

OPERA LILLOANA Nº 54

María Rosana Ayón

— Editora —

— Primer libro sobre la especialidad escrito en Argentina —

Biología Forense

Botánica, ficología, micología, entomología, tafonomía
y genética aplicadas a la criminalística



Fundación Miguel Lillo
TUCUMÁN - ARGENTINA

BIOLOGÍA FORENSE

OPERA LILLOANA 54

Biología Forense

María Rosana Ayón

— Editora —

Servicio de Biología Forense, Departamento Técnico Científico,
Cuerpo de Investigaciones Fiscales, Ministerio Público de Salta.
Avda. Bolivia 4671, (CPA4408FV6) Salta Capital.
rosanaay@yahoo.com.ar



Fundación Miguel Lillo

Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia
y Tecnología de la Nación

Ley 12.935 – Tucumán – República Argentina

— 2019 —

Ayón, María Rosana

Biología Forense / María Rosana Ayón. - 1a ed. - Tucumán : Fundación Miguel Lillo, 2019.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-668-037-4

1. Biología. 2. Criminalística. 3. Ciencias Forenses. I. Título.
CDD 570

Opera lilloana

Serie monográfica de la Fundación Miguel Lillo que incluye temas de botánica, zoología y geología en trabajos de investigación original.

Correo electrónico: actazoologica@lillo.org.ar

ISSN 950-668-010-8

Fundación Miguel Lillo, 2019.

www.lillo.org.ar

Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.

Telefax +54 381 433 0868

www.lillo.org.ar

Editor Área Zoología

Mariano Ordano (Fundación Miguel Lillo y CONICET / Unidad Ejecutora Lillo, Tucumán, Argentina).

Editor gráfico

Gustavo Sánchez (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Editor web

Andrés Ortiz (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Secretaría editorial Área Zoología

Felipe Castro (Fundación Miguel Lillo y Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina).

Pamela Gómez (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Eduardo Martín (Fundación Miguel Lillo y Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina).

María del Pilar Medina Pereyra (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Hugo Pablo Pereyra (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Franco Pucci Alcaide (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Guido van Nieuwenhove (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Florencia Vera Candiotti (CONICET / Unidad Ejecutora Lillo, Tucumán, Argentina).

María Paula Zamudio (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

María Eugenia Pérez (Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina).

Consultas bibliográficas y ventas

Centro de Información Geo-Biológico del Noroeste Argentino,

Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.

Correo electrónico: biblioteca@lillo.org.ar

Ref. bibliográfica: Ayón, M. R. [Ed.]. 2019. «Biología Forense». *Opera lilloana* 54, Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.

ISBN 978-950-668-037-4

Las opiniones y contenidos de los trabajos son exclusiva responsabilidad de los autores y no coinciden necesariamente con las posiciones de los editores o de *Opera lilloana*.

Derechos protegidos por Ley 11.723

Editado en Argentina.

Contenido

El rol de la biología en las ciencias forenses	9
MARÍA ROSANA AYÓN	
Una visión general de los indicios biológicos	11
ALEJANDRA GUINUDINIK	
<u>Capítulo 1</u>	
Criminalística	34
HÉCTOR ROLANDO BARBOZA	
<u>Capítulo 2</u>	
La botánica y su aplicación en las ciencias forenses	52
OLGA MARTÍNEZ	
<u>Capítulo 3</u>	
Aplicaciones forenses de las microalgas	62
NATALIA V. MATTANO, NORA I. MAIDANA	
<u>Capítulo 4</u>	
Micología forense	80
MARÍA CECILIA TRANCHIDA, MARTA NOEMÍ CABELLO	
<u>Capítulo 5</u>	
Entomología forense	92
MARÍA ROSANA AYÓN	

Capítulo 6

Patología forense 118
CLAUDIA MARCELA PORTELLI

Capítulo 7

Tafonomía forense 129
NOELIA INÉS ZANETTI

Capítulo 8

Genética forense 160
CECILIA MIOZZO

Aplicaciones forenses de las microalgas

Natalia V. Mattano^{1,3}, Nora I. Maidana^{1,2}

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Laboratorio de Diatomeas continentales, C. Universitaria, Pab. 2. C1428EHA, C. A. de Buenos Aires, Argentina. mattveronat@gmail.com

² CONICET – Universidad de Buenos Aires. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), C. Universitaria, Pab. 2. C1428EHA, C. A. de Buenos Aires, Argentina.

³ Gendarmería Nacional. Dirección de Criminalística y Estudios Forenses. División Medicina Forense, Sección Ficología Forense, C. A. de Buenos Aires, Argentina.

¿QUÉ ES LA MUERTE POR SUMERSIÓN O AHOGAMIENTO HÚMEDO?

Existen en la literatura numerosas definiciones de muerte por sumersión. Una de las más aceptadas es la del 1^{er} Congreso Mundial sobre Ahogamientos, Organización Mundial de la Salud (2016): que la define como «el proceso conducente a la imposibilidad de respirar debido a sumersión/inmersión en un líquido». Posteriormente, Concheiro Carro & Suárez Peñaranda (2004) definen la sumersión, en sentido médico legal, como la muerte o el trastorno patológico producidos por la introducción de un medio líquido, habitualmente agua, en las vías respiratorias.

Según la Organización Mundial de la Salud (2016), cada año se producen en el mundo 372.000 defunciones por ahogamiento —lo que representa 42 decesos por hora— de los cuales más de la mitad de las víctimas son menores de 25 años y más del 90% ocurren en países de bajos recursos. Es considerada como una de las 10 causas principales de muerte de personas entre 1 y 24 años de edad.

¿CÓMO OCURRE LA MUERTE POR SUMERSIÓN?

El diagnóstico se basa esencialmente en datos etiológicos, anatómicos y biológicos relacionados con las modificaciones que resultan del ingreso de líquidos en el torrente circulatorio (Tabbara & Dérobert, 1962).

Las etapas del ahogamiento húmedo (Idris *et al.*, 2003; Raffo & Bonnet, 1980; Vallejo, Azparren & Valverde, 2012) consisten en:

- 1) Estado de sorpresa. Cuando ocurre la aspiración de agua (duración entre 5 y 10 segundos).
- 2) Apnea voluntaria (duración de aproximadamente 1 minuto).

3) Respiración profunda desencadenada por presentar estado de hipoxia, hipercapnia y acidosis. Además, el ingreso del líquido irrita la mucosa bronquial, provocando la formación de una espuma viscosa y rosada denominada «hongo de espuma» (duración 1 minuto).

4) Paro respiratorio, seguido de la disfunción de múltiples órganos y convulsiones. (duración 1 minuto).

5) La última fase es la muerte ocasionada por una fuerte hipoxia en los tejidos, los principales órganos afectados son el corazón y el cerebro. Es por esto que la principal causa de muerte en víctimas de ahogamiento hospitalizadas es el desarrollo de encefalopatías posthipóxicas con o sin edema cerebral (duración entre 3 y 4 minutos).

