácticas forenses, existiendo elementos limitantes como equipos apropiados para un buen análisis instrumental, sobre todo en países en vías de desarrollo.

El objetivo de la presente investigación fue realizar un análisis entomotoxicológico de drogas de abuso en muestras de larvas provenientes de cadáveres de animales (cobayo), cuyo propósito fue la determinación de drogas de abuso en las larvas de cadáveres de animales y su aplicación en las ciencias forenses.

En esta investigación se analizó los resultados de los hallazgos encontrados de diferentes investigaciones entomotoxicológicas de drogas en cadáveres de animales mediante una investigación de enfoque cuantitativo aplicando métodos experimentales a través de un equipo inmunoanalizador semi automatizado *Evidence Investigator* (Randox®) que utiliza el principio de la reacción de quimioluminiscencia directa con anticuerpos de captura.

Los resultados obtenidos con esta investigación además de determinar entomotoxicológicamente drogas de abuso en cadáveres de animales y su aplicación en las ciencias forenses, es la expansión en el Ecuador de la entomotoxicología forense, incorporando estudios

que indagan la aplicación y desarrollo de esta rama para determinar su precisión y utilidad a nivel local o regional en diferentes escenarios en los que los insectos son la mayor fuente de evidencia para el análisis cuando las muestras convencionales no pueden ser tomadas por la degradación de los cuerpos.

Con la presente investigación se pretende aportar a la importancia de la entomotoxicología forense realizando un análisis toxicológico para extraer y detectar la benzodiacepina diazepam desde larvas de especímenes necrófagos muestreados de manera indiscriminada (sin clasificar las especies) y utilizando un método analítico de inmunoensayo competitivo con detección por quimioluminiscencia.

En la presente investigación se realizó un estudio de tipo experimental con enfoque cualitativo mediante métodos y técnicas experimentales a través de un equipo inmunoanalizador semi automatizado *Evidence Investigator* (Randox®) que utiliza el principio de la reacción de quimioluminiscencia directa con anticuerpos de captura.

Marco Teórico

La entomotoxicología forense es la unión de dos ramas de las ciencias forenses por un lado la entomología y por el otro la toxicología, la palabra entomotoxicología forense fue enunciado por Derrick Pounder en 1991, en donde manifiesta que la primera vez que se realizó un análisis toxicológico de los gusanos que descomponen el cuerpo humano lo hizo Beyer y sus colegas en 1980, comentaron que los agentes tóxicos encontrados en los gusanos estaban directamente relacionados con los tóxicos que se encontraban en los tejidos del cual se alimentaban las larvas y en base a esta relación y análisis cimentó las bases de los estudios entomotoxicológicos. Los estudios entomotoxicológicos son análisis bien fundamentados mediante varias investigaciones que determinan los fármacos presentes en las larvas de las moscas en sus diferentes estadios de desarrollo. (Gagliano-Candela y Aventaggiato, 2001)

Si bien la entomotoxicología no es una ciencia nueva, las publicaciones de nivel científico en investigación sobre esta área en el Ecuador son prácticamente nulas, lo que podría deberse a la falta de incentivo o iniciativa por parte de los diferentes entidades educacionales o gubernamentales para explotar estos temas ya que se necesita de mucha investigación de carácter científico para obtener la bibliografía suficiente que ayuden a identificar y analizar las diferentes situaciones en nuestro medio al referirse a que un cuerpo se puede descomponer de distinta forma

según el clima en cada región además los organismos colonizadores del cadáver también van a variar y para esto el Ecuador carece de bibliografía para correlacionar la acción de tóxicos o microorganismos en un cadáver en diferentes climas o regiones.

En el estudio forense para lograr determinar la manera de muerte en cadáveres con sospecha de intoxicación en avanzado estado de descomposición, el estado en el que se encuentre un cadáver desempeña un papel preponderante, es así como los investigadores al localizar cadáveres que se encuentran en estado de putrefacción o esqueletización (Basilicata et al., 2019) deben basar sus estudios en los insectos como una fuente de evidencia complementaria a los estudios realizados (Aly et al., 2023).

