



Mejoramiento de un método no comercial para la extracción de ADN de moscas de interés médico-legal

Improvement of a non-commercial method for DNA extraction from flies of medico-legal interest

Andrés F. Maya¹ ; Yesica Durango¹ ; Luz M. Gómez-Piñerez¹ ; Giovan F. Gómez^{2*} 

¹Tecnológico de Antioquia, Institución Universitaria, Grupo Bioforense. Medellín - Antioquia, Colombia; e-mail: auxiliar.investigacion@tdea.edu.co; ydurang1@tdea.edu.co; lgomez@tdea.edu.co

²Universidad Nacional de Colombia, sede de La Paz. La Paz - Valledupar, Colombia; e-mail: gfgomezg@unal.edu.co

*autor de correspondencia: gfgomezg@unal.edu.co

Cómo citar: Maya, A.F.; Durango, Y.; Gómez-Piñerez, L.M.; Gómez, G.F. 2023. Mejoramiento de un método no comercial para la extracción de ADN de moscas de interés médico-legal. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 26(1):e1946. <http://doi.org/10.31910/rudca.v26.n1.2023.1946>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.

Recibido: marzo 5 de 2021

Aceptado: octubre 6 de 2022

Editado por: Helber Adrián Arévalo Maldonado

RESUMEN

La obtención de ADN de moscas de interés médico-legal es de relevancia para una variedad de aplicaciones. Aunque existen métodos de extracción comerciales de ADN, su uso rutinario es limitado, en algunos escenarios. En este contexto, el uso de métodos no comerciales constituye una alternativa; sin embargo, su optimización es clave para mejorar el flujo de trabajo y los resultados. Este trabajo evaluó el impacto de variaciones a un método de precipitación salina sobre la concentración y la pureza del ADN recuperado. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de ADN extraído entre los diferentes tiempos de incubación, probados durante la fase de extracción, mientras que el incremento en el volumen de etanol absoluto, en la fase de precipitación de ADN, mejoró significativamente la concentración de ADN obtenido. Las modificaciones propuestas reducen el tiempo de ejecución y la concentración de ADN obtenido comparado con el protocolo original.

Palabras clave: Entomología forense; Ácidos nucleicos; Artrópodos; Extracción de ADN; Optimización.

ABSTRACT

Obtaining DNA from flies of medico-legal interest is relevant for a variety of applications. Although commercial extraction methods offer optimal DNA, their routine use is limited in some settings. In this context, the use of non-commercial methods constitutes an alternative in laboratories with limited resources however, its

optimization is key to improving the workflow and the results. This work evaluated the impact of variations to a saline precipitation method on the concentration and purity of the recovered DNA. No significant differences were found in the concentration of extracted DNA between the different incubation times tested during the extraction phase. In contrast, the increased volume of absolute ethanol in the DNA precipitation phase significantly improved the concentration of DNA obtained. The proposed modifications reduce the runtime and DNA concentration obtained compared with the original protocol.

Keywords: Forensic entomology; Nucleic acids; Arthropods; DNA extraction; Optimization.

INTRODUCCIÓN

Los dípteros, en especial, las moscas calípteras de las familias Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae y Sarcophagidae, son relevantes en la sucesión entomológica asociada a procesos de descomposición en cadáveres (Byrd & Tomberlin, 2020). La identificación taxonómica, a nivel de especie, es fundamental para el estudio de su biología, bionomía e historia evolutiva (De Queiroz, 2007) y, en el campo forense, para estimar el intervalo post-mortem, posibles traslados del cadáver, entre otras aplicaciones (Byrd & Tomberlin, 2020). Tradicionalmente, se han utilizado caracteres morfológicos para la identificación de los especímenes; sin embargo, la alta diversidad de especies (Stork, 2018), su similitud morfológica, la escasez de especialistas y de claves morfológicas, dificultan esta

tarea (Packer *et al.* 2009). El estudio del ADN y su aplicación en la identificación y confirmación molecular de especies permite superar estas dificultades y avanzar en el conocimiento de su biología, diversidad genética, entre otros aspectos X (Packer *et al.* 2009).

