



UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

INSTITUTO DE ENTOMOLOGÍA



**Evaluación de los daños generados en *Hermetia illucens* (Linnaeus) (Diptera: Stratiomyidae)
por un inhibidor de la síntesis de quitina: Lufenuron**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
ENTOMOLOGÍA

Por:

Mónica Ardiles Ayala

Director de Tesis

Christian González Aravena

PUERTO MONTT – CHILE

Abril, 2023

INSTITUTO DE ENTOMOLOGÍA UMCE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa al Instituto de Entomología que la Tesis de Magíster presentada por la candidata,

Mónica Ardiles Ayala

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias con Mención en Entomología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 31 de Mayo del año 2023.

Director de Tesis:

Christian González Aravena

Calificación:

Firma:

Comisión evaluadora de Tesis:

Antonio Rivera Hutinel

Calificación:

Firma:

Cristóbal Briceño Urzúa

Calificación:

Firma:



UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACION
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – DIRECCION DE INVESTIGACION

IDENTIFICACIÓN DE TESIS

Título de la tesis: **Evaluación de los daños generados en *Hermetia illucens* (Linnaeus) (Diptera: Stratiomyidae) por un inhibidor de la síntesis de quitina: Lufenuron.**

Fecha: 31-05-2023

Facultad: Ciencias básicas

Departamento: Instituto de Entomología.

Programa: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología. Grado: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología.

Profesor Director de Tesis: Christian González Aravena

AUTORIZACIÓN

Se autoriza la reproducción total o parcial de este trabajo de investigación para fines académicos por cualquier medio o procedimiento, siempre que se haga la referencia bibliográfica que acredite el presente trabajo y sus autores/as, y a su vez el alojamiento de éste en el repositorio institucional SIBUMCE del sistema de bibliotecas UMCE.

Mónica Ardiles Ayala

Puerto Montt de Chile, 26 de Mayo,
2023.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi Profesor Christian González por el apoyo al desarrollo de esta tesis. Agradezco sinceramente su dedicación y paciencia a mi formación profesional.

A la empresa Natpro SpA. quienes hicieron posible la ejecución de esta tesis al facilitar sus dependencias, el material biológico y por financiar parte de este estudio.

Al equipo humano de la Unidad de Crianza de la empresa Natpro quienes, con su optimismo y conocimiento, me ayudaron a realizar la etapa de crianza y reproducción en las mejores condiciones posible.

De igual modo, agradecer a Camilo Cáceres de la empresa SGS Puerto Varas, quien me aportó con sus conocimientos sobre el análisis de cromatografía.

Al Dr. Antonio Rivera por permitirme concretar mis deseos de aprender más sobre estadística.

Finalmente quisiera agradecer a mi marido Cristian, quien me alentó y apoyó en los momentos necesarios para el desarrollo de este estudio.

Para Alejandra, que en paz descansa

ÍNDICE

1	FORMULACIÓN GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
2	HIPÓTESIS	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo General.....	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
4	CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	22
4.1	Antecedentes.....	22
4.2	Morfología de <i>Hermetia illucens</i>	24
4.2.1	Diagnosis	24
4.2.2	Adulto	25
4.2.3	Larva.....	26
4.2.4	Pupa	29
5	CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1	Definición de las concentraciones de Lufenuron.....	31
5.2	Metodología.....	32
5.2.1	Preparación del alimento	32
5.2.2	Preparación de los insectos.....	32
5.2.3	Experimento.....	33
5.2.4	Análisis químico del lufenuron.....	36
5.2.5	Evaluaciones y muestreos.....	37
5.3	Análisis estadístico	41
6	CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	42
6.1	Desarrollo de la etapa larval	42
6.2	Evaluación de la etapa pre imaginal	44
6.3	Evaluación de la etapa imaginal	45
6.4	Factor de bioacumulación (BAF)	47
6.5	Daños morfológicos.....	48
7	CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN	56
7.1	Daños morfológicos.....	58
7.2	Bioacumulación.....	60
8	BIBLIOGRAFÍA	63
9	ANEXOS I.....	74

10	ANEXOS II	75
11	ANEXOS III: Detalle del tipo de daño en larva L5, pupa y adulto	76
12	ANEXOS III: Detalle del tipo de daño en larva L5, pupa y adulto	77
13	ANEXOS III: Detalle del tipo de daño en larva L5, pupa y adulto	78

ÍNDICE IMÁGENES

Figura 1. Genitalia del macho de <i>Hermetia aurinotata</i>	26
Figura 2. Cabeza de la larva del quinto instar de <i>Hermetia illucens</i>	28
Figura 3. Larva del quinto instar de <i>Hermetia illucens</i>	28
Figura 4. Pupa de <i>Hermetia illucens</i>	30
Figura 5. Cabeza de la larva del quinto instar de <i>Hermetia illucens</i> .	51
Figura 6. Daños Larva del quinto instar de <i>Hermetia illucens</i>	52
Figura 7. Daños en pupa de <i>Hermetia illucens</i> .	53
Figura 8. Daños en adulto de <i>Hermetia illucens</i> .	54
Figura 9. Genitalia del macho normal y dañada de <i>Hermetia illucens</i>	55

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Número de adultos por cada réplica evaluados en el TR6.....35

Tabla 2: Peso de la larva del quinto instar, tiempo de desarrollo y sobrevivencia de las larvas de *Hermetia illucens* alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de ANOVA seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $p < 0,05$) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; $n=3$ 44

Tabla 3: Peso, tamaño y tasa de eclosión de la pupa de *Hermetia illucens* alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de ANOVA seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $P < 0,05$) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; $n=3$ 46

Tabla 4: Peso, tamaño y radio hembra/macho del adulto de *Hermetia illucens*. Alimentadas en estado larval con los Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de Kruskal Wallis seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $P < 0,05$) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; $n=3$ 46

Tabla 5 Factor de bioacumulación (BAF) en larvas y sustrato de *Hermetia illucens*. En la etapa de crianza las larvas fueron alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de ANOVA seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $P < 0,05$) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; $n=3$47

Tabla 6 Fecundidad de la hembra y porcentaje de eclosión de los huevos de *Hermetia illucens*. En la etapa de crianza las larvas fueron alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069

mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6=1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de Anova seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $P < 0,05$). Datos informados como promedio \pm desviación estándar; $n=3$48

Tabla 7: Daño morfológico evaluados en estado de L5, pupa y adulto de *Hermetia illucens*, la cual fue alimentada con los siguientes tratamientos en la etapa de crianza Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de Anova seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $P < 0,05$) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; $n=3$50

ÍNDICE GRÁFICOS

Gráfico 1: *BoxPlot del desempeño de la larva, peso de la larva del quinto instar, tiempo de desarrollo y sobrevivencia de las larvas de Hermetia illucens alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron.* **43**

RESUMEN

La crianza en cautiverio de insectos comestibles ha nacido como una alternativa sustentable para satisfacer el creciente aumento de la demanda de proteínas y lípidos para la alimentación animal. La calidad e inocuidad de la dieta que se usa para alimentar estos insectos toma una alta relevancia al influir directamente en el aumento de la biomasa, el crecimiento del insecto, la inocuidad de las larvas y subproductos que se obtengan de esta.

La presencia de insecticidas puede estar en las dietas usadas para la alimentación, lo que podría provocar bioacumulación en las larvas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial daño que pudiera generar el insecticida inhibidor de la síntesis de quitina, lufenuron, cuando está presente en la alimentación de las larvas de *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). Se probaron cinco concentraciones de lufenuron, todas ellas por debajo del máximo permitido por la normativa chilena, además del control (sin Lufenuron).

La sobrevivencia de las larvas tratadas con lufenuron fue afectada en comparación al control. El peso de la larva, pupa y adulto se vio afectado con respecto al control cuando las concentraciones fueron mayor o igual a 0,282 mg/kg de lufenuron. Todas las concentraciones evaluadas tuvieron un factor de bioacumulación menor a 1. La falta de bioacumulación en la larva indica que no existiría riesgo de alimentar a las larvas con concentraciones que están por debajo de lo analizado en este estudio (1,066 mg/kg lufenuron). Sin embargo, las evaluaciones morfológicas encontradas evidencian daños en larvas, pupas y adultos. Además, se obtuvo que la fertilidad de la hembra fue afectada cuando en su estado larval consumió lufenuron y que la eclosión de la descendencia de estos, también se vio afectada respecto al control.

Se deben realizar constantes monitoreos y una fiable trazabilidad de las dietas para evitar el ingreso de lufenuron en la alimentación de las larvas, sobre todo cuando son destinadas para generar reproductores para la colonia en cautiverio de *Hermetia illucens*.

Palabras clave: *Hermetia illucens*, lufenuron, pesticida, bioacumulación, morfología.

ABSTRACT

The indoor breeding of edible insects has emerged as a sustainable alternative to fulfill the growing demand for proteins and lipids for animal feed. The quality and safety of the diet used to feed these insects is highly relevant as it directly influences the increase in biomass, the growth of the insect and the safety of the larvae and by-products obtained from it.

The presence of insecticides may be in the diets used for feeding, which could cause bioaccumulation in the larvae. The objective of this work was to study the potential damage that the insecticide inhibitor of chitin synthesis, lufenuron, could generate when it is present in the feeding of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. Five concentrations of lufenuron plus control (without insecticide) were tested, all of which are below the maximum allowed by Chilean regulations.

Survival of larvae treated with lufenuron was affected compared to control. The weight of the larva, pupa and adult was affected with respect to the control when the concentrations were greater than or equal to 0.282 mg/kg of lufenuron. All the concentrations evaluated had a bioaccumulation factor of less than 1. The lack of bioaccumulation in the larva indicates that there would be no risk of feeding the larvae with concentrations that are below that analyzed in this study (1,066 mg/kg lufenuron). However, the morphological evaluations found in this study show damage in the larvae, pupae, and adults. In addition, it was obtained that the fertility of the adult female was affected and the hatching of their offspring was also affected compared to the control.

Constant monitoring and traceability must be carried out to avoid the entry of lufenuron into the feeding of the larvae, especially when destined to generate reproducers for the *Hermetia illucens* colony.

Key words: *Hermetia illucens*, lufenuron, pesticide, bioaccumulation, morphology.

1 FORMULACIÓN GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

La creciente población mundial, y el consecuente aumento de la demanda de fuentes de alimento, ha generado una presión en la generación de estos. En consecuencia, se ha gatillado la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas más amigables con el medio ambiente y más eficientes en su producción. Se espera que, para el año 2050, la población mundial asciende a 9.700 millones de personas y se prevé que la actual producción de alimento se debe duplicar (Van Huis *et al.*, 2013). Por lo que una real alternativa para suplir la creciente demanda de proteínas y grasas son los insectos (Van Huis *et al.*, 2013).

La crianza en cautiverio o el cultivo de insectos como recurso alimenticio ha ido creciendo rápidamente durante los últimos años (Ojha *et al.*, 2020). La facilidad que hay para manejar grandes volúmenes de insectos, en un periodo corto de tiempo, promueven la producción en escala de este modelo de negocio (Van Huis *et al.*, 2013). Además, estos insectos comestibles son capaces de alimentarse de una amplia variedad de residuos los cuales los transforman en ingredientes de alto valor energético, proteico, grasas y vitaminas (Rumpold & Schlüter, 2013); pudiendo ser usado como ingrediente en la alimentación humana y animal (Fasolin *et al.*, 2019). Pueden ser destinados para la producción de biocombustibles (Zheng *et al.*, 2012) y también, ser usadas las excretas de los insectos como mejoradores de suelo (Klammsteiner *et al.*, 2020).

Las larvas de *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), especie saprófaga, se caracterizan por su eficiencia en la conversión de residuos (razón conversión alimento/proteína, (Oonincx *et al.*, 2015), por las características nutricionales de las larvas (Surendra *et al.*, 2016; Shumo *et al.*, 2019; Surendra *et al.*, 2020) y por presentar una gran plasticidad en cuanto a su fuente de alimentación. Las larvas son capaces de alimentarse de residuos vegetales (Lalander *et al.*, 2019), guano de gallina (Xiao *et al.*, 2018), residuos de la agroindustria (Lalander *et al.*, 2019) así como también de algunos residuos que genera la acuicultura (Lopes *et al.*, 2020).

