



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE GRADO EN LICENCIATURA EN

CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTO DEL ROUNDUP FULL II SOBRE EL CICLO DE  
VIDA DE *CALLIPHORA VICINA* (DIPTERA:  
CALLIPHORIDAE)**

**Tesista: Aylin Micaela Varela Villa**

**Directora: Dra. Noelia Inés Zanetti**

2023

**EFFECTO DEL ROUNDUP FULL II SOBRE EL CICLO DE VIDA  
DE *CALLIPHORA VICINA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE GRADO EN LICENCIATURA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Firmas**



**Aylin Micaela Varela Villa**



**Noelia Inés Zanetti**

## **AGRADECIMIENTOS**

Dedico esta tesina a mi mamá y a mis hermanos, gracias por la paciencia.

A mis amigos, colegas y futuros colegas Ainhi, Estefi, Tucu, Mari, Agus, Jere, Pau, Pauli, Anto, Gabi, Jona, Eze, Fran, Eve, Jessi, Ger. Gracias totales, son el mejor grupete para cortar la semana que se pueda tener, gracias por todo lo que me enseñaron, todo lo que me dieron de comer, todos los mates, por la paciencia infinita y por siempre estar más allá de los tiempos y la distancia.

A mis amigos de la vida Flor, Mari, Mic, Jona, Peña, Megu, Pame gracias por el aguante.

A mi directora Noe muchas gracias por el tiempo, la dedicación y el acompañamiento en esta etapa. Espero que todo lo que proyectes se te cumpla.

A mi consejera Julia muchas gracias por los consejos y las recomendaciones.

Una mención especial a mi compu que después de 17 años y no poder actualizarse más, sigue prendiendo y recuperando los datos que ella misma borra a pesar de ser incompatible con la mayoría de los programas. Por favor nunca te rompas porque no te puedo cambiar.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>20</b>

## RESUMEN

La Entomotoxicología Forense es una rama relativamente nueva de la Entomología Forense que se enfoca principalmente en el análisis toxicológico de los insectos y otros artrópodos que se pueden encontrar en los cadáveres, con el fin de detectar cualitativa y/o cuantitativamente sustancias tóxicas y estudiar el efecto que tienen distintos xenobióticos sobre el desarrollo de los insectos. Esto es de importancia a la hora de aportar información sobre la posible causa de muerte o circunstancias que rodearon a la misma, sobre la procedencia de un cadáver, y/o para estimar el intervalo *post mortem*. Entre los insectos que colonizan por primera vez un cadáver se encuentra *Calliphora vicina* (Calliphoridae), esta es muy común en la provincia de Buenos Aires desde el otoño hasta la primavera, donde las temperaturas fluctúan generalmente entre los 5-30 °C. El glifosato (N-fosfometilglicina) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, y es el plaguicida más utilizado a nivel mundial. La intoxicación por glifosato puede ser accidental o voluntaria. Por lo expuesto, se evaluó una sobredosis aguda letal en humanos, 4,62 ml/kg de Roundup Full® II (sal potásica de N-fosfometilglicina 66.2% p/v), sobre la duración del ciclo de vida, el tamaño (longitud, ancho, y peso corporal), la proporción de hembras, y la morfología de *C. vicina*. Los resultados obtenidos para las duraciones del ciclo de vida no mostraron diferencias entre el control y el tratamiento con el herbicida. Tanto el estado de huevo como los estadios L1 y L2 requirieron 1 día, respectivamente, para cumplir su desarrollo. La L3 necesitó 5 días para mudar a pupa, y este último estado de desarrollo duró en promedio 13 días en el tratamiento con el herbicida y 13,5 días para el control. Los dípteros expuestos al herbicida tuvieron un ciclo de vida de 21 días y los del control de 21,5 días. No se detectó estado de diapausa. En cuanto al tamaño de los ejemplares, no hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre el tratamiento con Roundup Full® II y el control. Tampoco se evidenció un efecto del herbicida sobre la proporción de hembras. Igualmente la morfología externa no mostró cambios teniendo en cuenta la estructura y la coloración *grosso modo*. Para finalizar, se puede concluir que el Roundup Full® II no produce efectos en el desarrollo de *C. vicina* a la dosis evaluada. Esto implica que la determinación taxonómica y la estimación del intervalo *post mortem* podrían realizarse sin tener que contemplar anomalías debida al herbicida.

## INTRODUCCIÓN

La Entomotoxicología Forense es una rama relativamente nueva de la Entomología Forense que se enfoca principalmente en el análisis toxicológico de los insectos y otros artrópodos que se pueden encontrar en los cadáveres, con el fin de detectar cualitativa y/o cuantitativamente sustancias tóxicas (Introna *et al.*, 2001; Zanetti *et al.*, 2019a, 2021), y estudiar el efecto que tienen distintos xenobióticos sobre el desarrollo de los insectos (George *et al.*, 2009; Zanetti, 2020; Zanetti *et al.*, 2021). También se ocupa de testear métodos para la detección de xenobióticos a partir de muestras de insectos de importancia forense, ya que los insectos constituyen una alternativa confiable para identificar drogas y toxinas de forma indirecta cuando no se dispone de muestras necesarias, y constituye muchas veces la única evidencia verídica en un cadáver (Chophi *et al.*, 2019). La Entomotoxicología Forense puede contribuir en la estimación del intervalo *post mortem* (PMI), es decir, el tiempo que transcurrió desde la muerte hasta el hallazgo de un cadáver, puede determinar la causa de muerte o brindar información relacionada, e incluso verificar si el cadáver ha sido movido o su procedencia (Amendt *et al.*, 2011).

Debido a su abundancia y diversidad, los grupos más relevantes de insectos en las investigaciones forenses son los dípteros y los coleópteros. Los dípteros de las familias Calliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae, son los primeros en colonizar un cadáver humano (Byrd & Castner, 2009). Dentro de la familia Calliphoridae se encuentra el género *Calliphora* que incluye a la especie *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, vulgarmente conocida como “mosca azul”. Esta es de gran tamaño, con un abdomen grueso y de color azul grisáceo con destellos metálicos. Posee el cuerpo piloso, con cerdas de mayor tamaño y grosor en la parte superior del tórax (Byrd & Castner, 2009). Esta especie es cosmopolita y tiene una amplia distribución en Argentina, siendo muy común en la provincia de Buenos Aires (Mariluis & Mulieri, 2003). Suele encontrarse desde el otoño hasta la primavera, donde las temperaturas fluctúan generalmente entre 5-30 °C, y presenta variaciones comportamentales en cada gran zona latitudinal (Oliva, 2001). Se desplaza grandes distancias y se encuentra tanto en ambientes rurales como sinantrópicos (Battan Horenstein *et al.*, 2007), mostrando preferencia por estos últimos, así como por situaciones de sombra (Byrd & Castner, 2009).