La obtención del ADN en una concentración y pureza apropiada es fundamental en el flujo de trabajo de un laboratorio de biología molecular para garantizar resultados óptimos, de acuerdo con la aplicación requerida (Kuhn *et al.* 2017; Psifidi *et al.* 2015). Para lograrlo, la técnica de extracción ideal debería ser económica, simple, proveer suficiente cantidad y calidad, así como no utilizar agentes peligrosos para el ambiente. La concentración de ADN final no solo depende del tipo de tejido utilizado y su tamaño, sino también de variables propias del método de extracción, que determinan, a su vez, la pureza del material genético (Ausubel *et al.* 2003). Existen métodos de extracción no comerciales y comerciales. Aunque los métodos comerciales logran recuperar ADN de alta calidad son costosos para el trabajo rutinario (Niu *et al.* 2008), en especial, en países en desarrollo. En este contexto, se han propuesto algunos métodos no comerciales que logran obtener ADN con resultados adecuados, a un bajo costo por muestra (Niu *et al.* 2008; Saavedra-Matiz *et al.* 2013; Xin & Chen, 2012).

Uno de los métodos no comerciales que se utiliza, como base para extraer ADN en moscas, es el de precipitación salina, propuesto por Collins *et al.* (1987), originalmente, aplicado en mosquitos del género *Anopheles* y modificado para el estudio de moscas (Cadavid, 2018). Este método, se caracteriza por ser más amigable con el medio ambiente que aquellos que utilizan fenol-cloroformo u otros reactivos peligrosos (Panigrahy *et al.* 2022).

Con relación al tipo de tejido, el par de patas medias es el tejido seleccionado, debido a que, usualmente, no son utilizadas para la identificación morfológica en estas moscas, lo que permite conservar los caracteres utilizados en taxonomía tradicional (Nakano & Honda, 2015; Aristizábal-Botero *et al.* 2016); sin embargo, algunos autores prefieren utilizar una parte de mayor tamaño, como el abdomen o el tórax, para lograr obtener mayor concentración de ADN (Guo *et al.* 2012). El tamaño del ejemplar, a nivel de especie, a su vez, se relaciona con el dimorfismo sexual, donde, en general, las hembras tienden a mayor tamaño que los machos, factor adicional a considerar durante la selección de especímenes (Benítez, 2013; Nuñez Rodríguez & Liria, 2017; Cortés-Suarez *et al.* 2021).

El primer paso del protocolo de Cadavid (2018) requiere una maceración del tejido, la cual, se puede lograr manualmente, con un macerador plástico o de manera semiautomática, consistente en una previa cristalización del tejido con nitrógeno líquido y posterior agitación mecánica del tejido con perlas hasta su pulverización en un agitador. Un reporte previo sugiere que el método semiautomático mejora significativamente la concentración de ADN obtenida, con relación a los métodos manuales, a partir de fitoplancton (Yuan *et al.* 2015); sin embargo, no se conocen datos en moscas. El impacto de otras variables del proceso de extracción de ADN relacionadas con el tamaño de los especímenes, los cuales, pueden diferir en

promedio entre las especies o la cantidad de etanol utilizada para la precipitación de ADN, no han sido probadas en este modelo.

El objetivo de este estudio fue comparar la concentración y la pureza del ADN obtenido de moscas de tres especies, pertenecientes a tres familias de importancia forense, cuando se utiliza el protocolo de Cadavid (2018), con modificaciones en el tiempo de incubación inicial en la fase de lisis, la maceración: manual versus agitación con perlas de vidrio o el volumen de alcohol utilizado durante la fase de precipitación de ADN. Adicionalmente, se evaluaron las diferencias potenciales en los resultados entre especímenes machos y hembras y entre el uso de las patas medias versus el abdomen, como tejido de partida para la extracción.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la Colección Entomológica Tecnológico de Antioquia, CETdeA, se seleccionaron especímenes de *Peckia collusor* (Curran & Walley, 1934) (Sarcophagidae), *Biopyrellia bipuncta* (Wiedemann, 1830) (Muscidae) y *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) (Fanniidae), los cuales, estuvieron conservados en etanol al 80 %, entre 3 y 8 años. Los especímenes, se identificaron morfológicamente con claves taxonómicas especializadas (Carvalho & Mello-Patiu, 2008; Buenaventura & Pape, 2013; Durango & Ramírez-Mora, 2019; Grisales & de Carvalho, 2019). Se procesó un total de 180 especímenes, divididos en cinco grupos experimentales (Tabla 1). El ADN, se obtuvo mediante el protocolo descrito por Cadavid (2018), que consiste en cuatro fases lisis: i) maceración del tejido, mediante la cristalización del tejido con nitrógeno líquido y maceración de las muestras, en un homogenizador de tejidos (Tissuelyser II, QIAGEN), durante cinco minutos, a 300 frecuencias por segundo, exceptuando el grupo experimental, donde se comparó la maceración con perlas vs manual; ii) ruptura celular, mediante el buffer de lisis (NaCl 0,1 mol/l; Sucrosa 0,1 mol/l; Tris 0,1 mol/l; EDTA 0,05 mol/l y SDS 0.5 %); iii) incubación de las muestras con el buffer de lisis en baño seco, a 56 °C, durante 2 horas o toda una noche, según el grupo experimental y iv) precipitación del ADN con etanol en diferentes volúmenes (1:1, 1:3, 1:5 y 1:8).