Diversos aspectos en la seguridad alimentaria de las larvas, incluyendo la presencia de contaminantes en las dietas (Bessa *et al.*, 2021; Hoek-van den Hil *et al.*, 2022; Meijer *et al.*, 2021;

Purschke *et al.*, 2017) recientemente han comenzado a investigarse. Algunos de los aspectos a considerar son: 1) la presencia de drogas veterinarias que pudieran estar presentes en la alimentación de las larvas (Hoek-van den Hil *et al.*, 2022), 2) la presencia de insecticidas en los residuos de la agroindustria y, por último, 3) la bio acumulación en las larvas de *H. illucens*, de drogas veterinarias como de insecticidas, lo cual podría ser un problema al exceder los límites máximos permitidos en las larvas que son usadas como fuente de alimento para otros animales. (“Risk Profile Related to Production and Consumption of Insects as Food and Feed,” 2015).

En cuanto al uso de antiparasitarios y pesticidas se ha considerado por décadas el uso de pesticidas neuroactivos de amplio espectro para el control de artrópodos considerados plagas por la industria agrícola, forestal, o en la salud pública (Cohen, 1993). Debido al daño medioambiental que generan este tipo de pesticidas, se han empleado pesticidas selectivos para el control de plagas (Payá *et al.*, 2013). En esta línea, el tipo de insecticidas mayormente usado en la actualidad para el control de plagas y la protección de la salud humana son los del tipo reguladores de crecimiento en insecto (IGR) (Rösner *et al.*, 2020). Estos insecticidas son selectivos, menos persistentes y amigables con el medio ambiente (Sun *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016); son capaces de interferir con el crecimiento, desarrollo y reproducción de los insectos; de baja toxicidad en mamíferos y ausencia de efectos mutagénicos y teratogénicos en animales de sangre caliente (Mondal & Parween, 2000). Los tres grupos de IGR más importantes son, los análogos a la hormona juvenil, antagonista de la ecdisona y los inhibidores de la síntesis de quitina. Lufenuron es un inhibidor de la síntesis de quitina y pertenece al grupo benzoilurea o benzoilfenilurea, BPU por su sigla en inglés (BPU).

Los BPU tienen un amplio rango de uso. En veterinaria son comúnmente usados como antiparasitarios en el control de *Rhipicephalus microplus* (Ixodida: Ixodidae) (garrapatas en vacas), control de *Ctenocephalides* spp. (Siphonaptera: Pulicidae) (pulgas en ovejas) y control del crustáceo *Caligus* spp. (Siphonostomatoida: Caligidae) parásito de salmónidos (Junquera *et al.*, 2019). En cuanto a la agricultura, los BPU son usados para el control selectivo de larvas de lepidópteros como, por ejemplo, *Tuta absoluta* (polilla del tomate) que afecta al cultivo del tomate, *Phthorimaea operculella* (polilla de la papa) en el cultivo de las papas, *Cydia pomonella* y *Cydia molesta* (polilla del manzano y polilla oriental, respectivamente) que afectan a frutales en general (Syngenta, 2021).

También son usados para el control de coleópteros, algunos tisanópteros, dípteros que afectan un amplio rango de cultivos como el maíz, papas, uvas, cítricos, frutales en general y cultivos ornamentales (FAO, 2008).

El modo de acción de los BPU en los artrópodos terrestres, es al unirse a la quitina sintetasa 1, una glicosiltransferasa de la membrana (Douris *et al.*, 2016), causando la inhibición de la síntesis de quitina (Sparks & Nauen, 2015). La efectividad de estos compuestos está dada por ser un compuesto de amplio espectro, por lo que se puede extender a las siguientes generaciones (Mommaerts *et al.*, 2006). Provoca en los individuos formación defectuosa de la quitina por depósitos endocuticulares anormales, pudiendo afectar al desarrollo de las tráqueas (Wang *et al.*, 2006), muda abortiva, fenotipos anormales (Merzendorfer, 2013), aumento de la letalidad del adulto y falta o disminución de la eclosión de los huevos en los artrópodos (Zhu *et al.*, 2016). Algunos de ellos afectan la formación y el funcionamiento de la matriz peritrófica del sistema digestivo (Merzendorfer, 2013).

El lufenuron es un insecticida perteneciente a la clase química de los BPU. Su número CAS es 103055-07-8 y su fórmula química es: ((RS)-1-[2,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxil)phenyl]3-(2,6-difluorobenzoyl). Fue sintetizado por primera vez por Ciba-Geigy a mediados de 1980 (Sun *et al.*, 2015) y fue introducido, comercialmente, en 1990 para el control de pulgas (Siphonaptera) en perros y para el control de plagas en la agricultura (Match™, Syngenta) (Junquera *et al.*, 2019).

El uso de lufenuron en Chile se centra en la agroindustria a través del uso del insecticida Sorba 050 EC™ de Syngenta S.A (Syngenta, 2021) para el control de plagas en la agricultura. La concentración de lufenuron en este producto es del 5 % p/v (50 g/l), lo que equivaldría según recomendación de la etiqueta, a 75 g de lufenuron por hectárea para el control de *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) en frutales de carozos. Sorba 050 EC™ está autorizado en el país desde el 2006.

En la industria salmonera el uso de BPU es para el control del *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae), el ectoparásito más abundante en Chile (Boxshall &

Bravo, 2000). El uso de los BPU en esta industria es a través de los ingredientes activos lufenuron y hexaflumuron. Ambos son el principal tratamiento para el control del Caligus junto con peróxido de hidrógeno. Lufenuron es aplicado en el alimento de los salmones smolt antes de ser llevados al mar y es administrado en concentraciones de 5 mg/Kg pez/día /7 días con ingrediente activo al 10%. Hexaflumuron es aplicado en el mar a través del baño de jaulas con el uso de lonas, en dosis de 2 ppm/ 2 horas con ingrediente activo al 10% (Bravo & Treasurer, 2023). El uso de BPU para la industria salmonera Chilena fue aprobado en el año 1990 y en el 2016 se aprueba el uso de lufenuron para la formulación de alimento medicado para el control del Caligus (Imvixa™, from Elanco) (Junquera *et al.*, 2019).

La normativa Chilena ha establecido en el marco legal para medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano indicados en la Resolución Exenta N°1.560 publicada el 11 de septiembre del 2019 del Ministerio de Salud de la República de Chile (Resolución exenta N°1.560. Diario Oficial de la República de Chile, 11 de septiembre de 2019). Esta Resolución fija los límites máximos de residuos (LMR) de los medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. Para el caso del lufenuron establece que, para el tejido muscular, con piel de peces cultivados es de 1,35 mg/kg.

Se ha documentado que larvas de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) alimentadas con lufenuron en la dieta, provocaron una muerte inmediata de las larvas debido al colapso del exoesqueleto. Las pupas sobrevivientes tuvieron una forma aplanada y los adultos sobrevivientes resultaron deformes con patas torcidas y alas deformes (Wilson and Cryan 1997). Por otro lado, cuando el lufenuron es rociado en una superficie en la que se posa un mosquito como el *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Este es capaz de transferir en sus patas el insecticida hacia el sitio donde se encuentran las larvas, provocando en ellas su muerte (Gonzalez & Harburguer, 2020). Es curioso que en la agricultura orgánica se recomiende el uso de lufenuron para el control de plagas y que algunos autores recomienden hacer aplicaciones aéreas de este producto para el control de plagas pues hay riesgos mínimos para las especies no plaga (Sampson *et al.*, 2017) y por otro lado, el hecho de que no existan estudios de caracterización de daños en crustáceos producidos por este medicamento veterinario usado en la industria salmonera (Poley *et al.*, 2018).

Debido al uso autorizado de BPU, como el lufenuron, por la normativa Chilena en la agroindustria y en la salmonicultura. Se propone realizar un bioensayo, en laboratorio, para abordar los posibles escenarios de concentración de lufenuron que pudieran estar presentes en los residuos orgánicos generados por estas dos industrias y, que las larvas de *H. illucens* pudieran verse enfrentadas. Se propone realizar dos tratamientos centrales: 1) Larvas de *H. illucens* alimentadas con dieta con concentraciones conocidas de lufenuron; 2) Larvas de *H. illucens* con dieta libre del antiparasitario.

2 HIPÓTESIS

La presencia de lufenuron, en la dieta de las larvas de *Hermetia illucens*, afectará negativamente el desarrollo morfológico de las larvas, pupas e imago, así como los parámetros reproductivos de los adultos obteniéndose ejemplares con bajas tasas de fecundidad de la hembra y un bajo porcentaje de eclosión de los huevos. Se espera que las larvas no bioacumulen en su organismo el lufenuron.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Comparar los efectos del lufenuron en la morfología, desarrollo, sobrevivencia y adecuación de *Hermetia illucens* y su capacidad para bioacumular este compuesto.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de las larvas de *H. illucens* para degradar o bioacumular el lufenuron suministrado en la dieta larval, en distintas concentraciones.
- Caracterizar los efectos del lufenuron, suministrado en distintas concentraciones en la dieta de alimentación larval de *H. illucens*, sobre la morfología de las larvas, pupas y adultos.
- Evaluar los efectos del lufenuron, suministrado en distintas concentraciones en la dieta de alimentación larval de *H. illucens*, sobre la fecundidad de las hembras y la emergencia larval.

4 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

4.1 Antecedentes

Los Diptera son insectos holometábolos, que reúnen unas 158.000 especies conocidas, las cuales se agrupan en 180 familias (Yeates & Wiegmann, 2017). Se distribuyen en todos los ecosistemas del planeta, incluyendo la Antártica. Presentan una gran plasticidad ecológica y morfológica, algunas larvas consumen tejido vegetal o animal, otras materia en descomposición o incluso existen especies parasitoides. Las especies de Diptera presentan roles ecológicos variados. Algunas familias tienen importancia médica al actuar como vectores de patógenos causantes de serias enfermedades tales como la malaria (especies de *Anopheles*), fiebre amarilla (*Aedes aegypti*) y la fiebre del dengue (*Aedes spp.*) (Beutel *et al.*, 2013). Otras familias tienen importancia agrícola, ya que pueden ocasionar daños económicos en las plantaciones agrícolas al causar daños severos en los frutos, hojas y/o tallos, como las especies de la familia Agromyzidae, Tephritidae y Anthomyiidae, entre otras (Beutel *et al.*, 2013).

Los Diptera son un grupo monofilético bien definido (Yeates & Wiegmann, 2017). Se caracterizan por poseer un solo par de alas funcionales, las mesotorácicas, mientras que las metatorácicas se presentan reducidas (halteres), y las piezas bucales están adaptadas para succionar líquidos (McAlpine, 1981).

Estudios moleculares y morfológicos relacionan a los Diptera con Siphonaptera (pulgas) y Mecoptera (moscas escorpión) (Yeates & Wiegmann, 2017). La relación con estos grupos está basada en la evidencia de tener características similares en el aparato bucal, musculatura de la cabeza y estructuras internas de la cápsula de la cabeza de sus larvas (Beutel *et al.*, 2011 como se citó en Yeates & Wiegmann, 2017)

Los Diptera prestan diversos servicios ecosistémicos con importancia positiva. Sin embargo, destaca, por su importancia para el hombre, la polinización de plantas cultivadas. Existen más de cien plantas cultivadas que son polinizadas por dípteros (Ssymank *et al.*, 2008). La especie *Eristalis*

sp. (Diptera: Syrphidae) es usada para la polinización de pimientos en invernaderos (Ssymank *et al.*, 2008), mientras que especies de Ceratopogonidae polinizan el cacao y algunas especies de Tephritidae polinizan especies de orquídeas (Beutel *et al.*, 2013).

Las larvas de Calliphoridae, Stratiomyidae, Phoridae entre otras familias, tienen una importancia en la entomología forense ya que son capaces de alimentarse de cadáveres y residuos orgánicos. Lo que permite, sumado a otros antecedentes biológicos y ecológicos, determinar el intervalo post mortem (Beutel *et al.*, 2013; Pujol-Luz *et al.*, 2008).

Con respecto a la clasificación taxonómica del orden Diptera que considera la filogenética para su ordenamiento, se reconocen cinco infraordenes o subordenes: Bibionomorpha, Brachycera inferior, Culicomorpha, Psychodomorpha y Tipulomorpha (Yeates & Wiegmann, 2017). Dentro de los Brachyceras inferiores se encuentra la familia Stratiomyidae. Esta familia está distribuida en todo el mundo y reúne unas 2.800 especies aproximadamente agrupadas en 369 géneros (Fachin *et al.*, 2021). En Chile, la familia está representada por 73 especies en 24 géneros y 8 subfamilias (Fachin *et al.*, 2021).