Los adultos de *C. vicina* se sienten atraídos por materia orgánica en descomposición como fruta, carne y heces. Sin embargo, las larvas se encuentran principalmente en la carroña y presentan importancia forense ya que son extremadamente comunes en cadáveres humanos o animales (Byrd & Castner, 2009) y se las utiliza para establecer un PMI, utilizando el tamaño (longitud/peso) de la larva como un "reloj biológico" (Donovan *et al.*, 2006; Amendt *et al.*, 2011). *C. vicina* es considerado un colonizador primario de cadáveres en condiciones de baja

temperatura (Battan Horenstein *et al.*, 2010). En estudios experimentales, se ha registrado la llegada de moscas califóridas a cadáveres minutos luego de su exposición. Las moscas azules localizan restos humanos y animales en dos pasos: el primero consiste en la detección química a través de su antena (olfato) y el segundo, en una búsqueda visual. Una vez que localizan el cuerpo, las moscas grávidas buscan la ubicación de los orificios naturales u otro sitio de oviposición adecuado (Byrd & Castner, 2009). Estos dípteros poseen un típico desarrollo holometábolo por lo que los huevos depositados sobre un cadáver eclosionan más o menos de manera sincrónica emergiendo larvas de aspecto vermiforme (Donovan *et al.*, 2006; Gennard, 2012). Estas presentan una serie de estadios producto de un número de mudas constantes. Las larvas aparecidas tras la eclosión de los huevos se denominan larvas de primer estadio (L1) muy activas y voraces, con lo que aumentan rápidamente de tamaño y mudan a larvas de segundo estadio (L2) en pocas horas. Éstas, a su vez, se siguen alimentando y aumentando de tamaño, mudando a larvas de tercer estadio (L3). Este último sigue su crecimiento, alimentándose ávidamente, hasta alcanzar un tamaño en el cual cesan dicha actividad (este estadio se suele denominar post alimenticio) y entonces abandonan la fuente de alimento, se entierran e inician el proceso de pupación. Las pupas cambian de color a lo largo del desarrollo, tienen una forma ovalada y en algunos casos pueden ingresar en diapausa (Donovan *et al.*, 2006). Al final del ciclo de vida, emerge el adulto rompiendo el pupario con el ptilium. El desarrollo puede ser influenciado por diversos factores ambientales, tales como temperatura, alimento, región geográfica, etc. (Kaneshrajah & Turner, 2004; Donovan *et al.*, 2006; Johnson & Wallman, 2014).

Además de su importancia forense, la especie también tiene valor veterinario y médico, ya que puede causar miasis facultativa en vertebrados y las moscas adultas pueden ser vectores mecánicos de virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (Araghi *et al.*, 2015). También las larvas de mosca azul cumplen función ecológica por su rol en la descomposición de cadáveres en el medio ambiente y en el reciclaje de nutrientes (Byrd & Castner, 2009).

Tanto por su importante función ecológica y forense, el desarrollo de *C. vicina* ha sido estudiado bajo distintas variables que podrían afectar su tasa de crecimiento. Algunas de estas variables son: la temperatura (Donovan *et al.*, 2006; Defilippo *et al.*, 2013), los tipos de tejido (Kaneshrajah & Turner, 2004; Bernhardt *et al.*, 2017), la densidad larval (Johnson & Wallman, 2014), y sustancias tóxicas o xenobióticos que pueden provocar la muerte (O'Brien & Turner, 2004; Zanetti, 2020). En cuanto a los xenobióticos, distintos estudios demuestran que el desarrollo de los insectos o artrópodos pueden verse afectados cuando ciertos compuestos se encuentran en su fuente de alimento. Hay estudios que indican que las tasas de crecimiento o desarrollo de algunos estados (o incluso de estadios larvales) pueden verse alterados o inalterados dependiendo de distintos factores como la especie, el tipo de xenobiótico, la concentración, la dosis, etc., y esto puede influenciar o no la estimación del PMI, conduciendo

por ejemplo a una sobreestimación o subestimación del mismo (O'Brien & Turner, 2004; George *et al.*, 2009; Zanetti, 2020; Zanetti *et al.*, 2021).

El glifosato (N-fosfometilglicina) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, post-emergente y universal. La empresa Monsanto lo comercializa bajo el nombre Roundup® (Agostini *et al.*, 2020). Actualmente es el plaguicida más utilizado a nivel mundial (Mesnage *et al.*, 2015) y en Argentina, es el herbicida más aplicado de forma intensiva en una amplia variedad de cultivos (Anguiano & Ferrari, 2019). Se lo utiliza principalmente para eliminar plantas no deseadas como pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas (Cortina *et al.*, 2017). El glifosato actúa de forma sistémica reduciendo el crecimiento de las plantas al inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa. La misma participa en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos presentes en plantas (Mesnage *et al.*, 2015). También se ha demostrado que modularía la citocromo P450 de las plantas (Richards *et al.*, 2005).

Desde su introducción, la formulación de glifosato ha sido promocionada como el herbicida más seguro, por su baja toxicidad aguda para el ser humano y el ambiente. Fue clasificado por la Organización Mundial de la Salud como grupo IV, esto significa que en condiciones normales de uso no ofrece peligro de toxicidad aguda. Esta falsa sensación de inocuidad promovió tanto su fácil acceso como su manipulación desprotegida (Cuhra *et al.*, 2016).

Los pesticidas a base de glifosato contienen además del ingrediente principal, otras sustancias cuya función es facilitar su manejo o aumentar su eficacia, y pueden ser igual o más responsables de los efectos adversos en la población expuesta que el glifosato por sí mismo. Entre tales sustancias, el surfactante polioxietil amina (POEA) puede ser el agente tóxico primario en el herbicida. La toxicidad de las formulaciones que contiene este herbicida es compleja y por ende depende de todos los componentes de la mezcla (Mesnage *et al.*, 2015).

El metabolismo del glifosato en humanos no es muy conocido, se sabe que una de las formas en que actúa es inhibiendo enzimas de la familia del citocromo P450 (Richard *et al.*, 2005). En un estudio con ratas Sprague-Dawley se detectó que después de una ingesta oral, el glifosato es absorbido por el tracto gastrointestinal y eliminado en orina y heces. La eliminación ocurre rápidamente de la mayoría de los tejidos, con excepción del hueso donde permanece durante largos periodos (Brewster *et al.*, 1991).

La exposición a glifosato puede tener distintos efectos neurológicos, teratogénicos, mutagénicos, cancerígenos, inmunológicos, respiratorios y reproductivos (Mesnage *et al.*, 2015; Cortina *et al.*, 2017; Anguiano & Ferrari, 2019; Agostini *et al.*, 2020). La intoxicación por glifosato puede ser accidental o voluntaria. Durante el año 2016 las intoxicaciones con pesticidas representaron el 20% de las causas de suicidio alrededor del mundo (Anchía-Jiménez *et al.*, 2021); y actualmente es el método más frecuente de intentos suicidas no mortales (OMS y FAO, 2019). Países de Asia, Centro y Sudamérica, dedicados principalmente a actividades agrícolas son los que reportan mayores intoxicaciones con plaguicidas como método suicida

(Anchía-Jiménez *et al.*, 2021). Los síntomas que ocasiona la intoxicación son muy diversos tales como, vómito, dolor abdominal, infecciones gastrointestinales, etc., incluyendo mortalidad (Chen *et al.*, 2009). En Argentina se presentó información de dos casos letales ocurridos en Santa Fe durante el año 2005 (Prada *et al.*, 2005). Hay que tener en cuenta que la información sobre suicidios en nuestro país, así como en otros lugares, es escasa y/o de difícil acceso (Arias & Blanco, 2010; Fritschy, 2012; UNICEF, 2019).