La temperatura del agua puede influir en cómo se produce el deceso. En el caso en que supere los 35°C (punto de termoneutralidad, cuando el calor perdido se equipara al calor ganado), como por ejemplo en un baño de inmersión con agua caliente, la muerte se puede desencadenar por epilepsia en individuos que presentan alteraciones en la termorregulación o defectos genéticos. En cambio, a temperaturas por debajo de los 25°C el cuerpo comienza a responder mediante un shock térmico, que se intensifica entre los 10-15°C. Cuando la temperatura del agua se encuentra por debajo de los 15°C se reduce considerablemente la etapa 2 (cuando ocurre la apnea voluntaria) y aumenta la incidencia de arritmias, aumentando las posibilidades de ahogamiento. Se considera que la temperatura corporal asociada a la muerte por inmersión en agua fría es de 25°C, aunque hay registros de resucitación exitosa de un adulto con una temperatura corporal cercana a los 13,7°C. (Bierens, Lunetta, & Warner, 2016).

¿QUÉ SON LAS MICROALGAS?

Las algas son un conjunto de organismos, en su mayoría microscópicos, que realizan fotosíntesis y viven fundamentalmente en el agua, aunque hay algunas que pueden hallarse fuera de ella (sobre suelo húmedo, rocas, corteza de árboles y hasta en pelos y plumas de animales acuáticos). Las microalgas son algas microscópicas y generalmente, unicelulares, frecuentes tanto en ambientes marinos como continentales y se considera que son la principal fuente del oxígeno que respiramos (Graham, Graham & Wilcox, 2009)

Las células de las algas suelen estar cubiertas por una pared celular, cuya naturaleza química varía de un grupo al otro. Puede ser orgánica o inorgánica y en algunos casos puede estar reforzada por el depósito de cristales de sílice o de carbonato de calcio o por otros compuestos, como fenoles y algenanos, que le dan resistencia ante la acción de agentes químicos o la degradación por los organismos descomponedores (Graham *et al.*, 2009).

Las algas más comunes en casi todo tipo de ambientes acuáticos son las diatomeas (tienen cubiertas silicificadas), las algas azules (cianobacterias) y las algas verdes (clorofitas), aunque también pueden encontrarse representantes de otros grupos (Fig. 1)

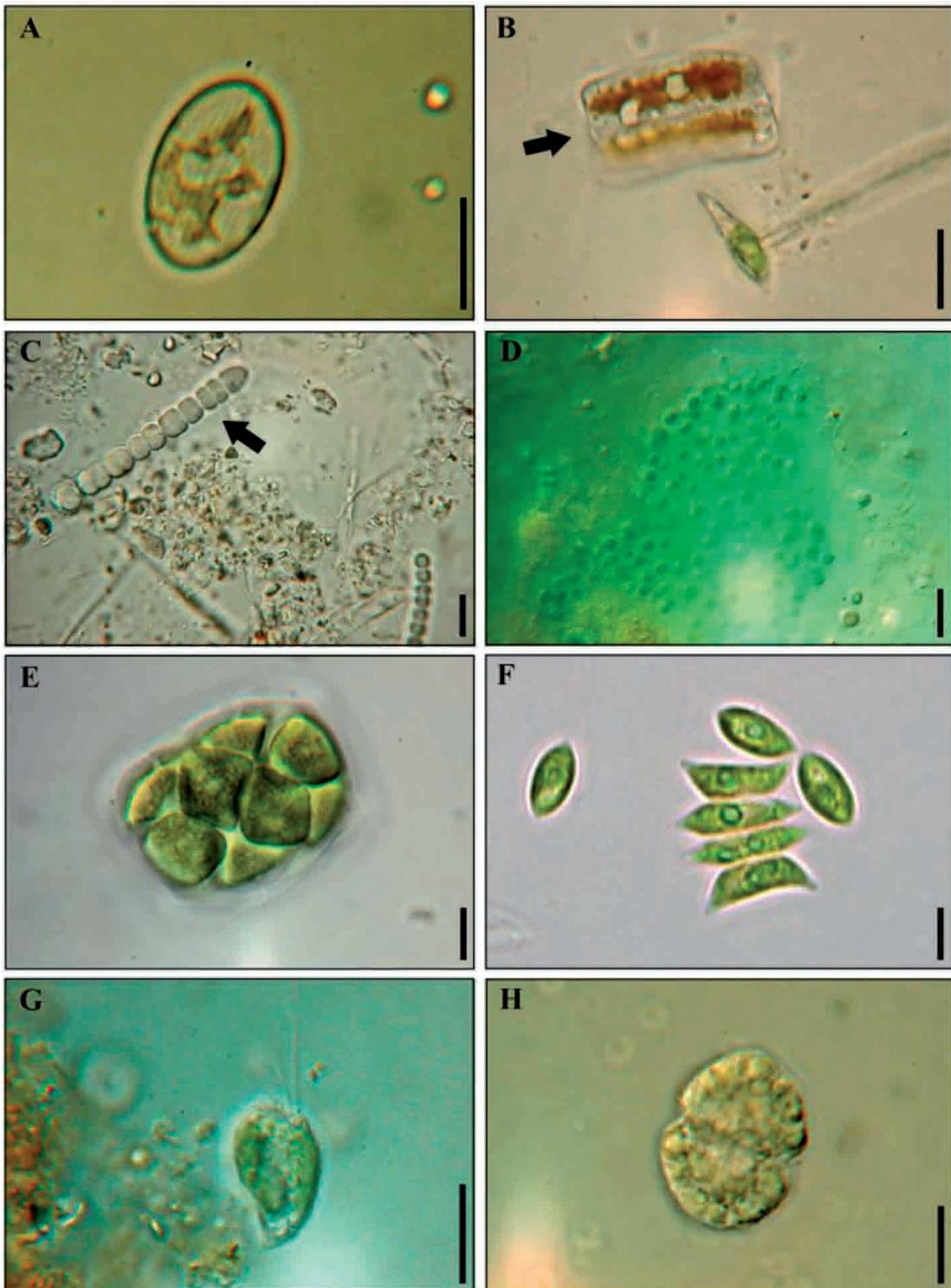


Figura 1. Microalgas frecuentes en cuerpos de agua continentales. A-B: diatomeas. A. *Cocconeis* sp.; B. *Epithemia* sp. (flecha); C-D: cianobacterias. C. *Anabaena* sp. (flecha), D. *Microcystis* sp.; E-F: algas verdes. E. *Pandorina* sp.; F. *Scenedesmus* sp. (gentileza de la Dra. Ángela Juárez, FCEyN, UBA); G: oocfita; H: dinoflagelado.

La relación entre las algas y el medio que las rodea (su ecología) comenzó a interesar a los investigadores desde que pudieron observarlas al microscopio (descubierto por A. van Leewenhoek en el siglo XVII) y ya en el siglo XVIII, Wahl (1876) publica un artículo sobre algunas de sus aplicaciones.

¿QUÉ INFORMACIÓN PUEDEN APORTAR LAS MICROALGAS?

En la fase de inhalación profunda, las microalgas que están suspendidas en el agua ingresan al cuerpo, penetran la barrera capilar-alveolar y las que son menores que 30 μ m (enteras o fragmentadas) podrán ser transportadas por circulación activa, a través de los capilares, a diferentes órganos y tejidos donde finalmente se acumulan (Lunetta, Penttilä & Hällfors, 1998; Pollanen, 1997; Sidari, Di Nunno & Melato, 1999). De esta manera, en los distintos órganos de una víctima de muerte por sumersión se podrán encontrar algas o restos de algas que vivían en el lugar donde se produjo el deceso.

V. Ravenstorf, en 1904, fue el primero en proponer el uso de algas con cubiertas silicificadas (diatomeas) para el diagnóstico de muerte por sumersión (Ludes & Coste, 1996).

¿QUÉ ÓRGANOS SE UTILIZAN PARA EL ANÁLISIS?