Si bien las muertes por abuso de drogas, insecticidas, pesticidas y otras toxinas no se encuentran dentro de las principales causas de muertes es común que ocurran en forma esporádica y continua en todo el mundo; al encontrar estos cadáveres en putrefacción con sospecha de algún tipo de intoxicación las larvas o insectos que se encuentren en el cadáver serán quienes ayuden a encontrar los tóxicos presentes y serán una guía para determinar la causa de muerte (De Andrade Silva et al., 2022). En un trabajo de revisión manifiesta que aproximadamente 450 000 personas fallecieron a nivel mundial por el abuso de drogas en 2015; además manifiesta que cerca 800,000 personas mueren cada año por suicidio, de las cuales el 20% (1,600) por pesticidas y que comúnmente es estos casos son personas aisladas en la cuales los cuerpos se recuperan varios días o semanas después, en la cual la entomotoxicología es el estudio óptimo para ayudar a resolver este tipo de casos (Chophi et al., 2019).

El estudio de un cuerpo en putrefacción se torna complicado cuando no existen fluidos como sangre, humor vítreo, orina o tejidos y órganos que puedan ser analizados, por lo que los colonizadores encargados de degradar un cadáver expuesto forman la principal fuente alternativa para la investigación, ya que se encuentran en forma abundante y su recolección es relativamente sencillo (Gosselin et al., 2011, Badenhorst y Villet, 2018).

El desarrollo de los insectos va a estar directamente relacionado con la absorción, distribución, metabolismo y estabilidad de la droga, además se debe tener en cuenta que el desarrollo larvario de algunos tipos de moscas se puede ver afectado por la presencia de drogas como la benzodiacepina que causa aceleración o retraso en su desarrollo (Boulkenafet et al., 2020) igualmente de las condiciones medioambientales, por lo que son cuestiones que deben ser valorados (Rashid et al., 2008 , Charabidze et al., 2017).

Al alimentarse las larvas permanentemente de los diferentes tejidos y órganos que presenten sustancias tóxicas del cadáver, estas larvas pueden ser parte de la alimentación de otros insectos, por lo que se ha logrado determinar los mismos tóxicos presentes en otros artrópodos que se han alimentado de estas larvas. (Tabor et al., 2005). Así mismo, otros estudios han demostrado que las pupas de las larvas de estos artrópodos necrófagos permanecen intactas como una fuente de almacenamiento toxicológico para análisis durante un tiempo prolongado. (Bourel et al., 2001).

Estado del arte

Pozo (2021), en su trabajo de investigación "Entomotoxicología Forense en cadáveres en estado de descomposición" destaca la importancia de entomotoxicología forense como una herramienta importante en las ciencias forenses, mediante la cual se realizan análisis toxicológicos de insectos que se encuentran en los cadáveres en estado de descomposición avanzada, resultando imposible la recolección de muestras convencionales (sangre, orina, humor vítreo), para identificar algún tipo de droga o tóxico. Además refiere según sus estudios bibliográficos que los insectos son un instrumento de análisis fiable para la identificación de drogas y toxinas, para lo cual sugiere que en Ecuador se realicen estudios que coadyuven al desarrollo de esta rama de investigación con muestreos y experimentaciones de tipo local, provincial y regional que servirían de base y correlación para futuras investigaciones.

Un estudio realizado por Luna y Biagi (2020), titulado "Detección de cocaína en larvas de moscas: propuesta metodológica preliminar en el uso de larvas como matriz biológica alternativa en estudios toxicológicos post mortem (Master's thesis)", utiliza larvas de moscas para la detección de cocaína, las mismas que fueron criadas de forma artificial de un tipo de mosca Calliphoridae y Sarcophagidae las cuales fueron colocadas en hígados de bovino los mismos que tuvieron un tratamiento previo con cocaína en rangos teóricos de 0.05 – 10.00 mg/kg de hígado; luego para la fase analítica se utilizó 5 g de muestra(larvas) para el análisis con una estimación a detectar de cocaína de 0.75 ug/g de larvas. Para la obtención de las muestras de larvas que colonizaron los hígados se optó por utilizar agua caliente para sacrificar los especímenes para el estudio y lavar con abundante agua de grifo, para finalmente utilizar agua destilada y así eliminar algún tipo de contaminación por adherencia del sustrato. Para este estudio se realizó un análisis mediante GC/MS para una determinación cuantitativa de cocaína dando como resultado positivo en los lotes de hígado con concentraciones de 1.00 mg/kg, 5.00 mg/kg y 10.00 mg/kg, lo que conlleva a