Algunos trabajos han estudiado los efectos del glifosato en artrópodos. Entre ellos se evaluó la toxicidad crónica y aguda del glifosato y/o formulaciones del mismo en crustáceos (Gill *et al.*, 2017). Actualmente, no existe mucha bibliografía sobre los efectos del herbicida (independientemente de su forma) en insectos. Schneider *et al.* (2009) analizaron en *Chrysoperla externa* Hagen, las alteraciones que el glifosato (en la concentración nominal máxima registrada en el campo) podría ocasionar en parámetros poblacionales, reproductivos y en el desarrollo. En otro trabajo, se estudiaron las posibles consecuencias del glifosato en la tabla de vida de *Metopolophium dirhodum* Walker (Saska *et al.*, 2016). La Dra. Zanetti comenzó a estudiar el efecto del glifosato, utilizando la formulación Roundup Full® II (RFII), sobre el desarrollo de *Dermestes maculatus* DeGeer y *Lucilia sericata* Meigen bajo condiciones controladas. Estos son insectos de importancia forense, sanitaria, veterinaria y económica (Byrd & Castner, 2010, Zanetti *et al.*, 2015, 2019b). Los datos obtenidos forman parte de un artículo que fue enviado a una revista para ser publicados. También la Dra. Zanetti estudió el efecto de una dosis mayor de RFII a la evaluada en esta tesis de licenciatura en el desarrollo de *C. vicina* y comenzó a analizar la dosis aquí descrita.

Por todo lo anteriormente expuesto, esta tesis tuvo como objetivo examinar la dosis de RFII de 4,62 ml/kg sobre el desarrollo de *C. vicina* (Diptera: Calliphoridae), evaluando el ciclo de vida, el tamaño, la morfología externa *grosso modo* y la proporción de hembras.

## **Hipótesis**

- La dosis de 4,62 ml/kg de Roundup Full® II afecta de forma significativa la duración del ciclo de vida, el tamaño, la morfología externa *grosso modo* y proporción de hembras de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el desarrollo de esta tesina se llevaron a cabo tareas de campo y de laboratorio. El trabajo a campo consistió en colocar trampas cebadas en los que se recolectaron huevos de *C. vicina*. En el laboratorio se aplicaron los protocolos para el mantenimiento de las colonias, la preparación de la dieta, los experimentos y el análisis de la influencia de RFII (4,62 ml/kg), sobre el desarrollo de los dípteros.

### Tareas de campo

#### Obtención de ejemplares

Durante el otoño, se colocaron trampas cebadas en dos sitios de la ciudad de Bahía Blanca, Prov. de Buenos Aires, Argentina, uno en Villa Mitre (-38.735558, -62.2484378,17) y otro en Nueva Belgrano (-38.6780218, -62.3010669,17). Estos se seleccionaron por la posibilidad de acceder y manejar fácilmente las trampas. Las mismas se confeccionaron con botellas de plástico, cubiertas internamente con retazos de bolsa plástica en los que se colocaron trozos de riñón, pulmón, hígado y/o patitas de cerdo doméstico, a modo de cebo (Figura 1). Las trampas cebadas se colocaron en árboles o bajo techo para protegerlos de la lluvia y del sol directo, y se revisaron diariamente cada 2 horas en busca de huevos de *C. vicina*. Esta búsqueda se intensificó durante el día cuando la temperatura superó los 12 °C ya que la actividad de los adultos era mayor. Además, se les agregó diariamente sangre porcina o vacuna. Los huevos obtenidos se transportaron al laboratorio para continuar con los estudios.

### Trabajo de laboratorio

#### Establecimiento y mantenimiento de colonias

Los cebos con huevos se colocaron en recipientes de vidrio de 2 kg, a los cuales se les había agregado 4 cm de piedritas sanitarias para gatos. Los recipientes se taparon con retazos de tela *voilé* sujetos con banditas elásticas. Los recipientes se colocaron en una incubadora (Ingelab, Argentina) a  $22 \pm 0,1$  °C, una humedad relativa de  $48 \pm 1,2\%$  y un fotoperiodo Luz/Oscuridad 12:12 h, en el bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur.

Una vez que alcanzaron el estado adulto se colocó leche en polvo, azúcar, agua destilada y elementos como troncos para permitir que se posen (Figura 2). Los dípteros tuvieron acceso al alimento y bebida *ad libitum*. A las 72 h de su emergencia, se añadió un sustrato cárnico y sangre porcina para estimular la maduración de las ovariolas y permitir la oviposición (Anderson, 2000). Para la identificación de ejemplares adultos se utilizaron las claves taxonómicas de Mariluis & Schnack (2002) y Florez & Wolff (2009), y las colecciones entomológicas del Laboratorio de Entomología Forense del Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (CONICET-UNS).

De los huevos depositados en el sustrato cárnico, una parte se empleó para los ensayos y la restante se introdujo en un nuevo recipiente de vidrio con las mismas características y bajo las mismas condiciones descriptas arriba, para continuar con las colonias. Estas fueron supervisadas en forma diaria y siempre que fue necesario se agregó alimento, agua y/o piedritas sanitarias.



**Figura 1:** Trampa cebada colocada en un árbol en una zona urbana de Bahía Blanca para la obtención de huevos de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae).



**Figura 2:** Colonia de adultos de *Calliphora vicina*. Se pueden ver los materiales usados y contenedores en los que se colocó alimento y agua destilada.

#### Elaboración de la dieta con Roundup Full II

La dieta de músculo porcino se preparó en el momento en que se obtuvieron huevos. El músculo se homogeneizó con una procesadora (Philips, Argentina), luego se pesaron 50 g con balanza digital (Acculab, Argentina) y se colocaron en un frasco plástico recolector de muestra biológica de 125 ml. A continuación, se añadió al tejido homogeneizado 15-20 ml de agua destilada y se homogeneizó nuevamente con pilón durante 2 min. Luego se añadió Roundup Full® II (sal potásica de N-fosfonometilglicina 66.2% p/v, Monsanto Argentina S.A.I.C) considerando una dosis de 4,62 ml/kg y se volvió a homogeneizar. Esta se calculó para simular una sobredosis aguda letal en humanos (Tominack *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2000). Una cantidad de 1,13 g de agar en polvo (Britania agar agar) se disolvió en 25 ml de agua destilada hirviendo y se agitó durante 2 min hasta que espeso. La solución de agar se mezcló completamente en la preparación del músculo y luego se llevó a la heladera (Zanetti *et al.*, 2021). Para el control se aplicó el mismo procedimiento, pero sin el agregado del herbicida.

Se realizaron dos experimentos, uno para el análisis del ciclo de vida y otro para el análisis de tamaño y morfología general. En ambos experimentos se establecieron dos réplicas del

control (excepto con L1 y L2 que se usó una réplica) y seis réplicas con el herbicida. Asimismo, para los análisis estadísticos se contemplaron datos de un ensayo previo haciendo un total de tres réplicas control y ocho del tratamiento con el herbicida.

### Estudio del ciclo de vida

A las dietas, la tratada con RFII y el control, se transfirieron 20 huevos de *C. vicina* a contenedores de plástico de 9 cm de ancho y 8,5 cm de alto que fueron debidamente rotulados y contenían 3 cm de piedras sanitarias para gato. Los contenedores plásticos se cerraron con retazos de tela *voilé* sujetadas por banditas elásticas y se colocaron en una incubadora (Ingelab, Argentina) a  $22 \pm 0,1$  °C,  $48 \pm 1,2\%$  humedad relativa y fotoperiodo Luz/Oscuridad 12:12 h (Figura 3). Los huevos que presentaron colores amarillentos o grisáceos se descartaron ya que en general no son viables. Cuando fue necesario el sustrato alimenticio se humedeció para evitar la desecación.

Se realizaron observaciones y cuantificaciones diarias bajo microscopio estereoscópico (Olympus, Japón) entre las 7-10 de la mañana y se registró la duración de cada estado de desarrollo (incluyendo la de cada estadio larval) y la del ciclo total. Para establecer si los individuos se encontraban en un determinado estadio larval se aplicó como criterio que el 50% o más de los individuos debían haber mudado. Esto mismo se contempló para los estados de pupa y de adulto.