La medición de la concentración de ADN (ng/μl) y su pureza (A260/280), se realizó para cada muestra por triplicado, en un espectrofotómetro NanoDrop®, con un volumen de 2 μl por cada muestra ND-1000 (Thermo Scientific, USA), según las instrucciones del fabricante y el dato analizado corresponde al promedio de las mediciones por muestra. Para los primeros cuatro grupos experimentales, los datos se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, mientras que las diferencias potenciales en los datos del grupo cinco, se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, se evaluaron las posibles diferencias en cantidad de ADN obtenido entre las especies mediante ANOVAs de dos factores. Se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en los casos de existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$), para discriminar las diferencias entre las medias. Para el análisis estadístico, se utilizaron los programas GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) y PAST v. 3.25 (Hammer *et al.* 2001).

Tabla 1. Grupos experimentales y muestras utilizadas para la extracción de ADN de moscas.

Grupo experimental	Descripción	Tejido	Especie (n de especímenes*)	Resultado
1	Machos <i>versus</i> hembras	2 patas medias	<i>Peckia collusor</i> (n=10) <i>Biopyrellia bipuncta</i> (n=10) <i>Fannia pusio</i> (n=10)	n.s.
2	Maceración con perlas <i>versus</i> maceración manual	2 patas medias	<i>Peckia collusor</i> (n=10) <i>Biopyrellia bipuncta</i> (n=10) <i>Fannia pusio</i> (n=10)	n.s.
3	Patas <i>versus</i> abdomen	2 patas medias o abdomen	<i>Peckia collusor</i> (n=10) <i>Biopyrellia bipuncta</i> (n=10) <i>Fannia pusio</i> (n=10)	p < 0,05
4	2 h <i>versus</i> 12 h de incubación a 56 °C del tejido con buffer de lisis + proteinasa K	2 patas medias	<i>Peckia collusor</i> (n=10) <i>Biopyrellia bipuncta</i> (n=10) <i>Fannia pusio</i> (n=10)	n.s.
5	Volumen de etanol absoluto para precipitación de ADN: 1:1, 1:3, 1:5 y 1:8	2 patas medias	<i>Peckia collusor</i> (n=20) <i>Biopyrellia bipuncta</i> (n=20) <i>Fannia pusio</i> (n=20)	p=0,03

* El número de especímenes en cada una de las especies fue equitativamente dividido, de acuerdo con la descripción de cada grupo experimental.

n.s.: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Se reporta el *p* valor de las comparaciones, en donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para los grupos experimentales uno y dos (sexo y tipo de maceración, respectivamente), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de ADN, ni en su pureza ($p > 0,05$). El grupo experimental tres (patas *versus* abdomen) presentó diferencias en la cantidad ($p < 0,05$), pero no en la pureza de ADN ($p = 0,78$); la extracción de ADN a partir de abdomen rindió casi cinco veces más ADN (Me= 508,3 ng/μl), en comparación con la de las patas (Me= 108,9 ng/μl). Para el grupo experimental cuatro, el tiempo de incubación de la muestra en baño seco, a 56 °C, tampoco generó diferencias significativas en la cantidad y la pureza del ADN recuperado.

Finalmente, el grupo experimental cinco, donde se comparó el efecto de diferentes volúmenes de etanol absoluto para la precipitación de ADN, rindió diferencias significativas, tanto en la cantidad

($p = 0,03$) como en la pureza de ADN ($p < 0,0001$); la dilución 1:8 mejoró sustancialmente el ADN obtenido en las muestras analizadas. El análisis de varianza de dos factores mostró diferencias estadísticamente significativas en la concentración de ADN recuperada en todos los grupos experimentales, de acuerdo con la especie ($p < 0,0001$). A partir del par de patas medias, se recuperó, en promedio, 22,6 ng/μl de ADN por espécimen de *Fannia pusio*, mientras que para *Biopyrellia bipuncta* y *Peckia collusor*, tres (67,7 ng/μl) y diez veces más (227,7 ng/μl), respectivamente.