Los Stratiomyidae o moscas soldados, son moscas de tamaño pequeño a grande con un largo de cuerpo que varía entre los 2 a 34 mm. Son muy variados en su coloración, forma y en la diversidad de hábitat en la que se pueden encontrar (Fachin *et al.*, 2021; Woodley, 2001). Los estados inmaduros están asociados mayormente a materia orgánica en descomposición, saprófago bajo cortezas, en fuentes de agua como lagos o ríos (Fachin *et al.*, 2021). Con respecto a las fuentes de alimentación, la especie *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758), conocida como mosca soldado negro, es la especie de mayor relevancia económica de la familia, debido a que la larva posee una gran versatilidad en cuanto a su fuente de alimentación. Se ha documentado que, las larvas de esta especie son capaces de alimentarse de residuos vegetales y de la agroindustria (Lalander *et al.*, 2019), guano de gallina (Xiao *et al.*, 2018) como también de algunos residuos que genera la acuicultura (Lopes *et al.*, 2020).

La especie es sinantrópica, nativa del nuevo mundo. Comprendiendo las áreas más al norte

de Sudamérica y más al sur de Estados Unidos. Hoy en día la especie es cosmopolita (Fachin *et al.*, 2021). La crianza en cautiverio de este insecto ha ido creciendo durante los últimos años debido a la facilidad que hay para manejar grandes volúmenes de insectos en un periodo corto de tiempo (Van Huis *et al.*, 2013). Además, el potencial nutricional que alcanzan las larvas permite transformarlas en ingredientes de alto valor energético, proteico, grasas y vitaminas (Rumpold & Schlüter, 2013), pudiendo ser usado como ingrediente en la alimentación humana y animal (Fasolin *et al.*, 2019). Pueden ser destinados para la producción de biocombustibles (Zheng *et al.*, 2012) y también ser usadas las excretas de los insectos como mejoradores de suelo (Klammsteiner *et al.*, 2020).

4.2 Morfología de *Hermetia illucens*

4.2.1 Diagnósis

Especie grande la cual puede medir entre 13 y 20 mm, cuerpo color negro, cabeza negra con una franja blanca en zona anterior. Esclerito occipital medio con dos manchas blancas. Ojos desnudos, omatidios uniformes y pequeños, triángulo ocelar desarrollado, dicópticos en ambos sexos (Oliveira *et al.*, 2016; Üstüner *et al.*, 2017). Palpos maxilares ubicados en la zona frontal de la cabeza lateral al rostrum (Pezzi *et al.*, 2021). Están compuestos por dos segmentos. El primer segmento es cónico y cubierto solo por microtrichas. Mientras que el segundo, es más largo y posee sensilas chaéticas. El palpo maxilar de la hembra es más largo que en el macho (Pezzi *et al.*, 2021). Antenas negruzcas, pedicelo cilíndrico y doblado en la base. La superficie es rugosa y cubierta con microtricha en ambos lados. La hembra posee sensilas cortas en la base del pedicelo, mientras que el macho posee sensilas largas. El pedicelo tiene una forma cónica truncada que es más ancha distalmente. El flagelo está compuesto por 8 flagelómeros, tiene forma apical espatulado (Pezzi *et al.*, 2017). Tórax negro, no jorobado, caliptra no alargada. Escutelo prominente de color negro brillante con callo humeral. Callo post alar y margen posterior de escutelo negro (Roy *et al.*, 2018). Alas pueden ser de color negras a café. Con cuatro venas medias que nacen de la celda discal y que van desapareciendo a medida que se acercan al margen del ala. Halterios de color blanquecino y color verdoso en zona distal. Patas negras con tarsos de color blanco, mitad superior de la tibia de color blanco sin espina. Abdomen negro con tergitos 1 y 2 traslucidos de forma oblonga (Oliveira *et al.*,

2016).

4.2.2 Adulto

El ancho de la cabeza del adulto es similar al ancho del tórax. Triángulo ocelar. Palpos maxilares constituidos por dos segmentos y ubicados en la zona frontal de la cabeza (Pezzi *et al.*, 2017). Poseen dimorfismo sexual en el largo total del palpo maxilar. El palpo maxilar de la hembra es el doble que en el macho. En la punta del palpo se encuentra una única sensila chaetica (Pezzi *et al.*, 2017) . Labela grande (900 µm largo x 570 µm ancho) con ausencia de dientes prestomales, en su lugar posee pseudotráqueas (Lehnert *et al.*, 2022). Mesotórax negro, cubierto por una densa capa de setas. Escutelo sin espinas marginales. Tarso posee uña y pulvilos tarsales (Üstüner *et al.*, 2017).

La genitalia del macho presenta un epandrium relativamente corto, con forma emarginada proximalmente, cápsula genital (sinsternito) con dos lóbulos posterolateral, uno a cada lado y un par de gonostilo reducido (Roy *et al.*, 2018). Gonostilo con forma digitiforme con proyecciones en el margen distal y proximal, con lubo mediano. Proctiger subtriangular. Esternito 10 bien desarrollado, más corto que el epandrium; cercos de forma redonda, alargados en la punta. Complejo aedeagal muy delgado y dilatado en la parte basal (Üstüner *et al.*, 2003) (Fig 1)

La genitalia de la hembra posee dos largos cercos segmentados, alargado plato subgenital y puntiagudo distalmente. Furca genital subtriangular con una apertura media inusualmente amplia. Proyecciones posterolaterales en forma de hoja (Üstüner *et al.*, 2003). (Fig 1)

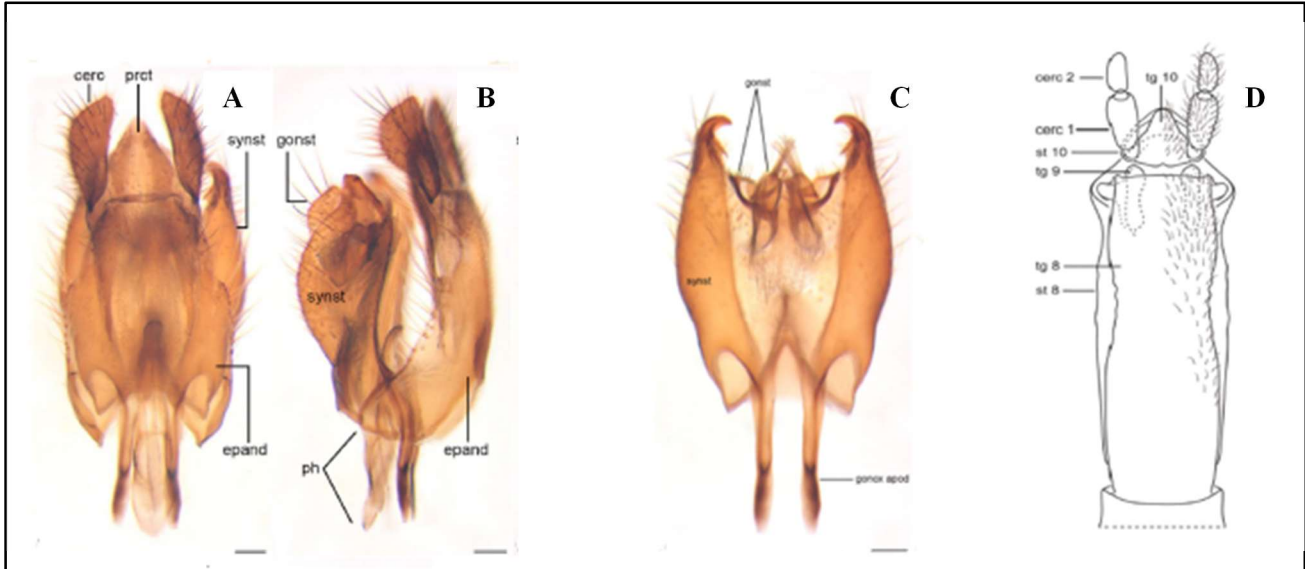


Figura 1.

Genitalia del macho de *Hermetia aurinotata*. A: Vista dorsal de la genitalia con falo. Cerc: Cerco; Epand: Epandrium; Prct: Proctiger. B: Vista lateral de la genitalia con falo, Epand: Epandrium; Gonst: Gonostilo y Synst: Sinsternito. C: Vista ventral de la genitalia sin falo. D: Imagen de la vista dorsal de la genitalia de la hembra de *Hermetia brachygastropsis*. Cer: Cerco; St: Esternito; Tg: Tergito. Barra de escala 0,1 mm. Adaptado de Fachin & Hauser, 2022.

4.2.3 Larva

Las larvas son apodas, hemicéfala y holopnéstica. El cuerpo de la larva es segmentado y está constituido por 12 segmentos (incluyendo la cápsula cefálica) (Barros *et al.*, 2019). Las larvas tienen 6 estadios larvales donde el sexto instar es conocido comúnmente como prepupa.

Cuerpo elongado y aplanado dorso ventralmente. Pueden llegar a medir 3 cm de longitud, su cuerpo está rodeado de setas y sensilas las cuales van cambiando de color dependiendo del estadio en que se encuentre.

La cabeza es de forma cónica con secciones transversales redondeadas, la posición de las piezas bucales prognata. Dorsal, presenta un doble esclerito con forma de gancho tridentado en zona

distal de la cabeza. Labro cónico, robusto con una pequeña protuberancia en zona distal donde alberga algunas sensilas. Posee dos lóbulos de la gena muy pronunciada que protegen el aparato mandibular-maxilar. Ventral, cavidad bucal ocupa el primer tercio de la cabeza. Cavidad bucal presenta una densa capa de espinas y dos lóbulos ventrales membranosos de forma semilunar que alcanzan a tocar el prementum (Bruno *et al.*, 2020).

El aparato mandibular-maxilar, fusión de la mandíbula con la maxila, posee una epifaringe curva en el centro y un prementum membranoso en zona apical cubierta con finas espinas. Al centro del aparato mandibular-maxilar se encuentra bien desarrollada la hipofaringe, al centro de esta, se encuentra la zona molar (Bruno *et al.*, 2020).

La cápsula cefálica está unida al protórax por un esclerito retráctil y esclerosado. Las distintas estructuras que conforman la cápsula cefálica se muestran en la Fig. 2. Las antenas son biarticuladas, protegidas por almohadillas robustas. Los segmentos que conforman la antena son un carácter de reconocimiento para diferenciar los instars de las larvas (Barros *et al.*, 2019).

El tórax está cubierto por setas y ornamentos redondeados en la cutícula. Está compuesto por tres segmentos que se asemejan a placas rectangulares superpuestas. Protórax con un par de espiráculos laterales prominentes más largo que el resto. Zona estigmática con dos espiráculos que forman una “V”. Mesotórax sin espiráculos. Metatórax con espiráculos vestigiales dorsolateral redondeados. El color del tórax cambia de acuerdo al instar de la larva (Barros *et al.*, 2019).

El abdomen está constituido por ocho segmentos de forma similar a los del tórax. Está cubierto por sensilas en forma de espinas y están ubicadas ventralmente en el margen anterior a excepción del octavo segmento. Posee un par de espiráculos vestigiales laterodorsales en el primer segmento abdominal hasta el séptimo. Octavo segmento más grande que el resto, posee un espiráculo chimenea que es mucho más grande que los espiráculos funcionales. Se encuentra rodeado por una fila de setas. Abertura anal rodeada de setas cortas y gruesas en forma de espina (Fig. 3) (Barros *et al.*, 2019).

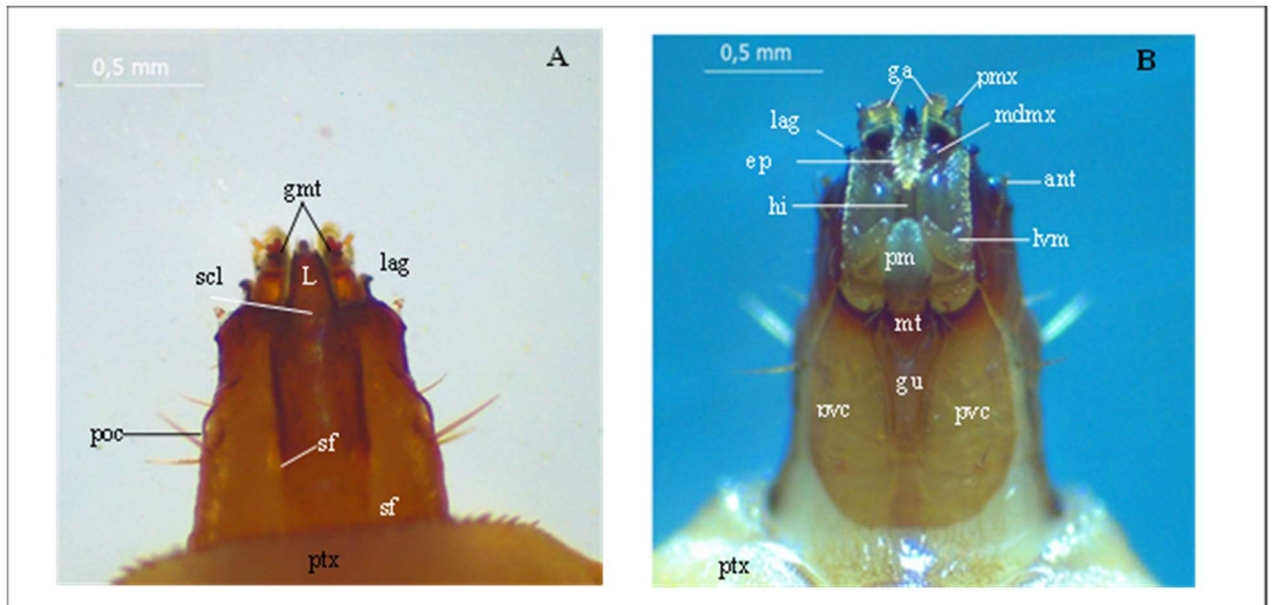


Figura 2.