Como mencionamos en el apartado anterior, las microalgas ingresan al cuerpo por circulación activa y se acumulan en órganos tan distantes entre sí como el cerebro, los riñones, los pulmones y la médula ósea (Ludes & Coste, 1996).

La mayoría de las investigaciones realizadas para determinar muerte por sumersión mediante el estudio de diatomeas utilizan como principales órganos a los pulmones, los riñones, el bazo y el cerebro. Los pulmones son el primer lugar donde se esperaría encontrar microalgas pero allí también se pueden acumular las que son transportadas por el aire y que fueron inhaladas por la víctima a lo largo de su vida. Si bien el análisis de las algas recuperadas del tejido pulmonar no tendría, entonces, un gran valor diagnóstico, Auer y Möttönen (1988) concluyen, a partir del estudio de 107 cuerpos y manteniendo las condiciones adecuadas para evitar contaminación, que si no se hallan diatomeas en los pulmones tampoco se hallarán en los demás órganos.

Cuando el cuerpo se encuentra en avanzado estado de descomposición, el tejido más apropiado para analizar es la médula ósea debido a que el hueso recubre y aísla a la médula de cualquier contaminación externa mientras esté en el agua y se mantenga intacto (Chandrasiri, 2001; Pollanen, 1997).

Hürliemann *et al.* (2000) comprobaron que la proporción de microalgas que ingresan a órganos como pulmón, duodeno y estómago es de 10 o 100 veces menor que la del agua donde fue hallado el cuerpo, y que continúan disminuyendo en un orden entre 100 y 1000 al llegar a la cavidad cardíaca, los riñones y la médula ósea. Bortolotti, Del Balzo & Tagliaro (2011) también encontraron una diferencia

significativa entre el número de diatomeas recuperadas del pulmón y las halladas en una muestra de médula ósea esternal.

Desde el trabajo pionero de Ravenstorff, el diagnóstico de muerte por sumersión se realizó casi exclusivamente mediante la búsqueda de cubiertas celulares (o fragmentos de ellas) de las diatomeas, por lo que se denominó «test de diatomeas».

Este test ha sido aceptado por muchos autores (Hendey, 1973; Neidhart & Greendyke, 1967; Pachar & Cameron, 1992; Peabody, 1977, 1980; Timpermann, 1972) pero no hay una aceptación total de que las diatomeas puedan ser indicadores precisos de muerte por sumersión, ya que hay reportes que también indican que pueden ser encontradas en órganos de personas fallecidas por causas diferentes (Foged, 1983; Gylseth, Mowé & Watson, 1979; Schellmann & Sperl, 1979). Sin embargo, Díaz-Palma, Alucema & Maidana (2009) consideran razonable suponer que esos casos representan falsos positivos debidos ya sea a contaminación de las muestras o al estilo de vida de la víctima (nadador de mar o de río, por ejemplo). Solo recientemente se incorporaron al diagnóstico, como otras evidencias, los restos de cubiertas de otras microalgas que también viven en los cuerpos de agua, por lo que estos últimos autores proponen denominarlo «test de microalgas».

Al analizar la bibliografía, llama la atención la falta de estandarización respecto a qué órganos se van a estudiar y cómo se los va a procesar para realizar el test, ya que a lo largo de los años se cuestionan los resultados arrojados por este análisis sin que haya un estudio riguroso que los avale.

PROTOCOLO DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS EN LOS LABORATORIOS FORENSES

1. Preparación del material

a) Preparación de agua destilada libre de diatomeas (ALD).— Como el perito debe tener la seguridad de que, si encuentra microalgas en las muestras que va a analizar, estas sólo hayan ingresado al cuerpo por circulación activa y como consecuencia del fenómeno de sumersión, todo el material que se use para este test deberá ser lavado previamente con agua destilada que no contenga diatomeas (ALD) ni restos de otras algas.

Para esto, lo recomendable es utilizar agua microfiltrada, que se puede comprar o se la puede preparar filtrando agua destilada con un filtro de fibra de vidrio o teflón, de poro no mayor de $0,45 \mu\text{m}$. No conviene utilizar papel de filtro porque puede contener diatomeas procedentes de la pasta de papel (Teschke & Demers, 2001). Si no se pudiera realizar el filtrado, entonces, y como último recurso, se puede dejar decantar agua destilada, por 12 h y protegida del polvo ambiental, en un recipiente previamente lavado y enjuagado 3 veces (también con agua destilada). Después de ese tiempo, se puede utilizar el agua de la parte superior del recipiente, cuidando de no agitarla. Esto es porque, como las microalgas son más pesadas que el agua, caerán rápidamente por su peso y se depositarán en el fondo del recipiente.

b) Lavado de las herramientas.— Las herramientas que se destinen para este test **no** deben haber sido usadas para otros fines porque podrían haberse contaminado.

Todas las herramientas y materiales no descartables que se vayan a utilizar deberán haber sido mantenidos en remojo, al menos 24 h, en una solución preparada con 100 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y 900 ml de agua destilada, a aproximadamente 80-90°C.

Luego de transcurrido ese tiempo, se enjuaga el material 3 o 4 veces con agua destilada y finalmente, se le dan 2 enjuagues con ALD. Todo puede dejarse secar a temperatura ambiente siempre protegido del polvo. Nunca debe usarse papel para el secado, pero si fuera necesario realizar un secado rápido, salvo que el material sea plástico, se puede usar una estufa.

Una vez seco, el material debe guardarse protegido del polvo ambiental, por ejemplo, envuelto en papel de aluminio.

2. Obtención de las muestras

En todos los casos, y si el volumen de muestra lo permite, lo ideal es guardar una parte de cada una como copia de resguardo. Todas las muestras, una vez colocadas en el recipiente adecuado, deberán conservarse refrigeradas hasta su envío al perito correspondiente.

a) Tejidos cadavéricos.— *i) Médula ósea.* Una vez seleccionado el hueso para el análisis (esternón, fémur, húmero), debería ser lavado cuidadosamente con ALD, antes de abrirlo y antes de extraer la médula con una herramienta adecuada (previamente lavada como se indicó en el apartado anterior), con el fin de no contaminar la muestra.

La muestra será colocada en un frasco rotulado que haya sido previamente lavado con ALD, secado y pesado, es conveniente que el frasco ya contenga algún disolvente de tejidos, previamente testeado para asegurarse de que no contenga microalgas. Luego de colocada la muestra de tejido en su interior, el frasco deberá ser pesado nuevamente a fin de calcular el peso de muestra obtenido. Este dato deberá figurar en el recipiente que se envíe al perito.

ii) Sangre. Si el corazón no contuviera un volumen adecuado de sangre en su interior, lo ideal es realizar un lavado de la cavidad cardíaca con ADL, utilizando jeringas descartables. Se debe rotular el envase, registrando el volumen de líquido extraído del cuerpo.

Si fuera necesario adicionar algún anticoagulante, deberá controlarse que este también esté libre de microalgas. Para verificarlo, se pueden centrifugar unos 10ml del reactivo a utilizar, descartar el sobrenadante y observar el residuo bajo microscopio, con un aumento de, al menos, 400X. En un caso que analizamos en nuestro laboratorio, verificamos la presencia de dinoflagelados en una muestra de EDTA, usado regularmente como anticoagulante en un laboratorio forense).

iii) *Otros órganos (hígado, riñón, pulmón, etc.)*. El órgano a analizar deberá lavarse una vez extraído, con ALD. Con una herramienta adecuada, libre de microalgas, se cortará una porción de tejido de, aproximadamente, 2cm³ y se la colocará en un recipiente limpio, previamente pesado y rotulado.