Este trabajo evidenció el impacto de variable extrínsecas, tales como la especie, relacionada con su tamaño corporal, así como el tipo de tejido utilizado para la extracción de ADN, en la concentración de ADN obtenido. Además, el impacto de variables intrínsecas del método de extracción, como el volumen de etanol absoluto utilizado durante la fase de precipitación de ADN, en la eficiencia de la extracción de ADN en moscas de importancia médico-legal,

utilizando el protocolo descrito por Cadavid (2018). Por otra parte, se evidenció que otros factores, como el sexo, el tipo de maceración y el tiempo de incubación en la fase de lisis, no resultaron en diferencias significativas en la concentración y la pureza del ADN obtenido.

Las diferencias en el tamaño corporal de las tres especies evaluadas explican los resultados observados en la concentración de ADN obtenida; por ejemplo, *Fannia pusio* es una mosca pequeña, con una longitud entre 2,5 a 3,5 mm, mientras que las especies de la familia Sarcophagidae, a la que pertenece *Peckia collusor*, pueden medir entre 2 y 25 mm (Carvalho & Mello-Patiu, 2008; Paseto *et al.* 2019). Adicionalmente, en correspondencia con el tamaño del tejido, en todas las especies analizadas, se obtuvo mayor concentración de ADN cuando se usó el abdomen, que a partir del par de patas medias. Aun así, la cantidad de ADN obtenida a partir del par de patas medias (108,9 ng/μl), se considera suficiente para el éxito de la técnica PCR, con la ventaja de preservar el espécimen y conservar información de estructuras, que son de gran relevancia taxonómica, aspecto óptimo en el marco de estrategias de identificación molecular (Prendini *et al.* 2002; Ratnasingham & Hebert, 2007); no obstante, se requiere la evaluación de otras variables que pueden afectar la PCR, como la presencia de inhibidores en el extracto de ADN obtenido. Los valores A260/280, una medida de la pureza del ADN extraído, en todos los grupos experimentales, fue inferior a 1,8, dato que sugiere contaminación potencial por proteínas o sales (Boesenberg-Smith *et al.* 2012). Aunque la pureza del ADN con este método de precipitación salina no es alta, ha sido de utilidad para la amplificación exitosa de diversos fragmentos de ADN nucleares y mitocondriales, tanto en moscas como en otros dípteros (Gómez *et al.* 2015), lo que indica que no representa una limitante para implementar este protocolo de forma rutinaria.

Los resultados de este estudio sugieren que el incremento de la relación entre el volumen de etanol y el extracto de ADN en la fase de precipitación del ADN mejora, sustancialmente, la concentración final de este ácido nucleico en las muestras. La molécula de ADN está cargada negativamente, debido a los residuos de fosfato y se encuentra altamente hidratado en una fase acuosa. El etanol altera las capas de hidratación del ADN y permite que los residuos de fosfato formen enlaces iónicos con cationes en el solvente y cuando la concentración de etanol se aproxima al 70 % en presencia de una alta concentración de sales, las fuerzas repulsivas entre las cadenas de polinucleótidos, se reducen hasta precipitar el ADN (Green & Sambrook, 2016), resultando en un incremento en la eficiencia del método utilizado en este estudio.

Es de resaltar que el tiempo de incubación del tejido a 56 °C con buffer de lisis y proteinasa K, no afectó la cantidad de ADN recuperado. Este resultado permite disminuir el tiempo de incubación en el baño seco de las muestras, con la consecuente ventaja de reducir el gasto de energía del equipo y el tiempo empleado durante la extracción de ADN. Similarmente, los hallazgos no evidenciaron que el método de maceración semiautomático mejorara el rendimiento en la concentración de ADN obtenido; este resultado es contrastante con un estudio previo en artrópodos, donde este tipo de maceración

mejora el rendimiento (Ammazzalorso *et al.* 2015). Aun así, para la extracción de ADN de moscas con el protocolo de Cadavid (2018), se recomienda utilizar el método semiautomático, debido a que se reduce el tiempo del protocolo en este paso, el riesgo de contaminación de las muestras y se eliminan factores de riesgo relacionados con el desarrollo de síndrome del túnel carpiano (El-Helaly *et al.* 2017) y otras tendinopatías, potencialmente, asociados a actividades, como la maceración manual de las muestras durante este proceso.