Cabeza de la larva del quinto instar de *Hermetia illucens*. **A:** vista dorsal de la cabeza y borde del protórax. **B:** Vista ventral de la cabeza y borde del protórax.

Abreviaciones: **afc**- apotoma frontoclipeal, **ant**- antena, **ecl**- esclerito clipeolabral, **ep**- epifaringe, **ga**- galea, **gmtd**- gancho mandibular tridentado, **hi**- hipofaringe, **L**-Labro, **lag**- lóbulo anterior de la gena, **lvm**- lóbulo ventral membranoso, **mdmx**- aparato mandibular maxilar, **pmx**- palpo maxilar, **poc**- protuberancia ocular, **ptx**- protórax, **scl**- sutura cíleo labral, **sf**- sutura frontal.



Figura 3.

Larva del quinto instar de *Hermetia illucens*. Vista dorsal. Barra de escala 5 mm. Imagen de Generalovic *et al.*, 2020.

4.2.4 Pupa

Pupa adéctica y coarctata. El cuerpo posee 12 segmentos incluida la cápsula cefálica. Es de color café a café oscuro. La superficie de su cuerpo es rígida y esclerosada, preserva la ornamentación de la cutícula observada en la larva. Cuerpo rodeado de densa pruinosidad de color café a dorado (Cai *et al.*, 2022)

Cápsula cefálica completamente esclerosada, antenas laterales, piezas bucales cubiertas por placa esclerosada. (Oliveira *et al.*, 2016).

Tórax con ausencia de sensilas. Compuesto por tres segmentos que se asemejan a placas rectangulares superpuestas. Protórax posee un par de espiráculos laterales prominentes más largo que el resto de color café oscuro. Zona estigmática con dos espiráculos que forman un V. Mesotórax sin espiráculos. Metatórax con espiráculos vestigiales dorsolateral redondeados. Tórax cubierto por pruinosidad de color café a dorado (Barros *et al.*, 2019).

El abdomen está constituido por ocho segmentos de forma similar a los del tórax. Con ausencia de sensilas. Posee un par de espiráculos vestigiales laterodorsales en el primer segmento abdominal hasta el séptimo. Octavo segmento más grande que el resto, posee un espiráculo chimenea que es mucho más grande que los espiráculos funcionales. Se encuentra rodeado por una fila de setas. Abertura anal con ausencia de setas. Abdomen cubierto por pruinosidad de color café a dorado (Barros *et al.*, 2019).



Figura 4.

Pupa de *Hermetia illucens*. Vista dorsal. Barra de escala 5 mm. Imagen de Generalovic *et al.*, 2020.

5 CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en las dependencias de la empresa Natpro SpA (Península de Chayahué, comuna de Calbuco, Región de Los Lagos). La empresa cuenta con más de 9 años realizando crianza, en cautiverio de la especie *H. illucens* con fines comerciales. La empresa facilitó el uso de sus laboratorios para la crianza de la especie en estudio y proporcionó el material biológico para realizar los ensayos.

5.1 Definición de las concentraciones de Lufenuron

La elección de las concentraciones de lufenuron, en los tratamientos empleados, se centró a lo establecido en la Resolución exenta N°1.560 del Ministerio de Salud de la República de Chile respecto al límite máximo de residuos (LMR) de lufenuron para el tejido muscular, con piel de peces cultivados de 1,35 mg/kg. De acuerdo con este LMR, se estableció una matriz de concentraciones que estuvieron por debajo del LMR permitido y que difirieron entre ellos para obtener una curva de respuesta del proceso de crecimiento en las larvas de *H. illucens* y su incidencia en la morfología de las larvas, pupas y adultos.

Las concentraciones del insecticida utilizado para la dosificación del alimento administrado en la crianza de los individuos en estado larval de este ensayo correspondieron a los tratamientos (TR). TR1= Control 0; TR2= 0,069; TR3=0,149; TR4= 0,282; TR5= 0,878 y TR6= 1,066 (mg/kg) lufenuron.

Los tratamientos fueron administrados sólo en el periodo de crianza de las larvas de este ensayo, a excepción del TR3 donde se empleó una modificación en la forma de realizar la alimentación de los individuos en estado larval sin alterar la calidad nutricional del alimento. Este tratamiento consistió en suministrar inicialmente alimento con una concentración de 0,282 (mg/kg) lufenuron durante el 60% del tiempo de crianza de las larvas luego, se cambió el alimento por uno sin insecticida (0 [mg/kg] Lufenuron), el cual se suministró durante el 40% del tiempo restante del periodo de crianza de las larvas. Para el cálculo de la concentración de lufenuron del TR3 se calculó

el porcentaje de alimento suministrado con concentración de 0,282 (mg/kg) Lufenuron con respecto al alimento sin lufenuron. Con ese valor se obtuvo la concentración TR3.

5.2 Metodología

5.2.1 Preparación del alimento

El alimento usado para la alimentación de las larvas de *H. illucens*, consideradas en el experimento, fue el tipo “Gainesville house fly diet” (Hogsette, 1992), el cual consiste en afrechillo de trigo (50%), harina de maíz (20%) y harina de alfalfa (30%). Se usó una humedad del 70% en la dieta.

El insecticida lufenuron (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) utilizado tuvo una pureza del 99,5%. A partir de esta concentración, fue diluido en agua destilada a 20°C (solubilidad lufenuron de 0,046 mg/l a 20°C, (Lewis *et al.*, 2016). Una vez realizada la dosificación de los ingredientes, en un balde de 20 litros, se mezcló con mezclador manual marca Einhell (1.600 Watt) y se revisó la temperatura para obtener los 20°C y así asegurar así la solubilidad del lufenuron.

Antes de alimentar los especímenes considerados en los tratamientos, el alimento fue agitado por la mezcladora manual para asegurar una buena homogeneización de sus ingredientes y del insecticida.

Se muestreo 100 gramos de alimento preparado de cada tratamiento para verificar la concentración de insecticida.

5.2.2 Preparación de los insectos

Se utilizó una nueva cepa de la especie en estudio obtenida a partir de la crusa de moscas de *H. illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae), obtenidas de la colonia perteneciente a la empresa Natpro SpA. con moscas soldado negro colectadas en Chile. Esta nueva cepa fue cruzada y reproducida en

cautiverio por tres generaciones y fue alimentada con la dieta “Gainesville house fly diet”.

Las larvas recién eclosionadas de esta nueva cepa fueron alimentadas con dieta Gainesville house fly diet con una humedad del 70%. Larvas de 7 días de edad (post eclosión) fueron homogeneizadas y seleccionadas libremente al azar para ser usadas en los ensayos.

5.2.3 Experimento

Los tratamientos fueron triplicados en bandejas plásticas (21,5 cm x 15,5 cm x 8 cm). En cada bandeja plástica se puso 800 g de alimento correspondiente a la formulación de cada tratamiento. Sobre el alimento se inocularon 7.000 larvas de 7 días de edad, luego fueron tapadas con malla anti-mosquitera y fueron aseguradas con bandas elásticas para evitar cualquier fuga de larvas durante la crianza. Las bandejas fueron distribuidas en un carro de crianza y este a su vez fue almacenado en la sala de crianza climatizada perteneciente a la empresa Natpro SpA. En esta sala se realizó la crianza de la etapa larval donde se programaron las condiciones ambientales de la temperatura a 28°C y la humedad al 60%.

La alimentación de cada tratamiento fue administrada diariamente *ad libitum*, sin sobrealimentar ni subalimentar. Cuando se observó el 50% de larvas en estado de prepupa (sexto instar), la alimentación fue suspendida. De esta manera, el 50% restante de larvas se alimentó de la dieta que pudo haber quedado disponible. Fue en este momento del experimento que se escogieron al azar treinta larvas por réplica de cada tratamiento para realizar la evaluación morfológica. La etapa de crianza de larvas finalizó cuando se alcanzó el 70% del total de individuos en sexto instar. Luego de esto, los tratamientos fueron separados por filtrado donde se obtuvieron las larvas y el sustrato, también conocido como frass. Este último se clasifica como excretas de las larvas y alimento no consumido. 200 gramos de larvas y 200 gramos de sustrato fueron escogidos completamente al azar por réplica de cada tratamiento para ser evaluados por el Laboratorio SGS para la cuantificación de lufenuron.

Del total de prepupas obtenidas de la crianza de larvas, se escogieron completamente al azar,

460 individuos en estado de prepupa por réplica de cada tratamiento para continuar con el ciclo biológico del insecto. Estos ejemplares fueron trasladados a bandejas plásticas (22 cm x 15,5 cm x 8 cm), las que se cubrieron con mallas anti-mosqueteras para evitar la fuga de moscas. Las bandejas se ubicaron en una sala de crianza climatizada de la empresa Natpro programada con temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y humedad $60 \pm 5\%$.

Luego de 10 días de realizada la selección de prepupas, se ejecutó un nuevo muestreo de 30 pupas por réplica de cada tratamiento para realizar la evaluación morfológica de las pupas.

Una vez que se alcanzará un 30% de emergencia de adultos, los contenedores plásticos que contenían las pupas, fueron trasladados a las jaulas de reproducción especialmente fabricadas para este experimento. Las jaulas fueron fabricadas con malla mosquitera y tenían un volumen de $0,18 \text{ m}^3$. Las jaulas fueron puestas en condiciones ambientales controladas de temperatura ($27 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), humedad (60 a 70%) y fotoperiodo controlado (12 horas luz: 12 horas oscuridad). En cada jaula se pusieron 400 individuos.

Cabe mencionar que el tratamiento TR6= 1,066 (mg/kg) lufenuron en todas sus réplicas, presentó una alta mortalidad de individuos con una consecuente disminución de adultos vivos. Imposibilitando la crianza de adultos en jaulas para su posterior apareamiento.

Al momento de hacer el traslado a las jaulas de reproducción, se muestrearon al azar 30 adultos recién emergidos de cada réplica. Los adultos muestreados se mantuvieron a temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y humedad $60 \pm 5\%$ durante 24 horas en placas petri de 100 x 10 mm, debidamente rotuladas. Luego fueron sacrificados con gas de acetato de etilo para poder realizar las evaluaciones del peso, largo y ancho. Utilizando un aumento de 8x de la lupa estereoscópica, se realizó una revisión visual general de los individuos, contrastándolo según las descripciones realizadas por Oliveira *et al.* 2016.

Luego de dos días de iniciada la crianza de moscas en jaulas, fueron provistas con un contenedor plástico de 10 cm x 6 cm x 4 cm y dentro de él, se puso el atrayente el cual fue formulado

con dieta Gainesville con un 80% de humedad. Sobre el contenedor plástico se posicionó otro contenedor plástico con orificio de 2 mm de diámetro para capturar los huevos depositados por las hembras grávidas. Diariamente se realizó cosecha huevos los cuales fueron pesados en la balanza digital (Balanza digital de precisión 600g x 0,01 aluminio, Quimis).

Una vez finalizada la etapa de apareamiento en las jaulas de reproducción, estas fueron trasladadas a una sala a 20°C para poder disminuir la actividad de vuelo de las moscas y así poder abrir las jaulas sin dificultad. En este momento se colectó todas las moscas que estaban en la jaula, se puso en una fuente de plástico de diámetro de 40 cm con una profundidad de 18 cm con el objetivo de poder homogeneizar la muestra y así realizar el muestreo completamente al azar. Se colectaron 30 individuos vivos por cada réplica para categorizar la sexualidad y además se colectaron 10 machos para realizar la extracción de la genitalia.

La cantidad de adultos evaluados del tratamiento 6 fue menor a la deseada debido a la baja eclosión de adultos vivos. La cantidad de adultos evaluados para este tratamiento se describe en la Tabla 1.