3. Muestras del lugar del hecho

En el caso de hallar restos de microalgas en los tejidos cadavéricos, es conveniente comparar las especies encontradas con las que regularmente viven en el lugar donde se halló el cuerpo a fin de determinar si, efectivamente, ese fue el lugar donde se produjo el deceso. Para esto, se deberán obtener muestras de agua y sedimento.

Es muy importante que las muestras se tomen cuando se recupera el cuerpo de la víctima, ya que los ambientes acuáticos sufren cambios estacionales o interanuales.

Como respuesta a estos cambios, también la composición de especies en general y la de los ensambles de especies dominantes, en particular, en cada época del año suelen presentar diferencias (Round, 1971; Stevenson, Pan & van Dam, 2010), no sólo porque ocurren reemplazos en las especies de algas que viven en el lugar sino porque también aparecen (vivas o muertas) las que son transportadas por la corriente en diferentes momentos del año.

Es conveniente que se informe al perito el tipo de ambiente del que proceden las muestras (lago, laguna, río, arroyo, etc.) y sus características más relevantes (profundidad aproximada, presencia de vegetación marginal, velocidad de la corriente, etc.).

a) Muestras de agua.— Deberá utilizarse un envase limpio de 1 o 2l de capacidad. Antes de llenarlo deberá ser enjuagado previamente 2 veces con agua del lugar, cuidando de no remover los sedimentos del fondo.

Lo ideal, y dependiendo de las posibilidades, sería extraer un cubo o balde de agua de unos 5 o 10l de capacidad, de un sitio no muy próximo a la orilla y usar una parte para enjuagar el envase y el resto para el análisis. De esa manera, se evita la remoción de los sedimentos del fondo que podrían agregar elementos extraños a la muestra que se va a analizar.

Para preservar esta muestra deberán agregársele, aproximadamente, 40ml de formaldehído puro (formol) por cada litro de muestra.

Deberá rotularse el frasco con la fecha y el nombre del sitio del que se obtuvo la muestra.

b) Muestras de sedimento.— En algunos casos, sobre todo si se trata de ambientes poco profundos, es adecuado analizar también el contenido de microalgas del barro de la orilla de un cuerpo de agua. Esto podría servir también para comparar lo hallado, por ejemplo, en las suelas de los zapatos, en las ruedas, la cajuela o baúl del automóvil de un sospechoso.

Lo ideal es que el lugar del que provenga la muestra esté cubierto de agua y a más de 15cm de profundidad. La muestra se puede tomar por arrastre de un frasco limpio de boca ancha o con una espátula o una cuchara, todo previamente lavado con ALD.

Para la preservación también deberán agregarse aproximadamente 20-30 ml de formol y agitar para que se mezcle bien.

El envase deberá rotularse indicando el tipo de muestra obtenida (agua, sedimento, rocas, etc.), la fecha y el nombre del sitio donde se obtuvo.

4. Envío de las muestras

Las muestras deberán conservarse preferentemente en frío y oscuridad, en sus recipientes bien cerrados y convenientemente rotulados, hasta que puedan ser enviadas al perito que realizará los análisis.

Para su transporte se recomienda cuidar el embalaje para minimizar la posibilidad de pérdidas de material.

Antes de su envío deberá controlarse que las botellas conteniendo agua del lugar del hallazgo del cuerpo estén perfectamente cerradas para que no haya filtraciones del líquido.

PROBLEMÁTICAS A LA HORA DE ELEGIR UN MÉTODO APROPIADO PARA DIGERIR LAS MUESTRAS

Las metodologías clásicas para eliminar la materia orgánica de las muestras, tanto de tejidos como las del lugar del hallazgo del cuerpo son las descriptas, por ejemplo, en Ludes y Coste (1996) o en Battarbee (1986). Estas técnicas incluyen el uso de ácidos fuertes (sulfúrico, nítrico, oxálico, etc.) solos o combinados con otros reactivos o métodos de digestión enzimática. En la literatura se encuentran también algunas propuestas alternativas, como la de Terazawa y Takehiro (1980) que proponen separar el plancton mediante una centrifugación en un gradiente coloidal de sílice. Estos autores señalan que un inconveniente de este método sería la rotura de los especímenes más frágiles durante la centrifugación y la homogeneización mecánica.

Fukui, Hata y Matsubara (1980) desarrollaron una metodología que involucra irradiación ultrasónica de la muestra de tejido previamente solubilizada con Soluene® y que requiere menos tiempo que las técnicas que emplean ácidos fuertes. Matsumoto y Fukui (1993) utilizan una metodología similar, pero irradiando a 60°C.

Ming, Meng y Wang (2007) señalan que para evaluar el método más apropiado para digerir las muestras biológicas el procedimiento debe ser simple, seguro y rápido; los reactivos a utilizar deben ser baratos y estar libres de diatomeas; el daño que el tratamiento provoque a las diatomeas debe ser mínimo y los residuos orgánicos que puedan quedar luego de la digestión no deben obstaculizar la visualización de las microalgas al microscopio. Estos autores compararon cuatro métodos de digestión diferentes, combinando ácido nítrico con peróxido de hidrógeno; el

método de la proteinasa K descrito por Kobayashi *et al.* (1993) y utilizado también por Ludes, Quantin & Mangin, (1994), el del ácido nítrico en recipiente de teflón (Yange, Chuanying & Xu, 1999) y el que utiliza Soluene®-350 (Sidari *et al.*, 1999). Según Ming *et al.* (2007), la metodología que reúne los requisitos antes mencionados es el de la proteinasa K (aunque no tienen en cuenta que no es un reactivo barato) y señalan también que el mejor sustituto podría ser la digestión con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, y que el Soluene®-350 no debería ser usado para muestras marinas ya que encontraron que el grado de degradación del material fue elevado.

Para Díaz-Palma *et al.* (2009) el método óptimo es la combinación de la digestión con ácidos y proteinasa K, tanto para muestras de agua como de tejidos. La metodología propuesta por ellos permite recuperar no solo cubiertas de diatomeas sino también de dinoflagelados, silicoflagelados y clorofitas. Otros autores, como Digiancamillo, Domeneghini & Cattaneo (2011) prefieren la combinación de ácido clorhídrico con peróxido de hidrógeno por ser una opción más barata y rápida que el uso de proteinasa K. Fucci (2012) propone la utilización de ácido sulfúrico diluido al 30% como una opción económica y que posibilita la observación en el microscopio de otros organismos microscópicos como por ejemplo radiolarios y, años más tarde, Fucci *et al.* (2015) proponen utilizar sólo peróxido de hidrógeno ya que con este método obtuvieron una mejor preservación de las diatomeas, tanto en agua de mar como de lagos y ríos.

En nuestro laboratorio utilizamos para procesar las muestras de médula ósea un disolvente de tejidos similar al Soluene®-350, que funciona también con muestras recuperadas de ambientes marinos y los métodos tradicionales para los otros órganos.

Una vez procesadas las muestras confeccionamos preparaciones permanentes para su observación con microscopio óptico. Para esto utilizamos distintos medios de montaje con alto índice de refracción, tales como resinas sintéticas (Naphrax® o Zrax®) o naturales (estoraque o melaza de maíz). El microscopio a utilizar debe ser de óptima calidad para poder capturar las imágenes más detalladas que permitan la identificación de hasta los menores fragmentos (Fig. 2).