ratificar la importancia de la entomotoxicología, por ende la utilización de los insectos que colonizan un cadáver para la determinación de drogas y tóxicos con resultados fehacientes que terminan por ayudar a dar una dirección a una investigación.

En otro estudio Estrada et al. (2020), realizan una investigación para la determinación de malatión en larvas de dípteros en México, para optimizar un método que ayudara a la detección y cuantificación de este plaguicida ya que según su estudio en México fallecen cerca de 1400 personas intoxicadas por plaguicidas, para este estudio se utilizó carne de cerdo, específicamente músculo en la cual se inocularon en relación a la dosis letal en humanos (DL) que es de 60g/60kg, se utilizó muestras y controles por triplicado en un ambiente natural controlado por una jaula para evitar que otros animales intervengan en el proceso, las muestras de larvas fueron recolectadas al cuarto día de exposición a la carne previamente tratada y fueron analizadas con un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), dando como resultado la detección de residuos de malatión en las larvas aun después de varios días de exposición, acompañado con otros estudios garantiza la eficiencia de los resultados que pueden ser utilizados en investigaciones judiciales en las que se sospeche que la causa de muerte esté relacionada con la intoxicación por este tipo de organofosforado, específicamente al malatión que fue el tema de estudio.

En Ecuador en el año 2022 Valera et al., realizó un "Estudio experimental sobre entomofauna cadavérica en Quito, provincia Pichincha, Ecuador", en donde se realizó una clasificación muy importante de los insectos por el orden, la familia y el género en distintas parroquia de esta ciudad, dando como resultado 15 familias de artrópodos directamente ligados al proceso de descomposición de un cadáver que para este caso fueron de animales en diferentes escenarios, lo que nos brinda un avance importante para las futuras investigaciones de la entomotoxicologia y su relación con los diferentes tipos de artrópodos que colonizan el cadáver y que pueden aportar un gran valor en las investigaciones de causas judiciales por su relación en nuestro tema de estudio entomotoxicologico para explorar más a fondo estas ramas de estudio forense en Ecuador.

Planteamiento del problema

Dentro del estudio para la determinación de la causa de muerte muchas veces el médico legista o los investigadores se encuentran con muchas barreras directamente relacionadas con el cadáver y el estado en el que se encuentra, es así que al localizar un cadáver en avanzado estado de descomposición o esqueletización las muestras convencionales que puedan ser extraídas para

los análisis como sangre, orina y humor vítreo van a ser nulas por los procesos tanatoquímicos y la degradación del cuerpo; es así que los únicos testigos mudos que pueden contribuir a la investigación es toda la entomofauna que participó en la degradación del cuerpo y los métodos o análisis que se realicen para la identificación de algún tipo de tóxico o droga en específico que se presuma estar relacionada con la causa de muerte.

¿Se puede realizar análisis entomotoxicológicos con los insectos que descomponen el cadáver para determinar drogas de abuso como el Diazepam por métodos de Inmunoensayo quimioluminiscente de forma cualitativa que contribuyan en la investigación de cadáveres en avanzado estado de descomposición?