**Figura 3:** Experimento en marcha; se aprecia los contenedores y parte de los materiales utilizados.

### Análisis de tamaño y morfología externa

Se transfirieron 75 huevos de *C. vicina* a cada dieta, con y sin herbicida, que se colocaron en contenedores plásticos de 9 cm de ancho y 8,5 cm de alto. Estos se rotularon y mantuvieron en una incubadora (Ingelab, Argentina) a  $22 \pm 0,1$  °C,  $48 \pm 1,2\%$  humedad relativa y fotoperiodo Luz/Oscuridad 12:12 h. De ser necesario se agregó alimento o se humedeció el mismo para evitar la desecación. Los huevos eclosionados se observaron y cuantificaron diariamente con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus, Japón) entre las 7-10 de la mañana.

Asimismo, 15-20 individuos de cada estadio larval, del estado pupal y del adulto (según el número disponible) se colectaron al azar. Los ejemplares larvales se extrajeron en su última etapa de desarrollo dentro de cada estadio, con excepción de las L3, en cuyo caso la extracción fue previa a la etapa post-alimentaria. Las pupas se colectaron 72 h posteriores al inicio de la pupación (Figura 4).

Las larvas se sacrificaron con agua destilada a 80 °C durante 30 s y se conservaron en frascos plásticos recolectores de muestra biológica de 125 ml debidamente rotulados que contenían etanol 70%, para posteriormente ser analizadas. Las pupas y adultos se sacrificaron y conservaron por inmersión en etanol 70% utilizando los mismos tipos de frascos (previamente rotulados) que se emplearon para larvas.



**Figura 4:** Pupas en distintos tiempos de desarrollo. La flecha indica las pupas que se seleccionaron para sacrificar.

En todos los casos, el estudio se realizó siguiendo el protocolo (160/2019) aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la UNS (CICUAE-UNS).

Para el análisis del peso, del ancho y de la longitud del cuerpo, se utilizaron un microscopio estereoscópico (Olympus, Japón) con ocular micrométrico y una balanza digital (Acculab, Argentina). Antes de proceder a realizar las mediciones, los ejemplares se trasladaron de los contenedores a cajas de Petri plásticas.

Las larvas se midieron dorsalmente y se registró la longitud desde el primer segmento cefálico hasta el último segmento abdominal. El ancho se midió en el sexto/séptimo segmento. En ambos casos se utilizaron los siguientes aumentos para cada estadio: 4x (L1), 1,2x (L2), y 0,67x (L3). Las pupas también se midieron dorsalmente utilizando un aumento 0,8x. La longitud total se definió desde el primer segmento cefálico hasta el último segmento abdominal y el ancho se midió en el quinto segmento. Los adultos fueron sexados y su longitud se determinó midiendo dorsalmente desde la base de las antenas hasta el último segmento abdominal, y el ancho que se examinó corresponde con el punto más ancho del tórax utilizando un aumento de 0,8x.

El pesaje se realizó con el número total de individuos por estadio larval y estado de desarrollo. Antes de realizar el mismo se procedió a secar los insectos en papel carilina y se los dejó a temperatura ambiente por 24 h, con excepción de L1 y L2, para evitar que su estructura corporal se deteriore (Zanetti, 2020).

La observación morfológica externa *grosso modo* se llevó a cabo utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus, Japón).

### Análisis estadísticos

La evaluación de los resultados implicó calcular la media y/o error estándar. Para el análisis de los parámetros relacionados con el tamaño se usó un ANOVA simple (Zanetti, 2020; Zanetti *et al.*, 2021). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

## RESULTADOS

### Ciclo de vida

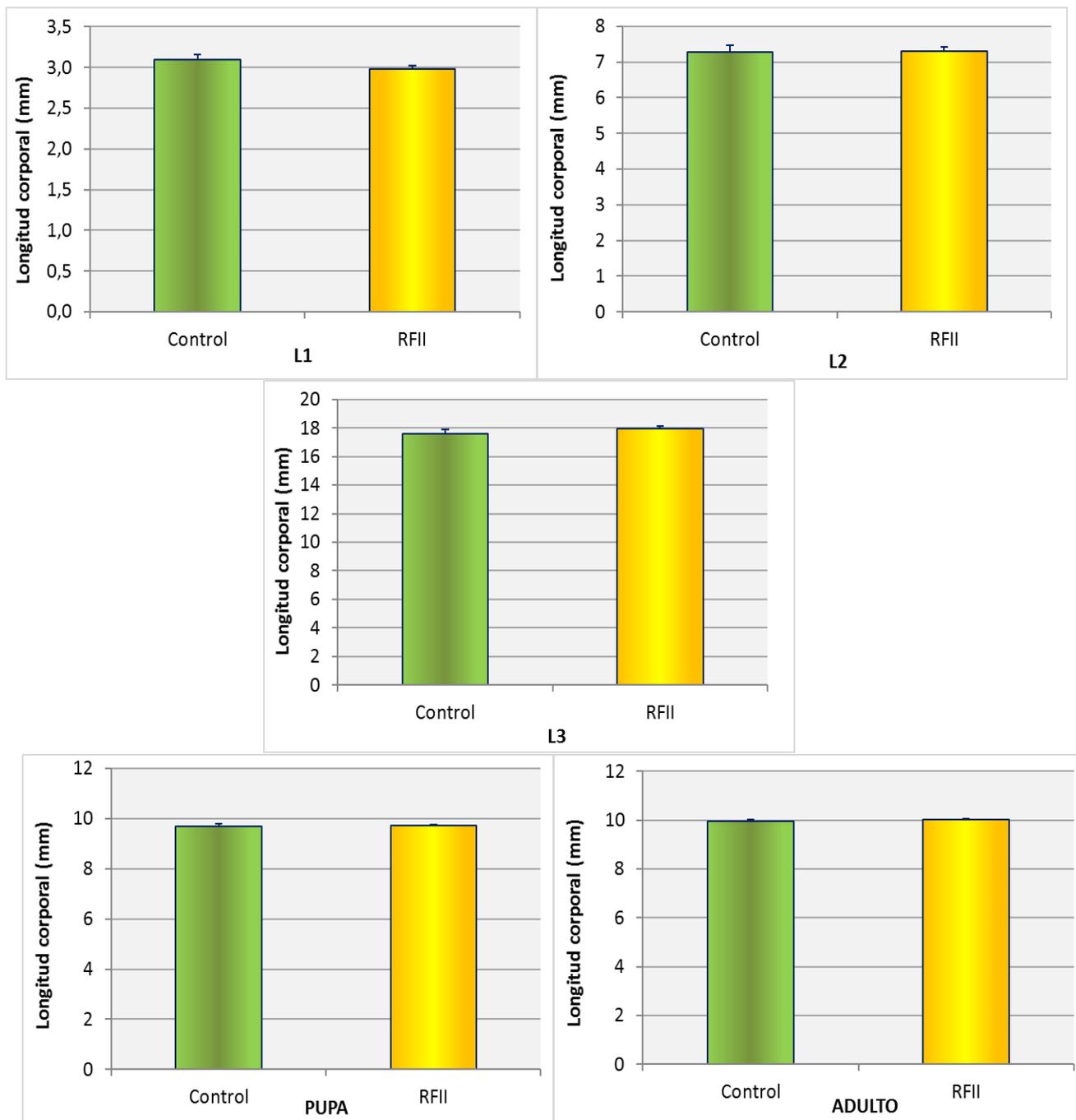
La duración de cada estadio larval y estado de desarrollo de *C. vicina* no mostró diferencias entre los ejemplares del control y los del tratamiento con RFII. Luego de 1 día en estado de huevo, emergió la L1 que al igual que la L2, mudaron al siguiente estadio después de 1 día. La L3 necesitó de 5 días para mudar a pupa y este último estado de desarrollo fue en promedio 13 días en el tratamiento con RFII y 13,5 días para el control. Por lo que el ciclo de vida fue de 21 días para el tratamiento con el herbicida y 21,5 días para el control. En ninguna de las poblaciones se observó diapausa.