Los métodos descritos anteriormente no son usados en forma sistemática por todos los profesionales y plantean la necesidad de realizar más pruebas para encontrar una metodología óptima de tratamiento de las muestras de tejidos, de uso universal que permita la aplicación de un protocolo estandarizado y de esta manera obtener resultados comparables que reduzcan al mínimo la posible aparición de falsos negativos.

¿ES CONFIABLE EL TEST DE DIATOMEAS/MICROALGAS?

En la literatura podemos hallar numerosas citas de falsos resultados negativos y positivos.

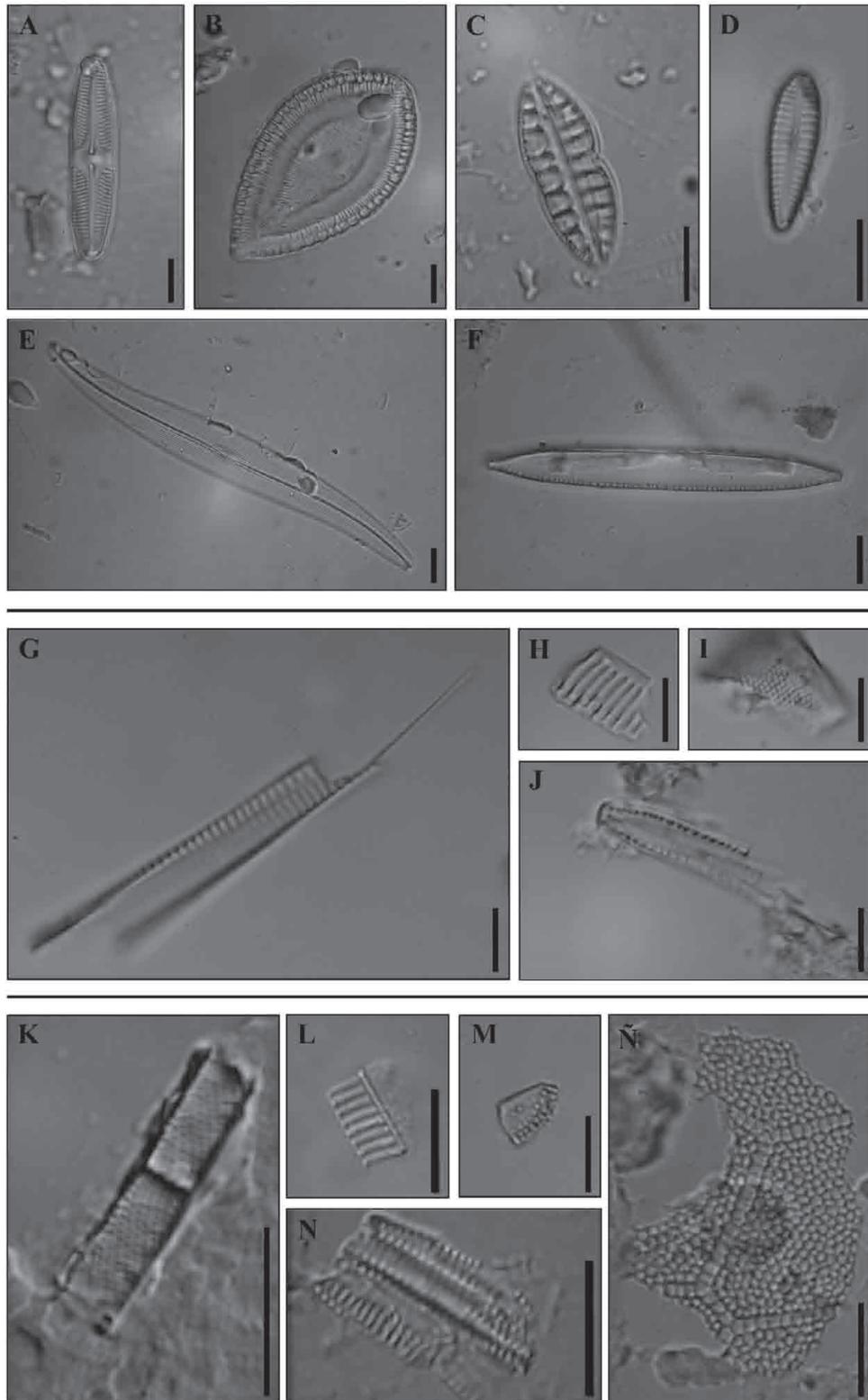


Figura 2. Microalgas recuperadas en el curso de distintos peritajes realizados en el Laboratorio de Diatomeas Continentales (FCEyN-UBA). A-F: cubiertas celulares silíceas (valvas) de diatomeas en muestras procesadas de sedimento y agua. A: *Pinnularia* sp., B: *Surirella ovalis*; C: *Epithemia* sp.; D: *Gomphonema* sp., E: *Gyrosigma* sp.; F: *Nitzschia* sp.; G-Ñ: restos de cubiertas de algas recuperadas de muestras de tejidos cadavéricos. G- J: lavado de cavidad cardíaca (fragmentos de distintas diatomeas). K-Ñ médula ósea. K-N: cubiertas completas (K) y fragmentos de diatomeas (L-N); Ñ: fragmento de la cubierta celular celulósica de un dinoflagelado. Escala 10 μ m.

FALSOS POSITIVOS

Romero Palanco (2007) realizó un listado de posibles fuentes de contaminación en el test de diatomeas:

I) *Ante-mortem*.— Puede darse a partir de la ingesta de algunos vegetales, mariscos y pescados que pueden tener en su superficie un gran número de diatomeas (Yen & Jayaprakash, 2007) o en bebidas, como cerveza o vino, que hayan sido filtradas usando tierra de diatomeas.¹ También puede ocurrir por la inhalación de valvas de diatomeas en suspensión en el aire, por ejemplo, en fábricas de materiales de construcción y de aislantes, en pinturas, papel y al fumar cigarros (Langer, Mackler & Selikoff, 1971) ya que se podrían encontrar en la superficie de las hojas del tabaco cuando se estiban sobre el suelo.

II) *Post-mortem*.— Ludes y Coste (1996) señalan 3 posibles vías de penetración de diatomeas en el cuerpo de una víctima de sumersión: a) por maniobras de reanimación (intubación y ventilación), que fuerzan al agua de sumersión hacia las vías aéreas; b) penetración de agua con alta presión hidrostática por una sumersión prolongada y c) ingreso a través de heridas provocadas en vida. De cualquier manera, en los 3 casos, las algas del medio de sumersión podrían llegar a dar falsos positivos en cavidad cardíaca pero no llegarían a la médula ósea.

III) Durante la preparación de las muestras.— Por no realizar los lavados correspondientes del material e instrumentos con los que se van a manipular las muestras; no testear la pureza de los reactivos y del agua a utilizar y por contacto de la muestra con las ropas del cadáver mientras se realiza la autopsia.

La fiabilidad del diagnóstico depende, indefectiblemente, de bajo qué circunstancias se realizó la extracción de las muestras y de los recaudos tomados durante su procesamiento para evitar cualquier tipo de contaminación. Esto implica la necesidad de trabajar bajo un estricto protocolo (Lunetta, Miettinen & Sajantila 2013; Maidana, 2013). También es importante realizar la comparación de los resultados obtenidos del análisis de tejidos cadavéricos con las muestras del lugar del hecho y esto debe ser llevado a cabo por un especialista en el tema.