Materiales y métodos

La investigación se realizó en la ciudad de Machala, provincia de El Oro, en el mes de agosto del año 2022, bajo un clima templado, precipitaciones leves y constantes, con una humedad promedio de 70% y temperatura de 24°C. Se utilizaron seis cobayos machos, *cavia porcellu*s (0.49-0.50 kg de peso). Los tratamientos se realizaron con la sustancia psicotrópica de la familia de las benzodiacepinas: Diazepam (Diazepam, ampolla de 10 mg/2ml). Se utilizó dosis tóxicas de 240 mg/kg (PubChem, 2024). Se administró por vía oral agua destilada a tres cobayos designados como controles negativos (B1, B2, B3). Los otros tres cobayos designados como prueba (D1, D2, D3) se les administraron la dosis tóxica de la droga mediante vía subcutánea ubicada en las extremidades. Se construyó una cerca de rejillas metálicas y cubierta de tela plástica (400x150x100 cm) y se colocaron los cobayos a 50 centímetros de distancia. Transcurridos ocho horas desde la administración, los cobayos tratados con dosis tóxicas murieron e inmediatamente los otros cobayos fueron sacrificados.

Recolección de las larvas

La recolección de las muestras se realizó ante la aparición de las primeras larvas. Los animales de control experimentaron la aparición de larvas a las 72 horas desde su sacrificio, mientras que los cuerpos de los cobayos de prueba manifestaron la aparición de larvas a las 120 horas desde su muerte. Se recogieron a una hora determinada durante tres días consecutivos desde varias partes del cuerpo del animal. Las muestras se colocaron en recipientes estériles y se

conservaron bajo congelación a -20 °C, sacrificándolas a través de muerte por congelamiento (Chophi et al., 2019; Gosselin et al., 2011) hasta su análisis toxicológico (Tabla 1).

Tabla 1

Larvas recolectadas de los cobayos sacrificados

Cobayo	Peso (g)	Tiempo de recolección desde la aparición de larvas (h)	Número de larvas promedio recolectadas	Peso total de larvas (g)
Blanco (B1)	494	72	223	11,15
Blanco (B2)	490	72	300	15,03
Blanco (B3)	501	72	241	12,08
Ensayo (D1)	501	120	186	6,23
Ensayo (D2)	498	120	181	6,05
Ensayo (D3)	497	120	174	5,83

B= Cobayos de control; D= Cobayos de prueba (240 mg/kg de diazepam)

Tratamiento de las muestras de larvas

Primero, se realizó un lavado de las larvas con agua potable y enjuague final con agua destilada, luego se secaron en papel absorbente. Para una correcta representatividad, las larvas fueron trituradas y homogeneizadas mediante un mortero. A continuación, la masa resultante se insertó en recipientes de plástico (50 ml), se agregó 15 ml de cloroformo y se homogeneizó mediante agitación vertical a 400 rpm durante 2 min. Por último, se lleva al proceso de sonicación por espacio de 30 minutos.

Se retiró cuidadosamente con una pipeta el sobrenadante y a éste se le agregó sulfato de sodio anhidro para purificar y limpiar el extracto. Luego, se filtró mediante un filtro de jeringa de 0.20 μm y se evaporó con nitrógeno (N2). Después de la evaporación y secado con N2, los residuos se reconstituyeron en 2 ml de solución buferada de dilución de muestras del kit de inmunoensayo

Dil-SPE (Randox®) y se transfirieron a frascos de viales (2 ml), se almacenaron en el congelador a -20 °C, hasta el momento del análisis en el inmunoanalizador automatizado.

Análisis instrumental

La detección e identificación del diazepam y sus metabolitos principales oxazepam y temazepam se realizó a través de un equipo inmunoanalizador semi automatizado *Evidence Investigator* (Randox®) que utiliza el principio de la reacción de quimioluminiscencia directa con anticuerpos de captura. La técnica corresponde a un inmunoensayo de unión competitiva en un biochip diseñado. Los antígenos libres en la muestra compiten con el analito (conjugado) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) por los sitios de unión en los anticuerpos policlonales inmovilizados en el biochip. El reactivo de señal, que concierne en una mezcla 1:1 de luminol y solución de peróxido, se agrega al biochip y produce una señal quimioluminiscente cuando el analito marcado con HRP se une a los sitios del anticuerpo. Las señales quimioluminiscentes se detectan mediante una cámara de carga acoplada (CCD), cuyas lecturas son comparadas con las señales de la curva de calibración. Se utilizó el kit de ensayo DOA ULTRA WB y para el aseguramiento de la calidad (QC) se utilizó el kit de controles de nivel 1 y nivel 2. A pesar de que los resultados del inmunoensayo se expresan en datos semicuantitativos, fueron considerados los términos de detectado/no detectado para el informe final, esto debido a las características de las matrices utilizadas.