### Longitud

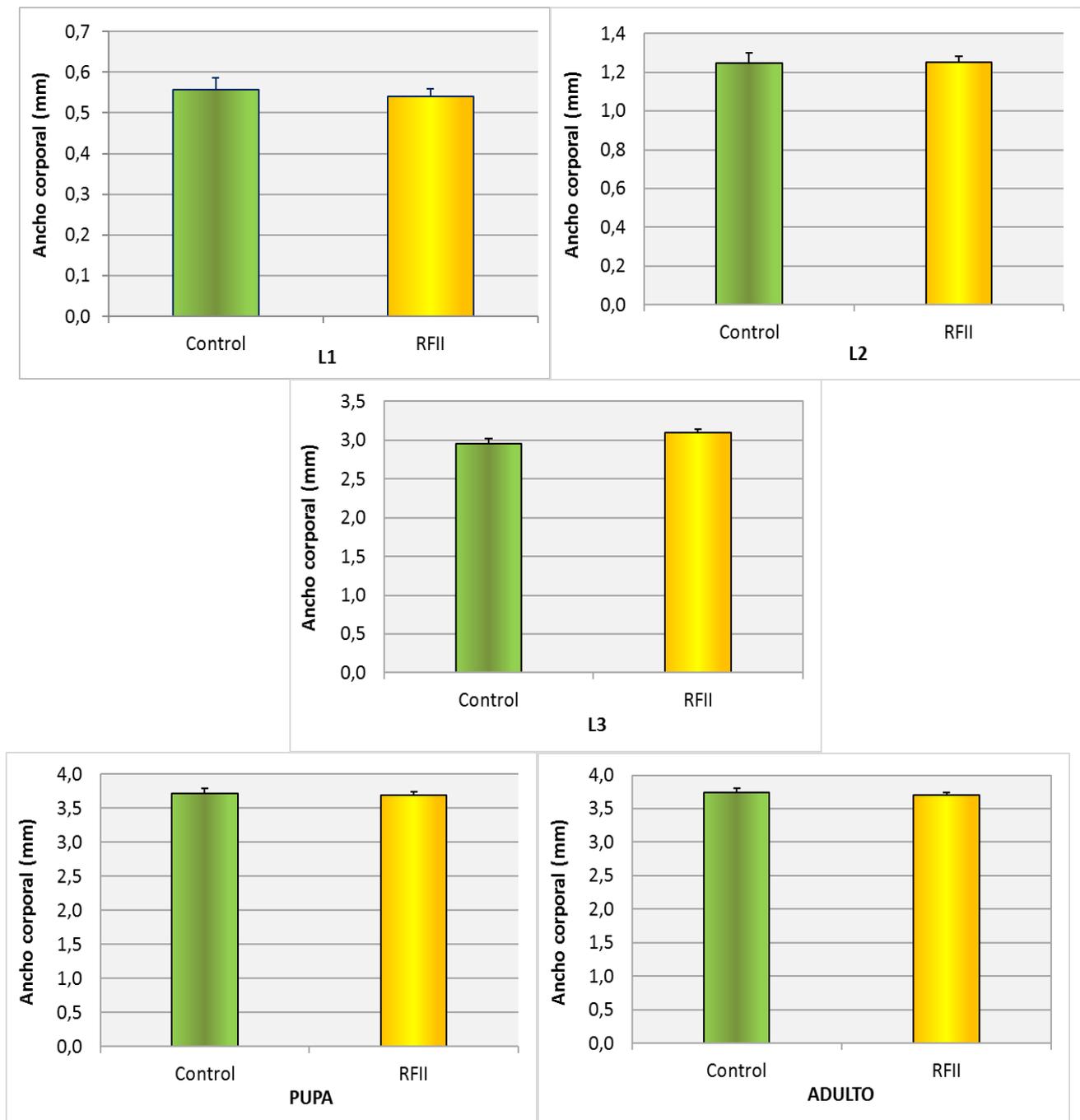
Los datos de longitud corporal no mostraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre el control y el tratamiento con RFII para los estadios larvales (L1, L2, L3), ni para los estados de pupa y de adulto. En la Figura 5 se pueden apreciar los resultados mencionados.

### Ancho

En la Figura 6 se puede evidenciar que el ancho corporal no mostró diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los ejemplares del control y los del tratamiento con RFII en los estadios larvales (L1, L2, y L3), ni en el estado de pupa. Tampoco el ancho torácico de adultos resultó diferente entre el control y el tratamiento con el herbicida ( $p > 0,05$ ).



**Figura 5:** Efecto del Roundup Full® II (sal potásica de N-fosfometilglicina 66.2% p/v) a una dosis de 4,62 ml/kg sobre la longitud corporal (media) de *Calliphora vicina*. Las barras indican el ES (Control: L1, 0,06; L2, 0,1; L3, 0,2; Pupa 0,1; Adulto, 0,06; RFII: L1, 0,03; L2, 0,1; L3, 0,1; Pupa, 0,6; Adulto, 0,03).



**Figura 6:** Efecto de Roundup Full® II (sal potásica de N-fosfonometilglicina 66.2% p/v) a una dosis de 4,62 ml/kg sobre el ancho corporal (media) de *Calliphora vicina*. Las barras indican el ES (Control: L1, 0,02; L2, 0,05; L3, 0,06; Pupa, 0,07; Adulto, 0,06; RFII: L1, 0,01; L2 0,03; L3 0,03; Pupa 0,04; Adulto 0,04).

## Peso

Al analizar los resultados del peso (Tabla 1) no se hallaron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre el control y el tratamiento con RFII para ninguno de los estadios larvales (L1, L2, L3), ni para los estados de pupa y de adulto.

Tabla 1: Peso (media  $\pm$  ES) del control y del tratamiento con RFII (4,62 ml/kg) de los distintos estados de desarrollo de *Calliphora vicina*

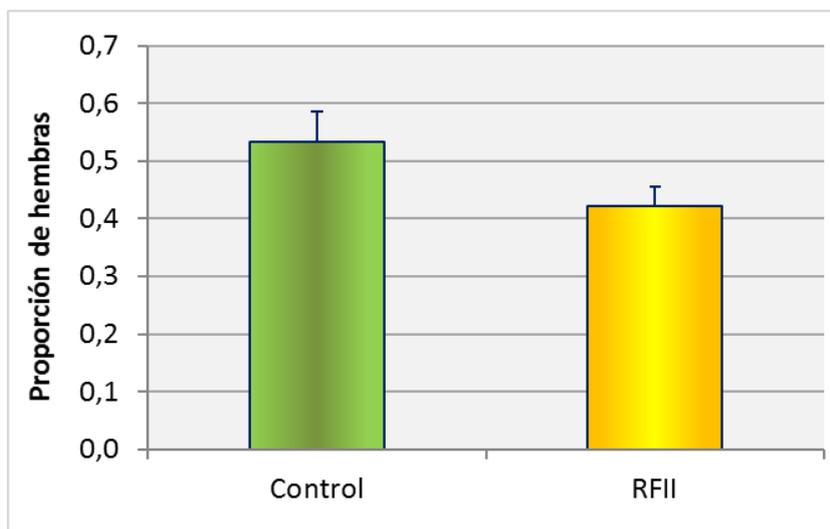
Estado	Población	Promedio (mg)	ES
L1	Control	0,36	0,13
	RFII	0,40	0,05
L2	Control	5,31	1,03
	RFII	6,35	0,36
L3	Control	70,20	4,85
	RFII	72,56	2,97
Pupa	Control	64,22	3,05
	RFII	68,01	1,87
Adulto	Control	11,98	1,07
	RFII	13,57	0,65

## Morfología externa

Al observar la morfología externa *grosso modo* no se evidenciaron diferencias estructurales ni de coloración entre los ejemplares del control y los del tratamiento con RFII.