FALSOS NEGATIVOS

Estos pueden aparecer, por ejemplo, si la concentración de diatomeas en el medio de sumersión era baja; si la cantidad de líquido inhalado era escasa o si la metodología empleada para digerir las muestras pudo promover la fragmentación o la disolución de los frústulos (Romero Palanco, 2007).

Distintos autores plantean diferentes cifras para considerar un resultado como positivo, Auer y Möttönen (1988) proponen como mínimo 20 diatomeas por mues-

¹ Romero Palanco (2007) traduce erróneamente la palabra alemana *kieselgur* como «silicagel».

tra de pulmón (a partir del procesamiento de 100g de tejido). Ludes *et al.* (1999) sugieren como positivo la identificación de 20 diatomeas por cada 100 μ l de *pellet* obtenido de 10g de pulmón, en cambio para otros órganos considera positivo el resultado si se determinan más de 5 diatomeas completas (2 valvas), sin considerar a los fragmentos. Farrugia y Ludes (2011) consideran 20 diatomeas por 100 μ l de *pellet* extraído de 2g de muestra de pulmón y 5 diatomeas completas (sin incluir fragmentos) por cada 100 μ l de *pellet* extraído de 2g de otros órganos como cerebro, riñón, hígado y médula ósea.

Actualmente la Ficología Forense está ampliando su campo de aplicación y se comienza a vincular también con otras áreas de la Biología, por ejemplo, la Genética Molecular. Autores como Abe *et al.* (1996); Kane, Fukunaga & Nishi (1996) y Rącz *et al.* (2016), entre otros, han empleado *primers* de cianobacterias (por ejemplo, *Synechococcus* sp.), de diatomeas (como *Melosira* sp.) y algas verdes (*Staurastrum* sp.) para el diagnóstico de muerte por sumersión, en caso en que la observación microscópica tradicional arrojará resultados negativos. De esta manera, se busca evitar dar falsos negativos a través del uso de un mayor número de indicadores. Esta metodología todavía no se ha utilizado en médula ósea sino en otros órganos como bazo, hígado o riñón, a pesar de que estos son más fácilmente contaminables y pueden dar lugar a falsos positivos.

ANÁLISIS DE SEDIMENTO EN ROPAS Y CALZADO

La comparación de las algas recuperadas de la vestimenta y pertenencias del sospechoso de haber cometido un delito ayudan a relacionarlo con la escena. A través de la identificación taxonómica de los especímenes encontrados se pueden conocer las preferencias ecológicas de las especies y esta información permite inferir las condiciones ambientales de donde proceden.

Las diatomeas son algas con un amplio rango de distribución geográfica y pueden vivir tanto en ambientes acuáticos como terrestres. La posibilidad de que ocurra la transferencia de las diatomeas desde el ambiente a la ropa es relativamente alta y ocurre luego de un breve contacto con el agua o los sedimentos. Además, como son microscópicas, el sospechoso no visualiza esta transferencia y, a menos que sea un experto, no alterará maliciosamente la evidencia (Scott, Morgan & Cameron, 2014).

Uitdehaag, Dragutinovic y Kuiper (2010) probaron, en prendas de algodón, tres técnicas diferentes de recuperación de diatomeas y, de acuerdo a sus resultados, recomiendan la extracción con etanol para estudios destinados a determinar la fuente específica de agua, a pesar de que con este método quedan fibras de algodón que pueden obstaculizar la visualización de las diatomeas al microscopio.

Por su parte, Scott *et al.* (2014), luego de comparar otros tres métodos de extracción de diatomeas a partir de ropas, recomiendan el uso del peróxido de hidrógeno como el método más eficaz para recuperar un mayor número tanto de individuos como de las especies más representativas.

Levin, Morgan y Jones (2017) realizaron estudios de diatomeas sobre calzado de cuero, lona y gamuza y concluyeron que, aunque el tiempo de contacto con el agua hubiera sido breve, quedaba retenido un número importante de diatomeas en todos los tipos de materiales.

Scott, Morgan y Bull (2017) comentan que a pesar de que actualmente se busca recuperar diatomeas de ropas como superficie con evidencias, debe tenerse en cuenta otras superficies como el calzado, ya que la suela provee contacto directo con cualquier comunidad bentónica de diatomeas cuando el perpetrador o la víctima están en contacto con el agua.

Una vez detectada la presencia de microalgas en ropa, calzado, etc., se compara lo hallado con las especies recuperadas del lugar del hecho, a fin de determinar si el sospechoso tuvo contacto con el sedimento o agua de ese lugar o no. Existen diferentes técnicas de extracción, como por ejemplo sumergir la prenda en agua libre de diatomeas o aplicarle directamente peróxido de hidrógeno y calor (Levin *et al.*, 2017).

Tomando en cuenta la naturaleza silíceica de la cubierta celular de las diatomeas que le confiere resistencia al calor, Scott *et al.* (2017) analizaron la potencial recuperación de diatomeas de la ropa luego de una exposición al fuego. Esto se realizó rozando varias veces una platina especial con un disco de adhesivo de carbono en el extremo contra la superficie de la ropa. La observación de estas muestras con el microscopio electrónico de barrido (MEB) reveló que la morfología de las diatomeas no era afectada luego de una exposición breve a temperaturas de hasta 850°C. Jansma (1984) había señalado que las diatomeas presentes en piezas de alfarería prehistórica no se destruían si habían sido sometidas a temperaturas inferiores a los 800°C aunque para Håkansson y Hulthén (1986), la sílice de la pared celular de las diatomeas podría resistir temperaturas hasta 925°C. El MEB permite observar las diatomeas con aumentos mucho mayores que en el microscopio óptico y no es una técnica destructiva, por lo tanto, permite una mayor precisión en la identificación de las especies.

¿PUEDE DETERMINARSE EL INTERVALO DE SUMERSIÓN *POST-MORTEM* (ISPM)?

La descomposición de un cuerpo sumergido cumple con las mismas etapas destructivas que aquel que se encuentra en tierra, (períodos cromático, enfisematoso y reductivo) y se les suma un proceso de tipo conservador, que es la saponificación o adipocira (Raffo, 1980). La tasa de progresión de estas etapas está influenciada por numerosas variables tales como la temperatura del agua, si el cuerpo estuvo totalmente sumergido o no y si estuvo sometido a la acción de olas o corrientes (Keiper & Casamatta, 2001; Haefner, Wallace & Merritt, 2004; Pollanen, 1997). Estas variables dificultan considerablemente la posibilidad de determinar el ISPM solo con el análisis de la ficoflora.

Cuando un cuerpo permanece sumergido un tiempo considerable, es posible que su superficie sea colonizada por organismos bentónicos, formando películas

denominadas *biofilms* o *algal mats*. No hay suficientes estudios sobre cómo colonizan las algas los cuerpos sumergidos, formando los *biofilms* y cómo es la sucesión de las poblaciones de algas sobre esos cuerpos. Según Raffo (1980), el crecimiento algal podría verse afectado por la contextura del sujeto, presencia y tipo de vestimenta, si hubo exposición temporaria al aire, características del cuerpo de agua (profundidad, temperatura, velocidad de la corriente, composición química, etc.). Por tal motivo, se necesitaría, en cada caso, realizar estudios experimentales en el lugar (Rohner & Rothschild, 2013).