Por último, los huevos recolectados fueron cultivados en una sala con temperatura controlada ($27 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) y humedad controlada (60 a 70%). Las larvas obtenidas fueron alimentadas por 4 días con dieta Gainesville house fly (libre de insecticida) y al quinto día fueron evaluadas para el cálculo de la eficiencia de la eclosión del huevo.

Tabla 1: Número de adultos por cada réplica evaluados en el TR6.

Lufenuron (mg/kg)	Réplica	Macho	Hembra
TR6=1,066	1	24	15
	2	30	11
	3	27	16

5.2.4 Análisis químico del lufenuron

Todas las muestras de este bioensayo fueron evaluadas por el laboratorio SGS sucursal de Puerto Varas, Chile. Donde se realizó una cuantificación de concentración de lufenuron por el método de cromatografía líquida (UPLC) con detección de masas. A continuación, se detalla la metodología usada para la cuantificación de lufenuron en la alimentación, en las larvas que finalizaron la etapa de crianza y el sustrato resultante de este experimento.

5.2.4.1 Análisis instrumental

Para la cromatografía se usó el sistema Waters ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) y se usó el espectrómetro Qtrap 6500 MS equipado con electroscopia. La separación fue realizada por el sistema Acquity UPLC HSS T3, 1.8 μm , 2.1 x 100

5.2.4.2 Extracción

Se usó el método “quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe” (QuEChERS) para la extracción de TORCs del tejido de las larvas. Se usó 5 g de larva triturada y 10 ml de mL HPLC grado acetonitrilo, este fue añadido hasta completar 50 ml. Luego, fue trasladado a los tubos de extracción donde fueron agitados por 1 minuto.

Paquetes de sal QuEChERS (EN 15662) fueron añadidos a los tubos y fueron agitados por 1 minuto. La mezcla fue centrifugada a 3250 rpm por 5 min y el sobrenadante fue evaporado hasta obtener ~1 ml usando N₂. El extracto de larva fue aclarado (clean up) con cartuchos de EMR e inyectados en la misma cantidad con ISTD. Finalmente, la muestra fue evaporada a 0,25 ml antes del análisis instrumental.

5.2.4.3 Análisis instrumental

Para la cromatografía se usó el sistema Waters ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) y se usó el espectrómetro Qtrap 6500 MS equipado con electroscopia.

La separación fue realizada por el sistema Acquity UPLC HSS T3, 1.8 μm , 2.1 x 100 mm usando un caudal de 0.4 ml/min. La temperatura de la columna fue mantenida a 40° C. Se usó el reactivo AccQ-Tag Eluent A con una resistencia de 10MO.cm-1. Amonio formato al 5 mM y 0.1% (v/v) de ácido fórmico. Eluent B fue agua/methanol 5/95 (methanol: Biosolve 13683502 absoluto HPLC Supra Gradiente) (v/v). Amonio formato al 5 mM y 0.1% (v/v) de ácido fórmico. El sistema se ejecutó por 12 min. El gradiente UPLC comenzó con 100% por A 1 min, fue aumentado linealmente a 100% B sobre 5 min, y se mantuvo este porcentaje por 3 min.

Finalmente, la gradiente fue cambiado de 100% A a 0.5 min y equilibrado por 2.5 min antes que la próxima inyección fuera realizada. El volumen de inyección fue de 10 μL .

5.2.4.4 Condición MS/MS

ESI-MS/MS fue ejecutado usando múltiples reacciones monitoreadas (MRM) en modo positivo. La adquisición fue hecha con 10 ms tiempo de permanencia. El tiempo de asentamiento y la pausa MR fue seteada a 5 ms. El número de datos capturados en el peak de la lectura fue de al menos ocho.

La ionización por electroscopia (ESI) fue realizada de la siguiente manera: temperatura 500°C, cortina de gas 35 psi, fue de gas a 1 50 psi, fuente de gas 2 50 psi, voltaje de spray de ion + 4000 V y gas de colisión (nitrógeno).

5.2.5 Evaluaciones y muestreos

5.2.5.1 Determinación del desempeño de la etapa larval

Toda la alimentación asignada fue pesada, como también fue pesada la larva y el sustrato total obtenido del proceso de crianza de cada réplica por cada tratamiento.

Se calculó tres parámetros de desempeño de la crianza de la larva. Los cuales se describen a continuación:

La sobrevivencia de la larva se calculó como el ratio del número de larvas finales (Larva fin) y el número de larvas inicial (larva in) (van der Fels-Klerx *et al.*, 2016)

$$\text{Sobrevivencia larva (\%)} = \frac{\text{Larva}_{fin}}{\text{Larva}_{in}} \times 100$$

La reducción del alimento fue calculado como el ratio del sustrato en materia seca (Sust ms) y el total de alimento asignado en base seca (alimento ms). (Diener *et al.*, 2009)

$$\text{Reducción de alimento (\% MS)} = \left(1 - \frac{\text{Sust}_{ms}(g)}{\text{alimento}_{ms}(g)}\right) \times 100$$

La bioconversión fue calculada como la ganancia en peso de la larva. Esto fue calculado como la biomasa de larva obtenida en materia seca en contraste con el alimento en materia seca total asignado (Surendra *et al.*, 2020)

$$\text{Bioconversión (\%MS)} = \frac{\text{Larva}_{biomasa}(g)}{\text{Alimento}_{ms}(g)} \times 100$$

5.2.5.2 Evaluación morfológica del quinto instar

Las larvas fueron lavadas con un chorro de agua potable directamente desde la llave para remover el alimento que pudiera haber quedado adherido a su cuerpo, se midió el peso, largo y ancho de cada larva por cada réplica. Para asegurar que se estaba midiendo el largo efectivo de las larvas, éstas fueron sacrificadas sumergiéndolas por dos segundos en agua a temperatura de $95 \pm 5^\circ\text{C}$. Después, fueron secadas con toalla de papel y se remuestreo el largo y el ancho de cada individuo.

Las larvas fueron conservadas en alcohol al 70% para su posterior evaluación morfológica. Para esto último se utilizó una lupa estereoscópica marca Leica EZ 4W con cámara integrada CMOS 5.0 x Megapíxeles y se ejecutó el software Las EZ versión 3.4.0 2016 de Leica Microsystems (Switzerland) Limited. Se usó como referencia las descripciones realizadas por Bruno *et al.* (2020).

5.2.5.3 Evaluación morfológica de la pupa

Se muestrearon, utilizando un aumento de 8x con la lupa estereoscópica ya indicada, 30 pupas, de cada réplica, para evaluar el peso, largo y ancho. Se realizó una revisión visual general contrastándolo según las descripciones realizadas por Barros *et al.* (2019).

5.2.5.4 Evaluación de eclosión de pupas

La tasa de eclosión fue calculada con la siguiente fórmula:

$$Tasa\ eclosión\ pupa = \frac{Número\ adultos\ emergidos}{Número\ pupas} \times 100$$

5.2.5.5 Evaluación morfológica del adulto

Se realizó una inspección de los individuos a través de una lupa estereoscópica marca Leica EZ 4W con cámara integrada CMOS 5.0 x Megapíxeles y se ejecutó el software Las EZ versión 3.4.0 2016 de Leica Microsystems (Switzerland) Limited.

5.2.5.6 Extracción genitalia del macho

Los machos utilizados para la extracción de la genitalia, fueron individuos que se muestrearon una vez finalizado el periodo de apareamiento en jaula. Se disectó el quinto o sexto segmento del abdomen (dependiendo de la muestra). Se limpió la estructura sumergiéndola en KOH al 10% y se calentó a 60°C por 50 minutos para observar las estructuras de la genitalia. Las estructuras fueron comparadas con las descripciones realizadas por Fachin & Hauser (2022).

Para calcular el radio de Hembra – Macho se usó la siguiente fórmula:

$$Razón\ hembra - Macho = \frac{Número\ adultos\ hembra}{Número\ adultos\ macho}$$

5.2.5.7 Evaluación de fecundidad de la hembra

Para realizar la evaluación de la fertilidad de la hembra, se estimó el total de hembras en cada una de las réplicas de los tratamientos y luego se contrastó con la masa total de huevos obtenidos.

$$\text{Fecundidad de la hembra} = \frac{\text{Total huevos (mg)}}{\text{Número total hembras}}$$

5.2.5.8 Evaluación de la eficiencia de eclosión del huevo.

Para el cálculo de la eclosión de los huevos, se realizó un muestreo del total de larvas resultantes de la crianza. Las larvas más el sustrato fueron colocadas en un recipiente plástico de 40 cm de diámetro con una profundidad de 18 cm para su homogeneización. Luego se tomó una muestra de $5 \pm 0,5$ g y se registró el número y peso de larvas y el sustrato. Luego esta información se dividió con el número de huevos obtenidos.

El número de huevos se obtuvo al considerar el peso 0,02557 mg por huevo (Bertinetti *et al.*, 2019). Así, se tuvo el número de huevos totales. No se hizo distinción entre huevos fértiles e infértiles.

$$\text{Eficiencia de la eclosión de huevos} = \frac{\text{Número de Larvas}}{\text{Número de huevos}}$$

5.2.5.9 Evaluación de Lufenuron

Basado en la concentración de insecticida de dos matrices (larva y sustrato) fue calculado el balance de masa y la bioacumulación.

El factor de bioacumulación (BAF) fue calculado en materia seca (MS) y se obtuvo de la división de la concentración de insecticida en la larva por la concentración del insecticida en el alimento asignado. Valores de BAF >1 indican acumulación en el organismo (van der Fels-Klerx *et al.*, 2016).

$$BAF = \frac{\text{Concentración lufenuron larva (MS)}}{\text{Concentración lufenuron alimento (MS)}}$$

5.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de homocedasticidad mediante el test de Levene, luego se realizó el análisis de varianza (ANOVA), el cual fue ejecutado con un 95% de confianza. Cuando fueron detectadas diferencias significativas, se empleó el test post-hoc de Tukey con un 95% de confianza.

Si no se cumplía la igualdad de la varianza, se ejecutó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar diferencias estadísticamente significativas.

Todos los test estadísticos fueron realizados con el programa R Core Team (2022).

6 CAPÍTULO 3: RESULTADOS

6.1 Desarrollo de la etapa larval

El peso de las larvas evaluadas en el quinto instar se vio disminuido significativamente con respecto al control cuando se alimentó con los tratamientos TR3, TR4, TR5 Y TR6. No hubo diferencias significativas entre el control y el TR2 (0,069 mg/kg de lufenuron). El tiempo de desarrollo para la detección de la primera pre pupa fue mayor sólo en el tratamiento con mayor concentración (TR6) y hubo una diferencia de 3,7 días con respecto al control que fue al décimo día. La sobrevivencia de las larvas en el quinto instar se afectó con la presencia del insecticida lufenuron, independiente de la concentración a la cual fueron expuestos los individuos (ver Gráfico 1 y Tabla 2).

Gráfico 1: BoxPlot del desempeño de la larva, peso de la larva del quinto instar, tiempo de desarrollo y sobrevivencia de las larvas de *Hermetia illucens* alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron.