## Sexo

En la Figura 7 se puede observar que la proporción de hembras del control no fue diferente de la del tratamiento con RFII ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7:** Proporción de hembras *Calliphora vicina* obtenida en el control y en el tratamiento con RFII (4,62 ml/kg). Las barras indican los ES (Control: 0,05; RFII: 0,03).

## DISCUSIÓN

Los insectos que se alimentan de recursos contaminados por xenobióticos pueden sufrir modificaciones en distintos aspectos de sus ciclos de vida. Por ejemplo, los productos organofosforados que han sido estudiados en distintos insectos de relevancia en casos forenses pueden retrasar su ciclo de vida. Abd Al Galil *et al.* (2021a, b) reportaron que el dimetoato presenta una correlación negativa significativa con la tasa de desarrollo larval y pupal de *Chrysomya megacephala* Fabricius, *C. saffrana* Bigot, *C. rufifacies* Macquart, *Sarcophaga peregrine* Robineau-Desvoidy, *S. dux* Thomson y *S. ruficornis* Fabricius. Otros autores obtuvieron resultados similares al trabajar con malatión y larvas y pupas de *C. megacephala* (Rashid *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). También este organofosforado afectó la tasa de desarrollo larvario en una especie de díptero de la familia Phoridae (Castillo-Alanis *et al.*, 2022). Al estudiar el efecto del glifosato en una especie de Chrysopidae, se observó que la duración del tercer estadio larval a pupa fue más corta en presencia del herbicida que en el control (Schneider *et al.*, 2009). Por el contrario en esta tesis, la dosis de 4,62 ml/kg de RFII no afectó de forma significativa a los estadios larvales (L1, L2, L3) ni a los estados de pupa y de adulto de *C. vicina*. Asimismo, Avigliano *et al.* (2014) encontraron que en crustáceos como *Cherax quadricarinatus* Von Martens, no hubo diferencia significativa en el proceso de muda a ninguna de las concentraciones puras de glifosato. Diferentes respuestas a un xenobiótico podrían depender de distintos factores, tales como la especie animal, el tipo de xenobiótico, la concentración del xenobiótico, el tipo de dosis, la farmacocinética, etc., por lo tanto, la tasa de desarrollo podría ser incrementada, demorada, o inalterada (Zanetti *et al.* 2021).

Respecto de los parámetros de tamaño evaluados (longitud, ancho y peso corporal) no se han registrado cambios en *C. vicina* debido al herbicida. Por el contrario, en cangrejos se halló que su exposición crónica a una mezcla de glifosato-POEA (el primero en mayor cantidad), los ejemplares mostraron una menor ganancia de peso corporal respecto del control o de los cangrejos expuestos a ambos compuestos por separado. Esto estuvo correlacionado con un descenso de proteínas musculares, de reservas de glicógeno y de lípidos musculares. El descenso de estas reservas se tradujo en menores niveles de proteínas. Es así que el descenso de proteínas condujo a un descenso de crecimiento somático juvenil de *C. quadricarinatus* (Frontera *et al.*, 2011). Otros autores manifestaron resultados similares exponiendo la misma especie de cangrejo de manera crónica al herbicida puro (Avigliano *et al.*, 2014). Como se mencionó antes, se pueden hallar diferentes respuestas a un xenobiótico debido a distintos factores, tales como la especie animal, el tipo de xenobiótico, la concentración del xenobiótico, el tipo de dosis, la farmacocinética, etc. (Zanetti *et al.*, 2021).

Si bien el objetivo de esta tesis no implicó evaluar el efecto de la temperatura sobre el ciclo de vida, a continuación se compararon los resultados hallados con otros trabajos, ya que previamente se mencionó la importancia de tal información a la hora de estimar el PMI. Adicionalmente, esta tesis contiene los primeros datos del ciclo de vida de *C. vicina* a 22 °C. Algunos estudios han demostrado que el tiempo de desarrollo de *C. vicina* se acorta a medida que aumenta la temperatura (Defilippo *et al.*, 2013; Díaz Martín *et al.*, 2014; Salimi *et al.*, 2018, Salanitra *et al.*, 2022). Al comparar nuestros resultados con algunos trabajos pudimos ver algunas similitudes. El ciclo de vida registrado en este trabajo duró en promedio 21-21,5 días, esto es consistente con lo reportado por Salimi *et al.* (2018) estudiando esta especie a 20 °C en Egipto. Asimismo, la duración de los estadios larvales y estados de desarrollo resultó similar a lo observado en esta tesis. En Argentina, Salanitra *et al.* (2022) trabajando a una temperatura de 18 °C describió una duración para L1 y L3 semejantes a los hallados aquí. Las similitudes con los estudios mencionados podrían deberse a la región geográfica y/o a las diferencias climatológicas de las zonas de estudio, las cuales influyen en la capacidad de aclimatación de las especies estudiadas (Defilippo *et al.*, 2013; Díaz Martín *et al.*, 2014). También las variaciones entre poblaciones pueden ser otro factor influyente, entre otros factores como se mencionó anteriormente (Anderson, 2000; Moneo Pellitero & Saloña Bordas, 2007; Hadjer-Kounouz & Kamel, 2017; Salanitra *et al.*, 2022). En otro trabajo que evaluó varias temperaturas, siendo una de ellas 23 °C, la información descrita no permitió realizar comparaciones (Donovan *et al.*, 2006). Algunos autores (Anderson, 2000; Ames & Turner, 2003; Díaz Martín *et al.*, 2014) mostraron que el estado pupal fue el predominante (59-61% de la duración total), lo mismo ocurrió en esta tesis (61,25%).

En referencia a la longitud corporal, se evidenció que los ejemplares fueron semejantes a los descritos por algunos autores a 22-23 °C (Reiter, 1984; Richards *et al.*, 2013). Por el contrario, las longitudes registradas en esta tesis resultaron mayores en todos los estados de desarrollo respecto de lo informado por Díaz Martín *et al.* (2014) y Salanitra *et al.* (2022). Al igual que puede suceder con la duración del desarrollo, hay distintos factores (temperatura, dieta, variación entre poblaciones, etc.) que también pueden influenciar el tamaño (Oliva, 2001; Moneo Pellitero & Saloña Bordas, 2007; Salanitra *et al.*, 2022). En cuanto al peso y al ancho no hay trabajos con esta especie para contrastar.

A futuro se podrían realizar estudios de campo ya que algunos organofosforados han demostrado distintos efectos relevantes a la hora de estimar el PMI tales como: posibles cambios en el proceso de descomposición, en la colonización de cadáveres, en el patrón de sucesión de especies; disminución de la riqueza y/o abundancia de especies (Wolff *et al.*, 2004; Jales *et al.*, 2020; Cavalcante *et al.*, 2023).