Por lo tanto, el uso de las microalgas para determinar el PMSI sigue siendo un tema pendiente (Horton, Boreham & Hillier, 2006; Zimmerman & Wallace, 2008).

PERSPECTIVAS A FUTURO

En Sudamérica y, en particular, en Argentina no se ha realizado, hasta el momento, ningún tipo de investigación relacionada con la Ficología forense. Quedan muchos temas pendientes de investigar, como por ejemplo el tiempo de desarrollo de diferentes *biofilms* en sistemas acuáticos para determinar el ISPM o la aplicabilidad de técnicas moleculares en médula ósea para el diagnóstico de muerte por sumersión.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Lic. Andrea Rotschild y a la Srta. Celeste Romero, del Cuerpo Médico Forense (Buenos Aires, Argentina), por facilitarnos el acceso a varias publicaciones relevantes para este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Abe, S., Suto, M., Nakamura, H., Gunji, H., Hiraiwa, K., Suzuki, T., Hoshiai, G. (2003). A Novel PCR Method for Identifying Plankton in Cases of Death by Drowning. *Medicine, Science and the Law*, 43(1), 23-30. doi: 10.1258/rs-mmsl.43.1.23
- Auer, A., & Möttönen, M. (1988). Diatoms and drowning. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 101(2), 87-98. doi: 10.1007/BF200290
- Battarbee, R. W. (1986). Diatom Analysis. In B. E. Berglund (Ed.), *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology*, (pp. 527-570). New York: J. Wiley and Sons Ltd., New York.
- Bierens, J., Lunetta, P., Tipton, M. & Warner, D. (2016). Physiology of Drowning: A Review. *Physiology*, 31(2), 147-166. doi: 10.1152/physiol.00002.2015
- Bortolotti, F., Del Balzo, G., Calza, R., Valerio, F. & Tagliaro, F. (2011). Testing the specificity of the diatom test: search for false-positives. *Medicine, Science and the Law*, 51(1_suppl), 7-10. doi: 10.1258/msl.2010.010057

- Chandrasiri, N. (2001). Detection of diatoms in the marrow of thigh bones as evidence of death by drowning. *Ceylon Medical Journal*, 46(4), 145-146. doi: 10.4038/cmj.v46i4.6465
- Concheiro Carro, L. & Suárez Peñaranda, J. M. (2004). Asfixias mecánicas. En J. A. Gisbert Calabuig & E. Villanueva Cañadas (Ed.), *Medicina Legal y Toxicología*, 6ª ed. (pp. 460-478). Barcelona: Masson.
- Díaz-Palma, P., Alucema, A., Hayashida, G. & Maidana, N. (2009). Development and standardization of a microalgae test for determining deaths by drowning. *Forensic Science International*, 184(1-3), 37-41. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.11.015
- DiGiancamillo, A., Domeneghini, C., Gibelli, D. & Cattaneo, C. (2011). Diatom extraction with HCl from animal tissues: A technical note. *Legal Medicine*, 13(5), 268-271. doi: 10.1016/j.legalmed.2011.05.005
- Farrugia, A. & Ludes, B. (2011). Diagnostic of drowning in forensic medicine. In D. N. Vieira (Ed.), *Forensic Medicine-From Old Problems to New Challenges* (pp. 53-60). Rijeka, Croatia: IntechOpen.
- Foged, N. (1983). Diatoms and drowning—once more. *Forensic Science International*, 21(2), 153-159. doi: 10.1016/0379-0738(83)90104-4
- Fucci, N. (2012). A New Procedure for Diatom Extraction in the Diagnosis of Drowning. *Journal of Clinical and Experimental Pharmacology*, 02(01), 1-3. doi: 10.4172/2161-1459.1000110
- Fucci, N., Pascali, V., Puccinelli, C., Marcheggiani, S., Mancini, L. & Marchetti, D. (2015). Evaluation of two methods for the use of diatoms in drowning cases. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 11(4), 601-605. doi: 10.1007/s12024-015-9708-2
- Fukui, Y., Hata, M., Takahashi, S. & Matsubara, K. (1980). A new method for detecting diatoms in human organs. *Forensic Science International*, 16(1), 67-74. doi: 10.1016/0379-0738(80)90181-4
- Graham, J., Graham, L. & Wilcox, L. (2009). *Algae* (2nd ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Gylseth, B., Mowé, G. & Watson, A. (1979). Diatoms in lung tissue. *The Lancet*, 314(8156-8157), 1375. doi: 10.1016/S0140-6736(79)92865-4
- Haefner, J., Wallace, J. & Merritt, R. (2004). Pig Decomposition in Lotic Aquatic Systems: The Potential Use of Algal Growth in Establishing a Postmortem Submersion Interval (PMSI). *Journal of Forensic Sciences*, 49(2), 330-336. doi: 10.1520/JFS2003283
- Håkansson, H. & Hulthén, B. (1986). On the dissolution of pottery for diatom studies. *Norwegian Archaeological Review*, 19(1), 34-38. doi: 10.1080/00293652.1986.9965428
- Hendey, N. (1973). The Diagnostic Value of Diatoms in Cases of Drowning. *Medicine, Science and The Law*, 13(1), 23-34. doi: 10.1177/002580247301300103
- Horton, B., Boreham, S. & Hillier, C. (2006). The Development and Application of a Diatom-Based Quantitative Reconstruction Technique in Forensic Science. *Journal of Forensic Sciences*, 51(3), 643-650. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00120.x

- Hürlimann, J., Feer, P., Elber, F., Niederberger, K., Dirnhofer, R. & Wyler, D. (2000). Diatom detection in the diagnosis of death by drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 114(1-2), 6-14. doi: 10.1007/s004149900122
- Idris, A., Berg, R., Bierens, J., Bossaert, L., Branche, C., Gabrielli, A., ... Timmerman, S. (2003). Recommended Guidelines for Uniform Reporting of Data from Drowning. *Circulation*, 108(20), 2565-2574. doi: 10.1161/01.CIR.0000099581.70012.68
- Jansma, M. J. (1984). Diatom analysis of prehistoric pottery. In D. G. Mann (Ed.), *Proceedings of the 7th International Diatom Symposium at Koenigstein*, 529-536. Koenigstein, Germany: O. Koeltz.
- Kane, M., Fukunaga, T., Maeda, H. & Nishi, K. (1996). The detection of picoplankton 16S rDNA in cases of drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 108(6), 323-326. doi: 10.1007/BF02432130
- Keiper, J., & Casamatta, D. (2001). Benthic organisms as forensic indicators. *Journal of the North American Benthological Society*, 20(2), 311-324. doi: 10.2307/1468325
- Kobayashi, M., Yamada, Y., Zhang, W., Itakura, Y., Nagao, M. & Takatori, T. (1993). Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method. *Forensic Science International*, 60(1-2), 81-90. doi: 10.1016/0379-0738(93)90095-R
- Langer, A., Mackler, A., Rubin, I., Hammond, E. & Selikoff, I. (1971). Inorganic Particles in Cigars and Cigar Smoke. *Science*, 174(4009), 585-587. doi: 10.1126/science.174.4009.585
- Levin, E., Morgan, R., Scott, K. & Jones, V. (2017). The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: An experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. *Science & Justice*, 57(5), 349-360. doi: 10.1016/j.scijus.2017.05.005
- Ludes, B., Quantin, S., Coste, M. & Mangin, P. (1994). Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 107(1), 37-41. doi: 10.1007/BF01247273
- Ludes, B. & Coste, M. (1996). *Diatomees et Meidecine Leigale*. Paris: Tec & Doc Lavoisier.
- Ludes, B., Coste, M., North, N., Doray, S., Tracqui, A. & Kintz, P. (1999). Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 112(3), 163-166. doi: 10.1007/s004140050224
- Lunetta, P., Penttilä, A. & Hällfors, G. (1998). Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning. *International Journal of Legal Medicine*, 111(5), 229-237. doi: 10.1007/s004140050159
- Lunetta, P., Miettinen, A., Spilling, K. & Sajantila, A. (2013). False-positive diatom test: A real challenge? A post-mortem study using standardized protocols. *Legal Medicine*, 15(5), 229-234. doi: 10.1016/j.legalmed.2013.03.002
- Maidana, N. I. (2013). El test de diatomeas en el diagnóstico de muerte por sumersión. *Acta Nova*, 6(1-2), 70-81.