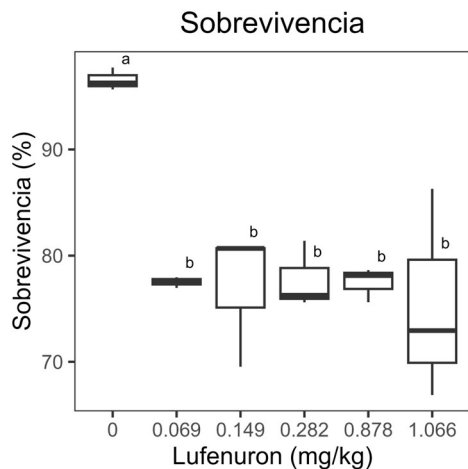
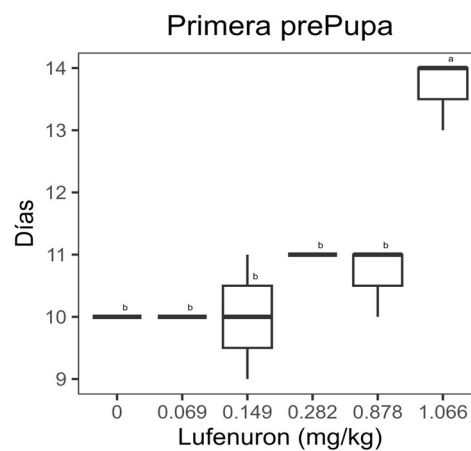
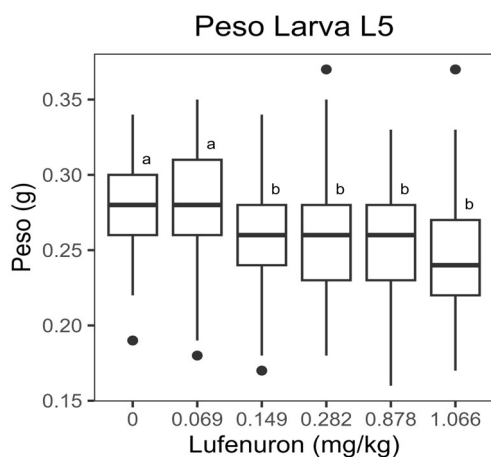
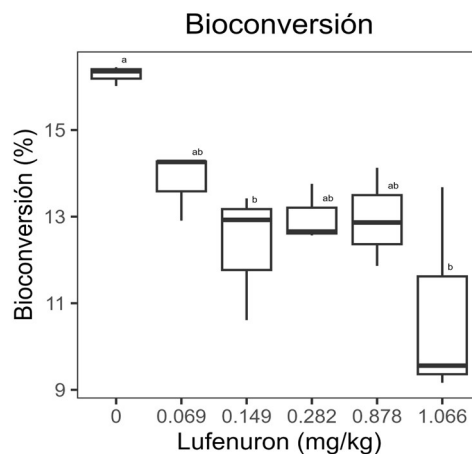
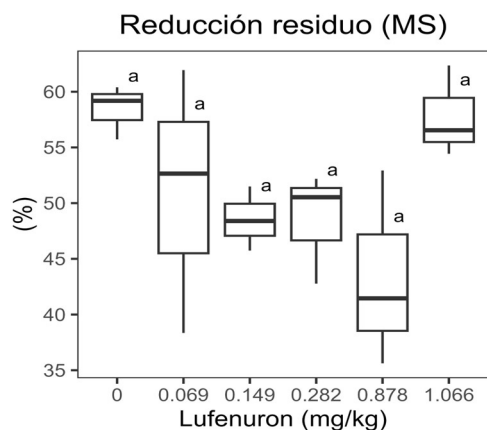


Tabla 2: Peso de la larva del quinto instar, tiempo de desarrollo y sobrevivencia de las larvas de *Hermetia illucens* alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de ANOVA seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $p < 0,05$) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; $n=3$

Lufenuron [mg/kg]	Desempeño de la etapa larval					Desarrollo de la larva				
	Reducción de residuos (MS)		Bioconversión (MS)			Peso larvas L5		Primer larva 6to instar		Sobrevivencia
	(%)		(%)			(g)		Días		(%)
Control	58,44	\pm 2,42 a	16,28	\pm 0,23 a	0,28	\pm 0,03 a	10,00	\pm 0,00 b	96,55	\pm 1,06 a
T2= 0,069	50,98	\pm 11,89 a	13,82	\pm 0,79 ab	0,28	\pm 0,04 a	10,00	\pm 0,00 b	77,51	\pm 0,51 b
T3=0,149	48,50	\pm 5,02 a	12,99	\pm 0,66 ab	0,26	\pm 0,04 b	11,00	\pm 0,00 b	77,76	\pm 3,17 b
T4=0,282	48,55	\pm 2,88 a	12,32	\pm 1,50 b	0,26	\pm 0,04 b	10,00	\pm 1,00 b	76,97	\pm 6,44 b
T5=0,878	43,34	\pm 8,81 a	12,95	\pm 1,14 ab	0,26	\pm 0,04 b	10,67	\pm 0,58 b	77,46	\pm 1,62 b
T6=1,066	57,78	\pm 4,11 a	10,80	\pm 2,50 b	0,25	\pm 0,04 b	13,67	\pm 0,58 a	75,37	\pm 9,93 b

Sobre el desempeño de la etapa larval, la máxima reducción de residuo se logró en el tratamiento control con un 58% de reducción de residuos (MS) sin embargo, no se detectaron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos.

La máxima bioconversión se obtuvo en el tratamiento control obteniéndose un 16%. Sin embargo, no hubo diferencias significativas con los tratamientos con concentración TR2=0,069, TR3=0,149 y TR5=0,878 lufenuron (mg/kg). Mientras que solo se registró diferencias significativas con respecto al tratamiento TR4= 0,282 y TR6= 1,066. (Tabla 2).

6.2 Evaluación de la etapa pre imaginal

Sobre el desarrollo de la etapa pre imaginal se obtuvo que las larvas tratadas con la mayor concentración del insecticida (1,066 mg/kg lufenuron), el peso fue afectado significativamente ($0,1 \pm 0,04$ g), al igual que el largo de la pupa ($1,8 \pm 0,26$ cm). Esto también se observó en el tratamiento TR4 = 0,282 (mg/kg lufenuron) que registró diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al resto de los tratamientos, el peso de la pupa fue de $0,2 \pm 0,03$ g y el largo fue de $2 \pm 0,23$ cm. El peso de la pupa fue significativamente mayor que el tratamiento TR6= 1,066 (mg/kg lufenuron) (ver Tabla 3).

Al evaluar el número de pupas que emergieron, se detectó una fuerte incidencia del insecticida en el porcentaje de eclosión de las pupas. Solo un 43,6% emergió del total de pupas en el tratamiento TR6= 1,066 (mg/kg lufenuron) (ver Tabla 3).

6.3 Evaluación de la etapa imaginal

Se observó en todos los tratamientos que el peso y el tamaño de las hembras fue mayor al de los machos. El tratamiento que recibió la dosis mínima (TR2= 0,069 mg/kg lufenuron) tuvo un mejor desempeño que el resto de los tratamientos e igual o mejor que el control. El macho de este tratamiento, registró un peso y tamaño significativamente ($p < 0,05$) mayor que el resto de los tratamientos (0,11 g y 1,82 cm respectivamente). Las hembras que recibieron el tratamiento con dosis mínima (TR2= 0,069 mg/kg lufenuron), registraron un tamaño del imago significativamente mayor al resto de los tratamientos, mientras que el peso no registró diferencias significativas con respecto al control.

El tratamiento que recibió la dosis máxima (TR2= 1,066 mg/kg lufenuron) registró que los machos tuvieron el peor desempeño de este experimento (0,06 g y 0,1 cm). Mientras que las hembras de este tratamiento, solo tuvo diferencias significativas en el tamaño con el control y TR2. El peso de las hembras DEL TR6 fue el más bajo del experimento junto con las hembras del TR5=0,878 mg/kg lufenuron (Ver Tabla 4).

Sobre la razón de hembras sobre machos se obtuvo que en todos los tratamientos, con excepción al TR6, hubo una mayor cantidad de hembras que machos. Solo se detectó diferencias significativas en esta relación cuando los adultos fueron alimentados en su etapa larval con el tratamiento TR6 (1,066 mg/kg lufenuron), lo que sugiere que los machos sobreviven más que las hembras a altas dosis de lufenuron (ver Tabla 4).

Tabla 3: Peso, tamaño y tasa de eclosión de la pupa de *Hermetia illucens* alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de ANOVA seguido por Test post hoc de Tukey HSD; P<0,05) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; n=3

Lufenuron [mg/kg]	Desarrollo de la pupa				Tasa de eclosión	
	Peso pupas (g)		largo pupas (cm)		Eclosión pupas (%)	
Control	0,20 \pm	0,02 a	2,10 \pm	0,16 a	98,20 \pm	0,43 a
TR2=0,069	0,20 \pm	0,05 a	2,10 \pm	0,24 a	94,80 \pm	2,67 a
TR3=0,149	0,20 \pm	0,03 a	2,10 \pm	0,18 a	92,80 \pm	5,02 ab
TR4=0,282	0,20 \pm	0,03 b	2,00 \pm	0,23 b	97,10 \pm	0,63 a
TR5=0,878	0,20 \pm	0,03 a	2,10 \pm	0,19 a	83,70 \pm	4,61 b
TR6=1,066	0,10 \pm	0,04 c	1,80 \pm	0,26 c	43,60 \pm	4,50 c

Tabla 4: Peso, tamaño y radio hembra/macho del adulto de *Hermetia illucens*. Alimentadas en estado larval con los Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de Kruskal Wallis seguido por Test post hoc de Tukey HSD; P<0,05) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; n=3

Lufenuron [mg/kg]	Peso del adulto		Tamaño del adulto		Razón
	Macho (g)	Hembra (g)	Macho (cm)	Hembra (cm)	Hembra/machos
Control	0,09 \pm 0,02 b	0,13 \pm 0,02 a	1,69 \pm 0,12 b	1,79 \pm 0,08 b	1,32 \pm 0,18 a
TR2=0,069	0,11 \pm 0,02 a	0,13 \pm 0,02 a	1,82 \pm 0,12 a	1,87 \pm 0,13 a	1,26 \pm 0,21 a
TR3=0,149	0,08 \pm 0,02 c	0,10 \pm 0,01 b	1,66 \pm 0,07 b	1,71 \pm 0,08 c	1,15 \pm 0,15 a
TR4=0,282	0,07 \pm 0,01 de	0,10 \pm 0,01 b	1,58 \pm 0,07 c	1,71 \pm 0,07 c	1,16 \pm 0,49 a
TR5=0,878	0,08 \pm 0,01 c	0,10 \pm 0,02 bc	1,66 \pm 0,08 b	1,68 \pm 0,10 c	0,75 \pm 0,22 a
TR6=1,066	0,06 \pm 0,01 e	0,09 \pm 0,02 c	1,58 \pm 0,08 c	1,69 \pm 0,10 c	0,57 \pm 0,10 b

6.4 Factor de bioacumulación (BAF)

El resultado de la concentración de lufenuron (mg/kg) obtenidos en las larvas y en el sustrato se detalla en la tabla 5.

Se obtuvo que el factor de bioacumulación fue menor a 1 (BAF<1) indicando que, para este ensayo, el insecticida lufenuron no se acumula en las larvas de *H. illucens*. Mientras que la evaluación del BAF para el sustrato es menor a 1 en todos los tratamientos, con excepción al tratamiento de dosis máxima. El cual obtuvo un valor igual a 1.

Tabla 5 Factor de bioacumulación (BAF) en larvas y sustrato de *Hermetia illucens*. En la etapa de crianza las larvas fueron alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de ANOVA seguido por Test post hoc de Tukey HSD; P<0,05) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; n=3.

Lufenuron [mg/kg]	BAF		BAF	
	Larva		Sustrato	
Control	0,00 \pm	0,00 a	0,00 \pm	0,00 a
TR2=0,069	0,26 \pm	0,01 b	0,83 \pm	0,21 c
TR3=0,149	0,22 \pm	0,01 b	0,44 \pm	0,15 b
TR4=0,282	0,28 \pm	0,02 b	0,67 \pm	0,06 bc
TR5=0,878	0,32 \pm	0,02 b	0,79 \pm	0,11 bc
TR6=1,066	0,44 \pm	0,06 c	0,97 \pm	0,14 c

Sobre la fecundidad de la hembra, se encontró que todos los tratamientos difieren del control y sobre los huevos que lograron ser criados se encontró que no hay diferencias en el porcentaje de eclosión de las larvas cuando los padres fueron expuestos al insecticida lufenuron.

Tabla 6 Fecundidad de la hembra y porcentaje de eclosión de los huevos de *Hermetia illucens*. En la etapa de crianza las larvas fueron alimentadas con los tratamientos Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6=1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de Anova seguido por Test post hoc de Tukey HSD; P<0,05). Datos informados como promedio \pm desviación estándar; n=3.

Lufenuron [mg/kg]	Fecundidad hembra huevos/hembra		Eclosión de huevos	
	(mg)		(%)	
Control	4,31 \pm	0,27 a	71,00 \pm	3,61 a
TR2=0,069	3,00 \pm	0,25 b	60,00 \pm	4,00 b
TR3=0,149	2,44 \pm	0,09 bc	58,67 \pm	4,04 b
TR4=0,282	1,91 \pm	0,24 c	50,33 \pm	4,51 b
TR5=0,878	1,56 \pm	0,23 d	56,33 \pm	3,06 b
TR6=1,066	-	-	-	-

- no hubo la cantidad suficiente de adultos para lograr la reproducción.

6.5 Daños morfológicos

Se observaron daños morfológicos en todos los estados evaluados.

En el estadio L5 se observó daños en la cápsula cefálica, principalmente en el aparato bucal, tórax y abdomen. En el aparato bucal se observó en todos los tratamientos con excepción del control, daños en la gula del tipo protuberancia ovalada y alargada de color blanco (Fig. 5D)

También se detectó una necrosis en el aparato bucal que afectó al aparato mandibular maxilar, lóbulo ventral membranoso, prementón, epifaringe e hipofaringe. Estos daños sólo se detectaron en los tratamientos TR5= 0,878 y TR6= 1,066 (mg/kg). No se observó ningún tipo de daño en la sección dorsal de la cabeza de las larvas L5.