La extracción de ADN a partir de un tejido de mayor tamaño, así como la reducción del tiempo de incubación durante la fase de lisis celular y el incremento en el volumen de etanol absoluto en la fase final de precipitación de ADN, mejoran significativamente la concentración de ADN obtenido, al utilizar este protocolo no comercial en moscas de interés médico-legal. Este método modificado es más amigable con el medio ambiente en comparación con otros métodos no comerciales, basados en fenol-cloroformo y otros reactivos más tóxicos y, además, permitió la recuperación de ADN a partir de especímenes almacenados en etanol al 80 %, con una antigüedad de hasta ocho años, insumo clave para el desarrollo de estudios de identificación y sistemática molecular.

Agradecimientos. A miembros del grupo de investigación Bioforense, por la recolección y el mantenimiento de especímenes de la Colección Entomológica Tecnológico de Antioquia, CETdeA. Al Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Universidad de Antioquia y al Grupo de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, por su colaboración en el préstamo de equipos. **Conflicto de intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. **Contribución autores:** Todos los autores participaron en la escritura, la revisión y edición del manuscrito. Además, Andres F. Maya aportó con la conceptualización y la metodología de la investigación, Yesica Durango trabajó en la metodología de la investigación y la validación de los datos, Luz M. Gómez-Piñerez colaboró con la consecución de recursos, y la metodología de la investigación y Giovan F. Gómez contribuyó con la conceptualización, la metodología de la investigación, y la administración y supervisión del proyecto. **Financiación:** Este trabajo fue financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación –CODEI, Tecnológico de Antioquia, Institución Universitaria.

REFERENCIAS

1. AMMAZZALORSO, A.D.; ZOLNIK, C.P.; DANIELS, T.J.; KOLOKOTRONIS, S.-O. 2015. To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). Peer J. 3:e1147. <https://doi.org/10.7717/peerj.1147>
2. ARISTIZÁBAL-BOTERO, Á.; GROOT, H.; CAMACHO, G.P.; REALPE, E.; PAREDES, M. 2016. Análisis de las secuencias citocromo oxidasa I y espaciadores ribosomales transcritos internos (ITS1 y 2 y 5.8S) para la identificación de

- especies de interés forense. *Revista Entomología Mexicana*. 3:695-706.
3. AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. 2003. *Current protocols in molecular biology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. (Estados Unidos). 4648p.
 4. BENÍTEZ, H.A. 2013. Sexual dimorphism. In: Moriyama, H. (ed.). *Sexual Dimorphism*. IntechOpen (Croatia). p.35-50.
 5. BOESENBERG-SMITH, K.A.; PESSARAKLI, M.M.; WOLK, D.M. 2012. Assessment of DNA Yield and Purity: An Overlooked Detail of PCR Troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*. 34(1):3-6.
<https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002>
 6. BUENAVENTURA, E.; PAPE, T. 2013. Revision of the New World genus *Peckia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae). *Zootaxa*. 3622(1):1-87.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3622.1.1>
 7. BYRD, J.H.; TOMBERLIN, J.K. 2020. *Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. Third edition. CRC Press. 620p.
 8. CADAVID, I.C. 2018. Extracción de ADN a partir de insectos con buffer de macerado. En: Gómez P, L.M.; Gómez G., G.F. (eds). *Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas*. Sello Editorial Publicar-T (Medellin, Colombia). p.87-91.
 9. CARVALHO, C.J.B.; MELLO-PATIU, C.A. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*. 52(3):390-406.
<https://doi.org/10.1590/S0085-56262008000300012>
 10. COLLINS, F.H.; MENDEZ, M.A.; RASMUSSEN, M.O.; MEHAFFEY, P.C.; BESANSKY, N.J.; FINNERTY, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 37(1):37-41.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.37>
 11. CORTÉS-SUAREZ, L.; DURANGO, Y.S.; GÓMEZ, G.F. 2021. Dimorfismo sexual en la geometría alar de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) de Colombia. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 80(1):81-88.
<https://doi.org/10.25085/rsea.800109>
 12. DE QUEIROZ, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*. 56(6):879-886.
<https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
 13. DURANGO, Y.; RAMÍREZ-MORA, M. 2019. *Fannia Robineau-Desvoidy* (Diptera: Fanniidae) of Colombia: New species, identification key and updated checklist. *Zootaxa*. 4604(2):301-325.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4604.2.4>
 14. EL-HELALY, M.; BALKHY, H.H.; VALLENIUS, L. 2017. Carpal tunnel syndrome among laboratory technicians in relation to personal and ergonomic factors at work. *Journal of occupational health*. 59(6):513-520.
<https://doi.org/10.1539/joh.16-0279-OA>
 15. GÓMEZ, G.F.; BICKERSMITH, S.A.; GONZÁLEZ, R.; CONN, J.E.; CORREA, M.M. 2015. Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the neotropical *Arribalzagia* series. *PLoS One*. 10(3):1-17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119488>
 16. GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. 2016. Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016(12):1116-1120.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot093377>
 17. GRISALES, D.; DE CARVALHO, C.J.B. 2019. Highland biodiversity of Fanniidae (Insecta, Diptera): Fourteen new species from the Andes and Central America. *Zootaxa*. 4551(3):330-360.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4551.3.4>
 18. GUO, Y.D.; CAI, J.F.; MENG, F.M.; CHANG, Y.F.; GU, Y.; LAN, L.M.; LIANG, L.; WEN, J.F. 2012. Identification of forensically important flesh flies based on a shorter fragment of the cytochrome oxidase subunit I gene in China. *Medical and Veterinary Entomology*. 26(3):307-313.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.01003.x>
 19. HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 4(1):1-9.
 20. KUHN, R.; BÖLLMANN, J.; KRAHL, K.; BRYANT, I.M.; MARTIENSSEN, M. 2017. Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*. 143:78-86.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.007>
 21. NAKANO, A.; HONDA, J. 2015. Use of DNA sequences to identify forensically important fly species and their distribution in the coastal region of Central California. *Forensic Science International*. 253:1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.05.001>
 22. NIU, C.; KEBEDE, H.; AULD, D.L.; WOODWARD, J.E.; BUROW, G.; WRIGHT, R.J. 2008. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA

- in an open laboratory environment. *African Journal Biotechnology*. 7(16):2818-2822.
23. NUÑEZ RODRÍGUEZ, J.; LIRIA, J. 2017. Sexual wing shape dimorphism in *Piophilidae* (Linnaeus, 1758 Diptera: Piophilidae). *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*. 11(2):217-221.
<https://doi.org/10.5958/0973-9130.2017.00100.1>
24. PACKER, L.; GIBBS, J.; SHEFFIELD, C.; HANNER, R. 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*. 9(Suppl. 1):42-50.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02631.x>
25. PANIGRAHY, N.; PRIYADARSHINI, A.; SAHOO, M.M.; VERMA, A.K.; DAVEREY, A.; SAHOO, N.K. 2022. A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook. *Environmental Technology & Innovation*. 27:102423.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102423>
26. PASETO, M.L.; DE FARIA, L.S.; MENDES, J.; LINHARES, A.X. 2019. Diversity of Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associated with decomposing carcasses in a rural area of the State of Minas Gerais, Brazil. *EntomoBrasilis*. 12(3):118-125.
<https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v12i3.842>
27. PRENDINI, L.; HANNER, R.; DESALLE, R.O.B. 2002. Obtaining, storing and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies. In: DeSalle, R.; Giribet, G.; Wheeler, W. (eds). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*. Springer. p.176-248.
28. PSIFIDI, A.; DOVAS, C.I.; BRAMIS, G.; LAZOU, T.; RUSSEL, C.L.; ARSENO, G.; BANOS, G. 2015. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS ONE*. 10(1):e0115960.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115960>
29. RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. 2007. Bold: The barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes*. 7(3):355-364.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
30. SAAVEDRA-MATIZ, C.A.; ISABELLE, J.T.; BISKI, C.K.; DUVA, S.J.; SWEENEY, M.L.; PARKER, A.L.; YOUNG, A.J.; DIANTONIO, L.L.; KREIN, L.M.; NICHOLS, M.J.; CAGGANA, M. 2013. Cost-effective and scalable DNA extraction method from dried blood spots. *Clinical Chemistry*. 59(7):1045-1051.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.198945>
31. STORK, N.E. 2018. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? *Annual Review of Entomology*. 63:31-45.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
32. XIN, Z.; CHEN, J. 2012. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*. 8:26.
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-26>
33. YUAN J.; LI, M.; LIN, S. 2015. An improved DNA extraction method for efficient and quantitative recovery of phytoplankton diversity in natural assemblages. *PLoS One*. 10(7):e0133060.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133060>