- Matsumoto, H. & Fukui, Y. (1993). A simple method for diatom detection in drowning. *Forensic Science International*, 60(1-2), 91-95. doi: 10.1016/0379-0738(93)90096-S
- Ming, M., Meng, X. & Wang, E. (2007). Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. *Forensic Science International*, 170(1), 29-34. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.08.022
- Neidhart, D. & Greendyke, R. (1967). The Significance of Diatom Demonstration in the Diagnosis of Death by Drowning. *American Journal of Clinical Pathology*, 48(4), 377-382. doi: 10.1093/ajcp/48.4.377
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Informe mundial sobre los ahogamientos: prevenir una importante causa de mortalidad*. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251498/9789243564784-spa.pdf;jsessionid=8E463CC5F4060FCEB9245634350AE7E3?sequence=1>
- Pachar, J. & Cameron, J. (1992). Submersion Cases: A Retrospective Study —1988–1990. *Medicine, Science and the Law*, 32(1), 15-17. doi: 10.1177/002580249203200105
- Peabody, A. (1977). Diatoms in Forensic Science. *Journal of the Forensic Science Society*, 17(2-3), 81-87. doi: 10.1016/S0015-7368(77)71130-2
- Peabody, A. (1980). Diatoms and Drowning—A Review. *Medicine, Science and the Law*, 20(4), 254-261. doi: 10.1177/002580248002000406
- Pollanen, M. (1997). The Diagnostic Value of the Diatom Test for Drowning, II. Validity: Analysis of Diatoms in Bone Marrow and Drowning Medium. *Journal of Forensic Sciences*, 42(2), 286-290. doi: 10.1520/JFS14112J
- Rácz, E., Könczöl, F., Tóth, D., Patonai, Z., Porpáczy, Z., Kozma, Z. ... Sipos, K. (2016). PCR-based identification of drowning: four case reports. *International Journal of Legal Medicine*, 130(5), 1303-1307. doi: 10.1007/s00414-016-1359-7
- Raffo, O. H. (1980). *La muerte violenta: lugar del hecho, examen del cadáver, autopsia médico-legal homicidios, suicidios, huellas e indicios, aspectos jurídicos*. Buenos Aires: Editorial Universidad.
- Rohner, H. & Rothschild, M. (2013). Algenrasen auf Wasserleichen zur Abschätzung der Wasserliegezeit. *Rechtsmedizin*, 23(6), 449-453. doi: 10.1007/s00194-013-0911-8
- Romero Palanco, J. (2007). Muertes por sumersión: Revisión y actualización de un tema clásico de la medicina forense. *Cuadernos de Medicina Forense*, 13(48-49). doi: 10.4321/S1135-76062007000200001
- Round, F. (1971). The growth and succession of algal populations in freshwaters. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen*, 19(1), 70-99. doi: 10.1080/05384680.1971.11903924
- Schellmann, B. & Sperl, W. (1979). Diatomeen-Nachweis im Knochenmark (Femur) Nichtertrunkener. *Zeitschrift Für Rechtsmedizin*, 83(4), 319-324. doi: 10.1007/BF01882178
- Scott, K., Morgan, R., Jones, V. & Cameron, N. (2014). The transferability of diatoms to clothing and the methods appropriate for their collection and analysis in forensic geoscience. *Forensic Science International*, 241, 127-137. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.05.011

- Scott, K., Morgan, R., Jones, V., Dudley, A., Cameron, N. & Bull, P. (2017). The Value of an Empirical Approach for the Assessment of Diatoms as Environmental Trace Evidence in Forensic Limnology. *Archaeological And Environmental Forensic Science*, 1(1), 49-78. doi: 10.1558/aefts.32474
- Sidari, L., Di Nunno, N., Costantinides, F. & Melato, M. (1999). Diatom test with Soluene-350 to diagnose drowning in sea water. *Forensic Science International*, 103(1), 61-65. doi: 10.1016/S0379-0738(99)00056-0
- Stevenson, R., Pan, Y., & van Dam, H. (2010). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*, 2, 57-85. doi: 10.1017/CBO9780511763175.005
- Tabbara, W. & Dérobert, L. (1962). Le diagnostic médico-légal de la submersion vitale par la recherche des diatomées dans la moelle osseuse. In J. Baillièrre et Fils (Eds.), *Annales de Médecine Légale et de Criminologie*, 42-43, (pp. 374-381).
- Terazawa, K. & Takatori, T. (1980). Isolation of intact plankton from drowning lung tissue by centrifugation in a colloidal silica gradient. *Forensic Science International*, 16(1), 63-66. doi: 10.1016/0379-0738(80)90180-2
- Teschke, K. & Demers, P. (2001). Industria del papel y de la pasta de papel. In Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones (Ed.), *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* (pp. 72.1-72.22). Madrid, España: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.
- Timperman, J. (1972). The diagnosis of drowning. A review. *Forensic Science*, 1(4), 397-409. doi: 10.1016/0300-9432(72)90015-5
- Uitdehaag, S., Dragutinovic, A. & Kuiper, I. (2010). Extraction of diatoms from (cotton) clothing for forensic comparisons. *Forensic Science International*, 200(1-3), 112-116. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.03.039
- Vallejo, G., Azparren, J., Sánchez de León, M., Contardi, L., & Valverde, J. (2012). Pruebas biológicas complementarias en las muertes por sumersión. *Revista Española De Medicina Legal*, 38(1), 17-27. doi: 10.1016/j.reml.2011.12.001
- Wahl, W. (1876). Infusorial earth and its uses. *Journal of the Franklin Institute*, 102(6), 407-422. doi: 10.1016/0016-0032(76)90163-0
- Yange, L., Chuanying, H., Chengxing, W., & Xu, W. (1999). Development of can for destruction of organic material in use for forensic diatom examination. *Forensic Science International*, 101(3), 163-166. doi: 10.1016/S0379-0738(98)00196-0
- Yen, L. & Jayaprakash, P. (2007). Prevalence of diatom frustules in non-vegetarian foodstuffs and its implications in interpreting identification of diatom frustules in drowning cases. *Forensic Science International*, 170(1), 1-7. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.08.020
- Zimmerman, K., & Wallace, J. (2008). The Potential to Determine a Postmortem Submersion Interval Based on Algal/Diatom Diversity on Decomposing Mammalian Carcasses in Brackish Ponds in Delaware. *Journal of Forensic Sciences*, 53(4), 935-941. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00748.x