En cuanto a los tagmas torácicos y abdominal, se observó una malformación del metatórax y en el primer segmento abdominal (Figs. 6E y 6F) existe una discontinuidad del segmento meta torácico que se fusionó con el primer segmento abdominal. Este tipo de atrofia se observó solo en el tratamiento TR6= 1,066 (mg/kg).

En todos los tratamientos, se observaron manchas abdominales que afectaron todos los segmentos de forma ventral y dorsal. Se concentraron en el centro del segmento en la base de las espinas (Figs. 6A, 6B y 6C).

En el octavo segmento abdominal de forma ventral, se observó una cicatriz concéntrica de un área aproximada de $0,21\text{mm}^2$ con bordes gruesos y con relieve (Fig. 6 D).

En la evaluación morfológica realizada en las pupas, se detectaron heridas con secreción de líquido en el tórax y abdomen en la sección dorsal (Figs. 7B y 7F). Esto se observó solo en los tratamientos TR4= 0,149 y TR5= 0,878 (mg/kg) lufenuron. Una herida de mayor tamaño y con una mayor secreción de líquido, se observó en el octavo segmento abdominal en la sección ventral – pleural (Fig. 7E). Detectando este tipo de daño en todos los tratamientos exceptuando el Control y el tratamiento 2=0,282 (mg/kg) lufenuron.

También se registró una lesión dorsal en el exoesqueleto con pérdida de líquido justo en la sección donde ocurre la apertura del exoesqueleto para la emergencia del adulto (Fig. 7A). Se registró en los tratamientos TR3= 0,149, TR4= 0,282 y TR6= 1,066 (mg/kg) lufenuron.

Solo en el tratamiento TR6= 1,066 (mg/kg) se observó en el octavo segmento abdominal de forma dorsal, una cicatriz concéntrica con bordes gruesos y con relieve. Con un área de $0,203\text{mm}^2$ aproximadamente, de color amarillo muy contrastante al color de la pupa.

Por último, se observaron individuos muertos con ecdisis incompleta en los tratamientos TR3= 0,149, TR4= 0,282 y TR6= 1,066 (mg/kg) lufenuron (Fig. 7 C).

En el adulto se detectó con mayor frecuencia la deformación del tipo encarrujamiento de las alas en todos los tratamientos, con excepción al tratamiento control y al tratamiento TR2= 0,069 mg/kg (Fig. 8A). Se observó que los machos tuvieron una menor o igual incidencia de este defecto que las hembras.

Se observó que las hembras obtenidas de la alimentación del TR6 presentaron un abdomen notoriamente distendido (Fig. 8F), como también, se observó mortalidad asociada a la emergencia fallida del imago de la exuvia (Fig. 8E), en especial se observó que las alas aún no desplegadas,

quedaron adheridas a la exuvia. Mientras que, en el macho de este tratamiento, se observó un ejemplar con una malformación en uno de sus flagelos. De forma de apéndice elongado y adherido del mismo punto que el resto de los flagelómeros (Fig. 8B).

En cuanto a la genitalia de la hembra, se observó el mismo tipo de daño. El cual consistió en una herida liberación de líquido en la pleura del noveno tergito abdominal. Este daño solo se observó en los tratamientos TR4, TR5 Y TR6.

La genitalia del macho presentó en el TR6 una herida con liberación de líquido proveniente de la zona pleural del noveno tergito abdominal. También, se observaron daños en el cerco. Detectándose ausencia ambos cercos (Fig. 9C y 9D) o la asimetría en uno de ellos (Fig. 9E).

Se realizó una agrupación de todos los daños observados en el muestreo en la larva, pupa y adulto y con ello se realizó un análisis estadístico (tabla 7) el detalle de la estructura dañada en el estado del individuo se encuentra en el Anexo 3.

Tabla 7: Daño morfológico evaluados en estado de L5, pupa y adulto de *Hermetia illucens*, la cual fue alimentada con los siguientes tratamientos en la etapa de crianza Control =0 mg/kg, T2= 0,069 mg/kg, T3=0,149 mg/kg, T4=0,282 mg/kg, T5=0,87 mg/kg, T6= 1,066 mg/kg de lufenuron. Letras distintas indican diferencias significativas (Se realizó el Test de Anova seguido por Test post hoc de Tukey HSD; $P < 0,05$) Datos informados como promedio \pm desviación estándar; n=3.

Lufenuron [mg/kg]	L5 daño (%)		Pupas daño (%)		Adultos daño (%)
Control	0,0%	a	0,0%	a	0,0%
TR2=0,069	8,7%	a	0,0%	a	2,7%
TR3=0,149	3,3%	a	6,7%	ab	3,3%
TR4=0,282	6,7%	a	3,3%	a	6,0%
TR5=0,878	16,7%	bc	12,3%	b	3,0%
TR6=1,066	32,0%	c	35,7%	c	24,3%

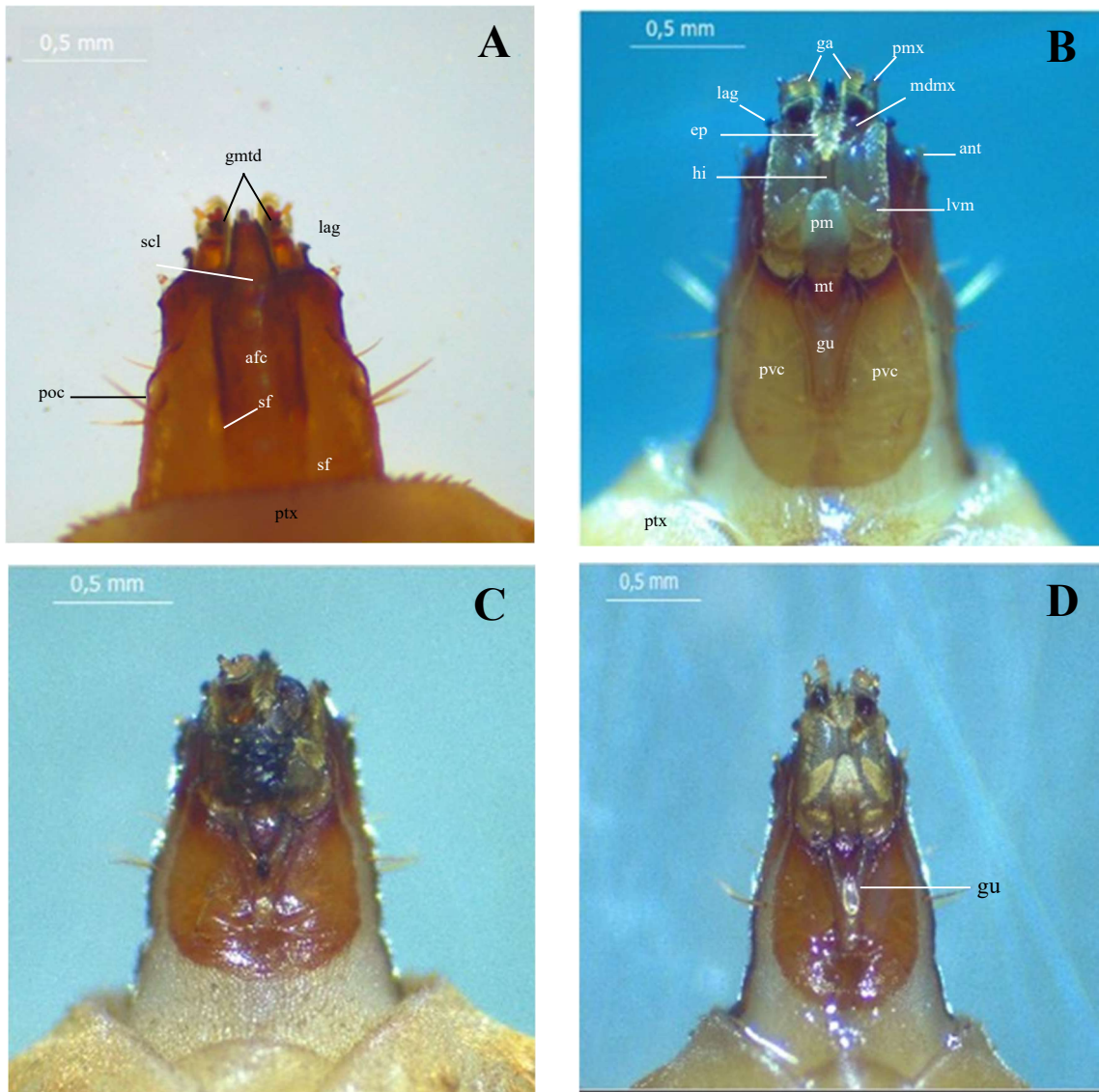


Figura 5.

Cabeza de la larva del quinto instar de *Hermetia illucens*. **A:** vista dorsal de la cabeza y borde del protórax. **B:** Vista ventral de la cabeza y borde del protórax. **C:** Vista ventral de la cabeza con daños en aparato bucal. **D:** Vista ventral de la cabeza con daño en la gula. Abreviaciones: afe- apotoma frontoclipeal, ant- antena, ecl- esclerito clipeolabral, ep- epifaringe, ga- galea, gmtd- gancho mandibular tridentado, hi- hipofaringe, L-Labro, lag- lóbulo anterior de la gena, lvm- lóbulo ventral membranoso, mdmx- aparato mandibular maxilar, pmt- palpo maxilar, poc- protuberancia ocular, ptx- protórax, scl- sutura cíleo labral, sf- sutura frontal.

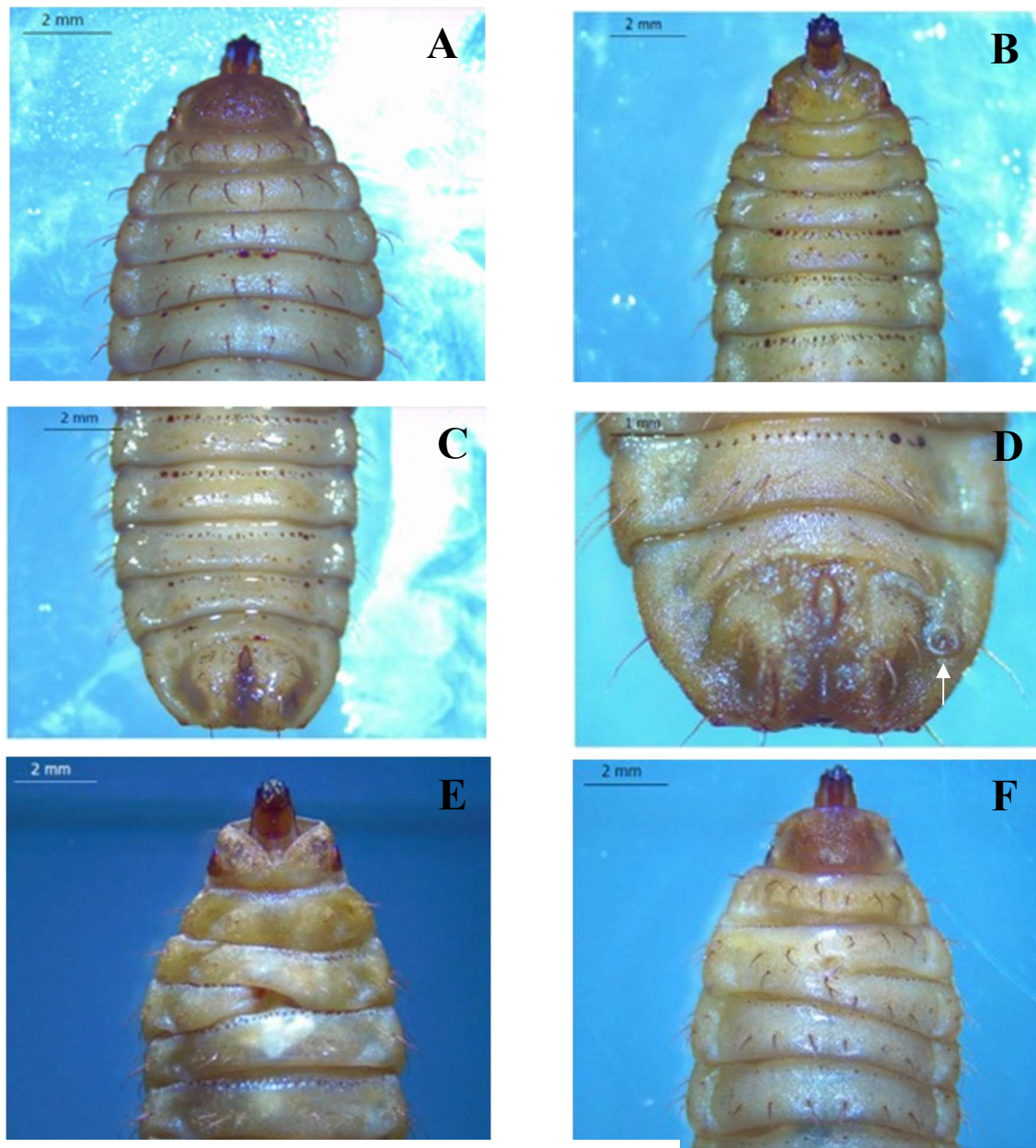


Figura 6.