Resultados

En los ensayos B1, B2 y B3 muestreados a las 72 horas se obtuvo un promedio total de 255 larvas, con un peso promedio total de 12.75 g y en los ensayos D1, D2 y D3 muestreados a las 120 horas se obtuvo un promedio total de 180 larvas, con un peso promedio total de 6.04 g. (Tabla 2).

Tabla 2

Promedio total de las larvas recolectadas de los cobayos sacrificados

Ensayo	Tiempo de recolección (h)	Número de larvas promedio	Peso de larvas (g)

B1, B2, B3	72	255	12.75
D1, D2, D3	120	180	6,04

Los resultados obtenidos del bioanalizador para determinación de la benzodiacepina diazepam y sus metabolitos se presentan en la Tabla 3. Cabe indicar que la detección se realizó mediante tres tipos de parámetros de benzodiacepinas de acuerdo con el kit de drogas utilizado y con un valor de corte de 10 ng/ml. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y para el aseguramiento de la calidad de la técnica instrumental se utilizaron dos niveles de controles.

Tabla 3

Resultados de las benzodiacepinas detectadas

Muestras	BENZ 1 (ng/ml)	BENZ 2 (ng/ml)	BENZ 3 (ng/ml)
D1	+(>76)	+25.59(>10)	+(>80)
D2	+(>76)	+38.87(>10)	+(>80)
D3	+(>76)	+47.87(>10)	+(>80)
B1	-(<0)	-0.01(<10)	-0.11(<10)
B2	-(<0)	-0.03(<10)	-0.09(<10)
B3	-(<0)	-0.01(<10)	-0.10(<10)
Control 1	-5.1(<10)	-8.2(<10)	-4.6(<10)
Control 2	+17.59(>10)	+28.13(>10)	+12.29(>10)

Nota. D= Ensayo; B= Blanco; BENZ= Benzodiacepina

En la tabla 4, se presentan las reacciones cruzadas (%CR) para las benzodiacepinas diazepam, oxazepam, temazepam, lorazepam y clonazepam, las mismas que están configuradas de la siguiente forma: BENZ 1 (validado con oxazepam, 100 %CR), BENZ 2 (validado con lorazepam, 100 %CR) y BENZ 3 (validado con clonazepam, 100 %CR).

Tabla 4

Reacciones cruzadas de referencia de las benzodiacepinas analizadas

Parámetro	BENZ 1 (%CR)	BENZ 2 (%CR)	BENZ 3 (%CR)
Diazepam	256	<0.1	<0.1
Oxazepam	100	13	<1
Temazepam	382	<0.1	<1
Lorazepam	18.4	100	<1
Clonazepam	6.9	28.2	100

Nota. %CR= % Cross Reactivity; BENZ= Benzodiacepina

Análisis

En este estudio se pudo verificar un comportamiento diferente entre los dos grupos del ensayo. La aparición de las larvas en los ensayos B1, B2 y B3 fue a las 72 horas desde su sacrificio, mientras que en los ensayos D1, D2 y D3 fue a las 120 horas, evidenciándose un proceso ralentizado de putrefacción de los cobayos administrados con la droga en contraste con los que no recibieron el fármaco, obteniéndose también cantidades diferentes en peso de larvas. En trabajos anteriores (Boulkenafet et al., 2020) determinaron que las drogas alteran el normal crecimiento y desarrollo de los insectos, comprobándose también en esta investigación dicho efecto.