También es aconsejable realizar estudios a nivel histológico para detectar posibles efectos que no son observables externamente, así como realizar análisis para detectar y cuantificar

glifosato en cadáveres. La mayoría de las sustancias implicadas en las muertes relacionadas con las drogas son detectables a través de análisis en las larvas, pupas y puparios (Hédouin *et al.*, 2001; Zanetti *et al.*, 2016; Zanetti *et al.*, 2021). Wolff *et al.* (2004) detectaron, por medio de cromatografía líquida de alta eficacia, metil paratión en todos los estados de desarrollo incluso en los puparios de múltiples especies de moscas. Una droga o toxina puede detectarse en larvas cuando su tasa de absorción excede la tasa de metabolismo y puede existir una bioacumulación de sustancias en tejidos larvarios (Hédouin *et al.*, 2001; Introna *et al.*, 2001). Cabe remarcar que la farmacocinética de los compuestos depende de la especie de insecto, del estado de desarrollo, así como de la actividad alimentaria del insecto (Gosselin *et al.*, 2011).

## CONCLUSIONES

- No existen evidencias de que la dosis de Roundup Full® II (4,62 ml/kg) afecte el ciclo de vida el tamaño, la morfología externa, y la proporción de hembras, de *Calliphora vicina*. Es decir, se rechazó la hipótesis.
- La exposición de ejemplares *C. vicina* al herbicida (4,62 ml/kg) no afecta la identificación y determinación taxonómica de esta especie.
- Al estimar el PMI utilizando especímenes de *C. vicina* previamente expuestos al herbicida (4,62 ml/kg), no se deben observar subestimaciones ni sobrestimaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abd Al Galil, F. M., Zambare, S. P., Al-Mekhlafi, F. A., & Al-Keridis, L. A. (2021a). Effect of dimethoate on the developmental rate of forensic importance Calliphoridae flies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(2), 1267-1271.
- Abd Al Galil, F. M., Zambare, S. P., Al-Mekhlafi, F. A., Wadaan, M. A., & Al-Khalifa, M. S. (2021b). Effects of insecticide dimethoate on the developmental rate of forensic importance sarcophagid flies. *Journal of King Saud University-Science*, 33(2), 101349.
- Agostini, L. P., Dettogni, R. S., Dos Reis, R. S., Stur, E., Dos Santos, E. V., Ventorim, D. P., ... & Louro, I. D. (2020). Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. *Science of the Total Environment*, 705, 135808.
- Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., & Hall, M. J. (2011). Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7(4), 379-392.
- Ames, C., & Turner, B. (2003) Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, 178-186.
- Anchía-Jiménez, G., Chaverri-Vásquez, S., Cordero-Solís J. J., & Mora-López, I. (2021). Intoxicaciones agudas con pesticidas para fines suicidas en Costa Rica durante la década de 2010-2020. *Revista Medicina Legal De Costa Rica*, 38(1), 131-145.
- Anderson, G. S. (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences*, 45, 824-832.
- Anguiano, O. L., & Ferrari, A. (2019). Riesgo ecotoxicológico de plaguicidas utilizados en argentina. Fac. de Ingeniería y Fac. de Ciencias Médicas Universidad Nacional del Comahue PROBIEN (CONICET – UNCo). 21-29.
- Araghi, M., Eskandari, F., & Gilasian, E. (2015). Avian wound myiasis caused by *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) in an immature migrating eastern imperial eagle (*Aquila heliaca* Savigny) (Aves: Accipitridae) in south-western Iran. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 6, 212.
- Arias, E., & Blanco, I. (2010). Una aproximación al entendimiento del suicidio en comunidades rurales y remotas de América Latina. *Estudios Sociológicos*, XXVIII(82), 185-210.
- Avigliano, L., Fassiano, A. V., Medesani, D. A., Ríos de Molina, M. C., & Rodríguez, E. M. (2014). Effects of glyphosate on growth rate, metabolic rate and energy reserves of early juvenile

crayfish, *Cherax quadricarinatus* M. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92, 631-635.

Battan Horenstein, M., Linhares, A. X., Rosso, B., & Garcia, M. D. (2007). Species composition and seasonal succession of saprophagous calliphorids in a rural area of Córdoba: Argentina. *Biological Research*, 40(2), 163-171.

Battan Horenstein, M., Xavier Linhares, A., Rosso de Ferradas, B., & García, D. D. (2010). Decomposition and dipteran succession in pig carrion in central Argentina: ecological aspects and their importance in forensic science. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(1), 16-25.

Bernhardt, V., Schomerus, C., Verhoff, M. A., & Amendt, J. (2017). Of pigs and men—comparing the development of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) on human and porcine tissue. *International Journal of Legal Medicine*, 131(3), 847-853.

Brewster, D. W., Warren, J., & Hopkins II, W. E. (1991). Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundamental and Applied Toxicology*, 17(1), 43-51.

Byrd, J. H., & Castner, J. L. (2009) Insects of forensic importance. En: Byrd J. H. & Castner J. L. (eds). *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, 39–126. Boca Raton: CRC Press.

Castillo-Alanis, L. A., Lira-Paredes, A. A., Pedraza-Lara, C., Quijano-Mateos, A., & Bravo-Gómez, M. E. (2022). Effect of malathion on the development of *Megaselia scalaris* (Loew, 1866) (Diptera: Phoridae), a forensically important fly. *Journal of Medical Entomology*, 59(3), 826-834.

Cavalcante, K., Peniche, T., Façanha, B. L. B., Araújo, C. M., Lobato, T. A. S., & Souto, R. N. P. (2023). Effect of diazinon (organophosphate) on the composition and succession of Calliphoridae assemblages in rabbit carcasses in the Eastern Amazon. *International Journal of Legal Medicine*, 1-9.

Chen, Y., Wu, L., Deng, F., & Yang, C. (2009). The epidemiology of glyphosate surfactant herbicide poisoning in Taiwan, 1986-2007: a poison center study. *Clinical Toxicology*, 47 (7), 70-677.

Chophi, R., Sharma, S., Sharma, S., & Singh, R. (2019). Forensic entomotoxicology: current concepts, trends and challenges. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 67, 28-36.

Cortina, C. C., Fonnegra, L. M. F., Pineda, K. M., Muñoz, M. P., Fonnegra, J. R., & Díaz, J. P. Z. (2017). Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola: revisión de tema. *CES Salud Pública*, 8(1), 121-133.

- Cuhra, M., Bohn, T. & Cuhra, P. (2016). Glyphosate: Too much of a good thing?. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 28.
- Defilippo, F., Bonilauri, P., & Dottori, M. (2013). Effect of temperature on six different developmental landmarks within the pupal stage of the forensically important blowfly *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic sciences*, 58(6), 1554-1557.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tolaba, M., & Robledo, C. (2017) "InfoStat versión 2017". Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz Martín, B. D., Rodríguez, A. L., & Bordas, M. I. S. (2014). Primeros resultados sobre desarrollo de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) bajo condiciones controladas de temperatura. *Ciencia Forense*, 241, 260.
- Donovan, S. E., Hall, M. J. R., Turner, B. D., & Moncrieff, C. B. (2006). Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(1), 106-114.
- Gennard, D. (2012). The life cycles of flies and beetles. En: *Forensic entomology: an introduction*, 73-80, John Wiley & Sons.
- George, K. A., Archer, M. S., Green, L. M., Conlan, X. A., & Toop, T. (2009). Effect of morphine on the growth rate of *Calliphora stygia* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, 193(1-3), 21-25.
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16, 401-426.
- Gosselin, M., Wille, S. M., Fernandez, M, del M., Di Fazio, V., Samyn, N., De Boeck, G., & Bourel, B. (2011). Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Science International*, 208(1-3), 1-9.
- Florez, E., & Wolff, M. (2009). Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. *Neotropical Entomology*, 38, 418-429.
- Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. (2019). El suicidio en la adolescencia: situación en la Argentina. Primera edición. Buenos Aires, Argentina.
- Fritschy, B. A. (2012). Suicidio, una forma de violencia e indicador de salud de la población. *Ciência Geográfica*, 16, 38-45.