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de larvas provenientes de los cobayos administrados con diazepam determinaron la presencia de la benzodiacepina utilizada. En los parámetros BENZ 1, BENZ 2 y BENZ 3 se obtuvieron valores arriba del punto de corte (cut off = 10 ng/ml), en concordancia con lo publicado por Basilicata et al., 2019. En los parámetros BENZ 1 y BENZ 3, los resultados superaron el valor máximo de detección (76 y 80 ng/ml, respectivamente) a diferencia de BENZ 2 que no mostró esa tendencia, pero si superó el valor de corte.

Podemos indicar que la detección positiva del diazepam en los ensayos de prueba se debe a la reactividad cruzada debido a la presencia de grupos funcionales idénticos o estructuras

moleculares similares (Krasowski, et al., 2009) de las diversas benzodiacepinas con la que se diseñaron los kits (Tabla 4) que en este caso serían el diazepam y sus metabolitos principales oxazepam y temazepam, generando la excitación de los anticuerpos inmovilizados. Entonces, en los ensayos D1, D2 y D3 para el parámetro BENZ 1 se obtuvo la positividad debido al diazepam, oxazepam y temazepam por sus reacciones cruzadas de 256, 100 y 382 % CR, respectivamente (Tabla 4). De igual forma, en los otros parámetros por la misma naturaleza de la droga utilizada, dieron valores positivos debido a la reacción cruzada de la benzodiacepina validada según el kit (BENZ 2 con lorazepam, 100 % CR y BENZ 3 con clonazepam, 100 % CR).

Conclusiones

La presente investigación permitió establecer la utilidad práctica de un análisis de drogas de abuso en matrices no convencionales como las larvas obtenidas de cadáveres en putrefacción aplicando la técnica de inmunoensayo quimioluminiscente. Con este estudio se concluye la importancia de la entomotoxicología como alternativa viable para la detección de sustancias en especímenes de insectos cuando no se dispone de las muestras biológicas de rutina.

De las muestras analizadas los resultados fueron concluyentes para aseverar la importancia de la utilización de insectos en determinación de drogas con resultados altamente aceptables que se complementan a los diferentes procesos de investigación de cada caso en particular. Además el presente estudio servirá de base para futuras investigaciones utilizando la entomotoxicologia como ciencia de base y acoplar a otras técnicas de detección de parámetros cualitativos y cuantitativos.

Con esta investigación se logró determinar que las drogas de abuso como el Diazepam pueden ser identificadas mediante las larvas de insectos que degradan el cadáver por un método sencillo de forma cualitativa que proporciona datos fehacientes por un método de inmunoensayo quimioluminiscente que tiene como ventaja al ser una técnica que simplifica la utilización de recursos y tiempo para los análisis e identificación; se espera continuar con las investigaciones con diferentes tipos de drogas para seguir contribuyendo en la investigación de esta rama de las ciencias forenses.

Con los resultados de esta investigación se espera aportar a los estudios entomotoxicologicos que se realicen en Ecuador con equipos que puedan ser utilizados para los

análisis como una propuesta alternativa y viable para la determinación toxicológica en drogas de abuso en cadáveres de avanzado estado de descomposición en un ambiente cálido húmedo.

Referencias Bibliográficas

Badenhorst R, Villet MH. The uses of Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) (Diptera: calliphoridae) in forensic entomology. Forensic Sci. Res. 2018;3(1):2–15.

Basilicata, P., Pieri, M., Simonelli, A., Faillace, D., Niola, M., & Graziano, V. (2019). Application of a chemiluminescence immunoassay system and GC/MS for toxicological investigations on skeletonized human remains, Forensic Science International, Volume 300, 2019, Pages 120-124, ISSN 0379-0738, https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.003.

Beyer J, Enos W, Stalic M (1980) Drug identification through analysis of maggots. J Forensic Sci 25:411–412

Boulkenafet, F., Dob, Y., Karroui, R., Al-Khalifa, M., Boumrah, Y., Toumi, M., & Mashaly, A. (2020). Detection of benzodiazepines in decomposing rabbit tissues and certain necrophagic dipteran species of forensic importance. Saudi Journal of Biological Sciences, 27(7), 1691–1698. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.044.

Bourel B, Gosset D, Tournel G et al (2001) Determination of drug levels in two species of necrophagous Coleoptera reared on substrates containing morphine. J Forensic Sci 46:600–603

Chophi, R., Sharma, S., Sharma, S., & Singh, R. (2019). Forensic entomotoxicology: Current concepts, trends and challenges. Journal of Forensic and Legal Medicine, 67 (August), 28–36. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2019.07.010

Estrada-Camacho, I., Hernández-Mendoza, J. L., Torres-Ortega, J., Quiroz-Velázquez, J. D. C., & Villarreal-Sotelo, K. (2020). Detección de malatión en larvas de dípteros de importancia

forense en el noreste de México. Revista Colombiana de Entomología, 46(1). DOI: https://doi.org/10.25100/socolen.v46i1.10166

Gagliano-Candela R, Aventaggiato L (2001) The detection of toxic substances in entomological specimens. Int J Legal Med 114: 197–203

Gosselin M, Wille SMR, del Mar Ramirez Fernandez M et al (2011). Entomotoxicology, experimental set-up and interpretations for forensic toxicologists. Forensic Sci Int 208:1–9. doi:10.1016/j.forsciint.2010.12.015

Hellyda K.T. de Andrade Silva, Taciano M. Barbosa, Marfran C.D. Santos, Jessica T. Jales, Antonio M.U. de Araújo, Camilo L.M. Morais, Leomir A.S. de Lima, Tatiana C. Bicudo, Renata A. Gama, Pablo Alves Marinho, Kássio M.G. (2023). Lima, Detection of terbufos in cases of intoxication by means of entomotoxicological analysis using ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics, Acta Tropica, Volume 238, 2023, 106779, ISSN 0001-706X, https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106779.

Krasowski, M.D., Pizon, A.F., Siam, M.G. et al. (2009). Using molecular similarity to highlight the challenges of routine immunoassay-based drug of abuse/toxicology screening in emergency medicine. BMC Emerg Med 9, 5. https://doi.org/10.1186/1471-227X-9-5

Luna, F. S., & Biagi Bistoni, M. I. (2020). Detección de cocaína en larvas de moscas: propuesta metodológica preliminar en el uso de larvas como matriz biológica alternativa en estudios toxicológicos post mortem (Master's thesis). URL: http://hdl.handle.net/11086/17747

Pozo, M. J. H. (2021). Entomotoxicología Forense en cadáveres en estado de descomposición. The Ecuador Journal of Medicine, 1(Esp), 17-32. DOI: https://doi.org/10.46721/tejom-vol1issEsp-2021-17-32

Pounder DJ (1991) Forensic entomo-toxicology. J Forensic Sci Soc 31:469–472. doi:10.1016/S0015-7368(91)73189-7

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Annotation Record for, DIAZEPAM, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Retrieved January 27, 2024, from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/3057#section=Non-Human-Toxicity-Values-%28Complete%29.

Rashid RA, Osman K, Ismail MI et al (2008) Determination of malathion levels and the effect of malathion on the growth of Chrysomya megacephala (Fabricius) in malathion-exposed rat carcass. Trop Biomed 25:184–190 Charabidze et al., 2017

Sanaa M. Aly, Alexandr Gish, Florian Hakim, Douniazad Guelmi, Vadim Mesli, Valéry Hédouin, Delphine Allorge, Jean-michel Gaulier. (2023). In the case of extensively putrefied bodies, the analysis of entomological samples may support and complement the toxicological results obtained with other alternative matrices, Legal Medicine, Volume 63, 2023, 102261, ISSN 1344-6223, https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2023.102261.

Tabor KL, Fell RD, Brewster CC et al (2005) Effects of antemortem ingestion of ethanol on insect successional patterns and development of Phormia regina (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol 42:481–489

Valera, E., Salazar, M., Moreira, M., & Sánchez, B. (2022). Estudio experimental sobre entomofauna cadavérica en Quito, provincia Pichincha, Ecuador. Antropo, 48. http://www.didac.ehu.es/antropo