- Frontera, J. L., Vatnick, I., Chaulet, A., & Rodríguez, E. M. (2011). Effects of glyphosate and polyoxyethylenamine on growth and energetic reserves in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 590-598.
- Hadjer-Kounouz, S., & Kamel, L. (2017). Development of *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoid) (Diptera: Calliphoridae) under different biotic and abiotic conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 683-691.
- Hédouin, V., Bourel, B., Bécart, A., Tournel, G., Deveaux, M., Goff, M. L., & Gosset, D. (2001). Determination of drug levels in larvae of *Protophormia terraenovae* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. *Journal of Forensic Sciences*, 46(1), 12-14.
- Introna, F., Campobasso, C. P., & Goff, M. L. (2001). Entomotoxicology. *Forensic Science International*, 120(1-2), 42-47.
- Jales, J. T., de Moura Barbosa, T., Dos Santos, L. C., Rachetti, V. D. P. S., & Gama, R. A. (2020). Carrion decomposition and assemblage of necrophagous dipterans associated with Terbufos (Organophosphate) intoxicated rat carcasses. *Acta Tropica*, 212, 105652.
- Johnson, A. P., & Wallman, J. F. (2014). Effect of massing on larval growth rate. *Forensic Science International*, 241, 141-149.
- Kaneshrajah, G., & Turner, B. (2004). *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *International Journal of Legal Medicine*, 118(4), 242-244.
- Lee, H. L., Chen, K. W., Chi, C. H., Huang, J. J., & Tsai, L. M. (2000). Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication a review of 131 cases. *Academic Emergency Medicine*, 7(8), 906-910.
- Liu, X., Shi, Y., Wang, H., & Zhang, R. (2009). Determination of malathion levels and its effect on the development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) in South China. *Forensic Science International*, 192(1-3), 14-18.
- Mariluis, J. C., & Mulieri, P. R. (2003). The distribution of the Calliphoridae in Argentina (Diptera) *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62(1-2), 85-97.
- Mariluis, J. C., & Schnack, J. A. (2002). Calliphoridae de la Argentina. Sistemática, ecología e importancia sanitaria (Diptera, Insecta). En: OD Salomón (Ed.), pp. 23-37. Actualizaciones en artropodología sanitaria argentina. Fundación Mundo Sano, Buenos Aires.

- Mesnage, R., Defarge, N., De Vendômois, J. S., & Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133-153.
- Moneo Pellitero, J. & Saloña Bordas, M. (2007). Development of *Calliphora vicina* robineau-desvoidy. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 1(41), 413-417.
- Oliva, A. (2001). Insects of forensic significance in Argentina. *Forensic Science International*, 120(1-2), 145-154.
- O'Brien, C., & Turner, B. (2004). Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. *International Journal of Legal Medicine*, 118(4), 188-189.
- Organización Mundial de la Salud, & Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). Prevención del suicidio: manual para las autoridades de registro y reglamentación de los plaguicidas. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/328770>.
- Prada, D. Evangelista, M. & Piola J, C. (2005). Reporte de dos casos de intoxicaciones letales con glifosato registradas en la Provincia de Santa Fe. XIV Congreso Argentino de Toxicología en Mendoza. 13 (Supl): 1-119.
- Rashid, R. A., Osman, K., Ismail, M. I., Zuha, R. M., & Hassan, R. A. (2008). Determination of malathion levels and the effect of malathion on the growth of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) in malathion-exposed rat carcass. *Tropical Biomedicine*, 25(3), 184-190.
- Reiter, C. (1984) Zum Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeissfliege *Calliphora vicina*. *Zeitschrift der Rechtsmedizin*, 91, 295-308.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., & Seralini, G. E. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 113(6), 716-720.
- Richards, C. S., Rowlinson, C. C., Cuttiford, L., Grimsley, R., & Hall, M. J. (2013). Decomposed liver has a significantly adverse effect on the development rate of the blowfly *Calliphora vicina*. *International Journal of Legal Medicine*, 127, 259-262.
- Salanitro, L. B., Massaccesi, A. C., Urbisaglia, S., Pería, M. E., Centeno, N. D., & Chirino, M. G. (2022). *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae): Tasas de crecimiento, diferencias de longitud corporal e implicaciones para la estimación del intervalo post mortem mínimo. *Sociedad Entomológica Argentina*, 81(2), 39-48.

- Salimi, M., Rassi, Y., Oshaghi, M., Chatrabgoun, O., Limoe, M., & Rafizadeh, S. (2018). Temperature requirements for the growth of immature stages of blowflies species, *Chrysomya albiceps* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae), under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 8, 1-6.
- Saska, P., Skuhrovec, J., Lukáš, J., Hsin, C., Shu-Jen, T., Alois, H. (2016). Treatment by glyphosate based herbicide alters life history parameters of the rose-grain aphid *Metopolophium dirhodum*. *Scientific Reports*, 6, 27801
- Schneider, M. I., Sanchez, N., Pineda, S., Chi, H., & Ronco, A. (2009). Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): ecological approach. *Chemosphere*, 76(10), 1451-1455.
- Tominack, R. L., Yang, G. Y., Tsai, W. J., Chung, H. M., & Deng, J. F. (1991). Taiwan National Poison Center survey of glyphosate-surfactant herbicide ingestions. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 29(1), 91-109.
- Wolff, M., Builes, A., Zapata, G., Morales, G., & Benecke, M. (2004). Detection of Parathion (O, O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphorothioate) by HPLC in insects of forensic importance in Medellín, Colombia. *Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 5(1), 6-11.
- Zanetti, N. I., Visciarelli, E. C., & Centeno, N. D. (2015). Associational patterns of scavenger beetles to decomposition stages. *Journal of Forensic Science* 60, 919-927.
- Zanetti N. I. (2020). Desarrollo de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) bajo el efecto de fluoxetina. 1° Simposio virtual Latinoamericano de “ENTOMOLOGÍA FORENSE”. Alcance geográfico internacional (virtual). Bolivia. Del 3 al 4 de Julio de 2020. [https://www.youtube.com/playlist?list=PLcg6oxytR-Dqvob4AWHrMiG\\_PkUrgkpnl](https://www.youtube.com/playlist?list=PLcg6oxytR-Dqvob4AWHrMiG_PkUrgkpnl)
- Zanetti, N. I., Ferrero A. A., & Centeno N. D. (2019a). The use of two fly species to detect the antidepressant fluoxetine post-mortem (Diptera: Calliphoridae: *Lucilia sericata* meigen, sarcophagidae: *Sarcophaga crassipalpis* Macquart). *Entomologica Americana* 125(1-4): 4-9.
- Zanetti, N. I., Ferrero, A. A., & Centeno, N. D. (2019b). Depressions of *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) on Bones Could be Pupation Chambers. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 40, 122-124.
- Zanetti, N. I., Costantino, A., Lazzarini, N., Ferrero, A. A., & Centeno, N. D. (2021). *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) development under fluoxetine effect using two drug administration models. *Journal of Forensic Sciences*, 66(1), 245-254.