Larva del quinto instar de *Hermetia illucens*. **A:** Vista dorsal del tórax y segmento abdominal (1° al 4to) con manchas circulares en la base de las espinas. **B:** Vista ventral del tórax y segmento abdominal (1° al 4to) con manchas circulares en la base de las espinas. Con daño con Lufenuron: **C:** Vista ventral de los segmentos abdominales 4to al 8vo con manchas circulares en la base de las espinas. **D:** Vista ventral de herida en el octavo segmento abdominal, forma circular con relieves. **E:** Vista ventral de la malformación en el primer segmento abdominal. **F:** Vista dorsal de malformación en el primer segmento abdominal.

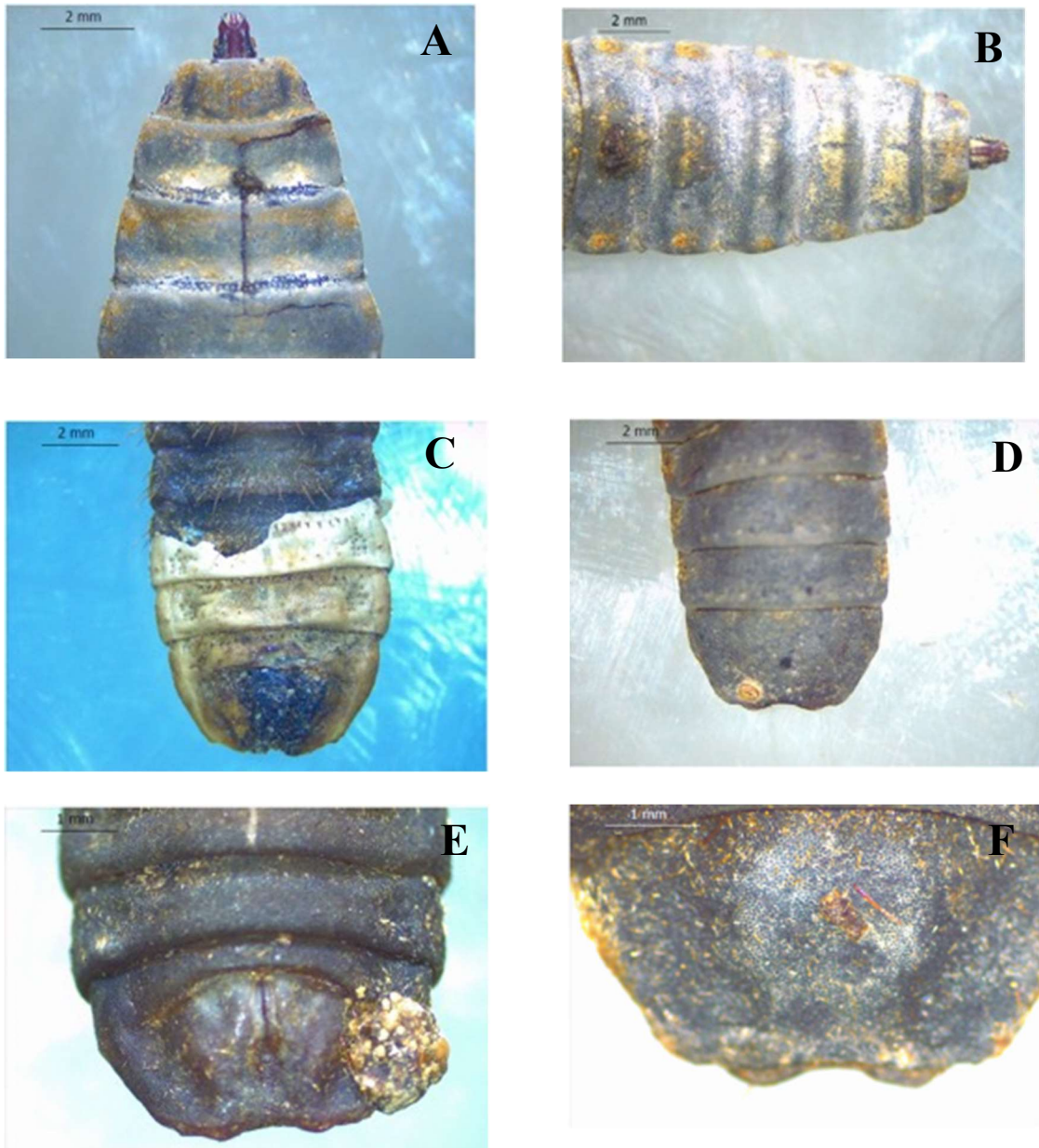


Figura 7.

Daños en pupa de *Hermetia illucens* con *lufenuron*. **A:** Vista dorsal del tórax con herida abierta en la cutícula. **B:** Vista dorsal del tercer segmento abdominal con herida con hemolinfa. **C:** Vista ventral de pupa con ecdisis fallida. **D:** Vista dorsal del octavo segmento abdominal con herida con forma circular y con relieves. **E:** Vista ventral del octavo segmento abdominal con herida con hemolinfa. **F:** Vista dorsal del octavo segmento abdominal hemolinfa con herida con hemolinfa.



Figura 8.

Daños en adulto de *Hermetia illucens* con *lufenuron*. **A:** Vista dorsal, alas malformadas. **B:** Malformación de la antena izquierda del macho. **C:** Vista ventral de la genitalia dañada de la hembra. **D:** Vista lateral de la genitalia dañada del macho. **E:** Emergencia fallida del imago. **F:** Vista lateral del abdomen distendido de la hembra.

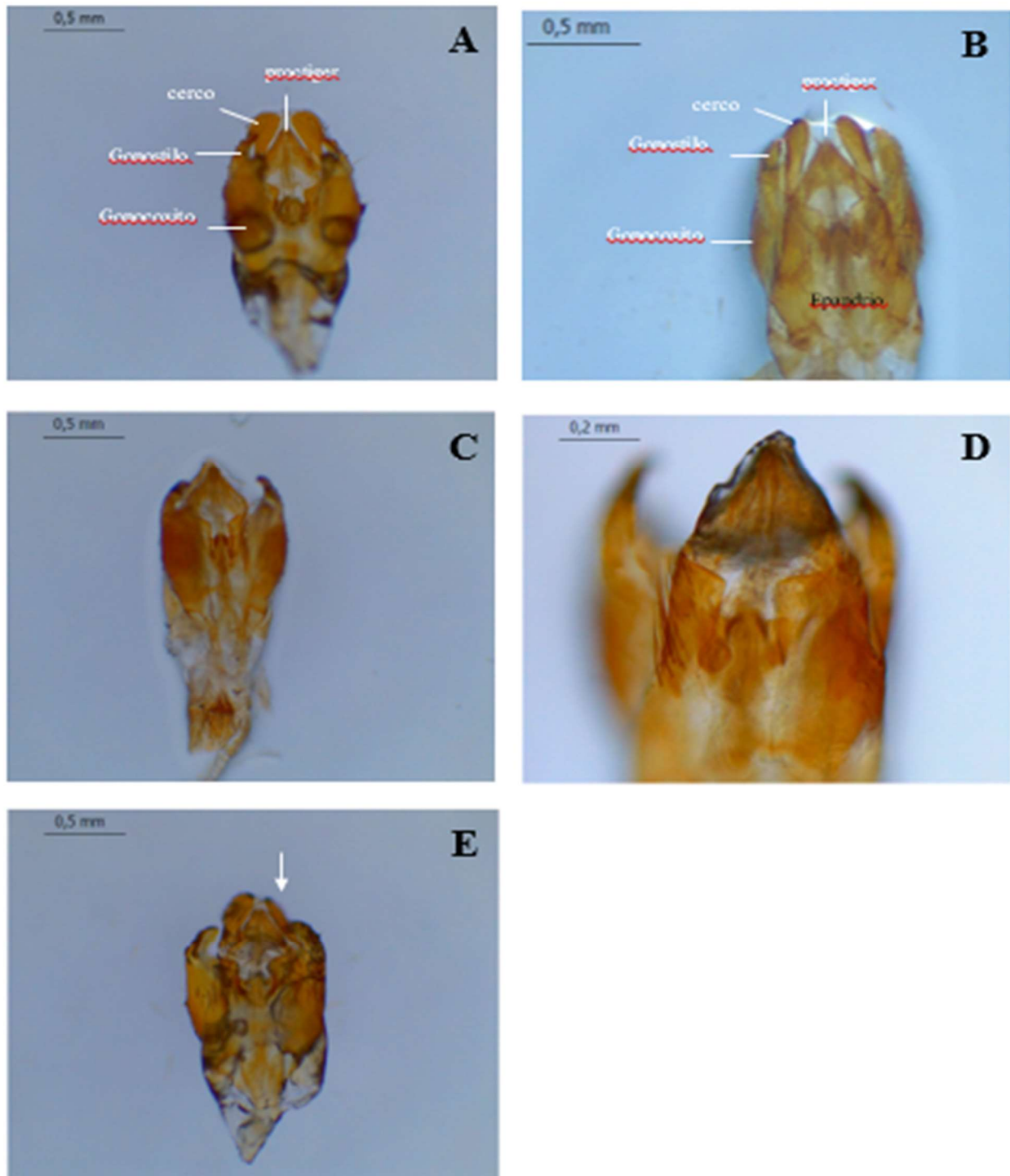


Figura 9

Genitalia del macho de *Hermetia illucens*. **A:** Vista ventral de la genitalia del macho. **B:** Vista dorsal de la genitalia del macho. **Con daño con Lufenuron:** **C:** Vista ventral de la genitalia del macho, ausencia de cercos. **D:** Vista dorsal de la genitalia del macho, ausencia de cerco. **E:** Vista ventral de la genitalia del macho, asimetría entre los cercos.

7 CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN

El impacto de los insecticidas inhibidores de la síntesis de quitina tiene un efecto perjudicial en el proceso de muda o bien al generar una formación cuticular deficiente. Estos compuestos, son considerados como efectivos supresores del desarrollo del ciclo de vida de los insectos (Hammock & Quistad, 1981; Mommaerts *et al.*, 2006). El presente estudio determinó el potencial efecto del insecticida lufenuron, perteneciente al grupo de inhibidores de síntesis de quitina, benzoilfenil ureas, el cual fue probado en 5 concentraciones (0,069; 0,149; 0,282; 0,878 y 1,066 mg/kg lufenuron) más el control (libre de lufenuron) sobre la alimentación de las larvas de *Hermetia Illucens* de 7 días de edad.

Los resultados presentados muestran que la mortalidad de las larvas en estado 5 (L5) expuestas a concentraciones crecientes de lufenuron, fueron significativamente mayor respecto al control, pero no incrementó la mortalidad con la concentración de lufenuron empleada (ver Tabla 2). En el estado de pupa, concentraciones de lufenuron mayores o iguales a 0,878 mg/kg (tratamiento 5 y 6) presentaron un aumento significativo en el porcentaje de pupas no emergidas (Ver Tabla 3). Estos resultados son coherentes con lo observado en larvas de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Larvas recién emergidas (0-4 horas) fueron alimentadas con altas dosis 0.3–0.5 ppm de lufenuron, mostraron un efecto negativo en la sobrevivencia de las larvas, pupas e incluso el vuelo de los adultos con la subsecuente disminución del número de huevos colectados (Wilson & Cryan 1997).

Los datos obtenidos en este ensayo indican que las concentraciones altas de lufenuron (1,066 mg/kg lufenuron), afectan significativamente el peso en los estados de larva, pupa y ambos sexos en el adulto (Ver Tabla 2, 3 y 4). En este sentido, los resultados fueron coherentes con Tanani *et al.* (2022), ya que se encontró que el peso del segundo instar de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) presentó una disminución significativa en el peso con respecto al control. Estos autores discuten que los inhibidores de la síntesis de quitina como lufenuron, flufenoxuron y hexaflumuron (todos ellos pertenecientes al grupo de BPU), perturban la acumulación de carbohidratos totales, proteínas, lípidos y colesterol en el penúltimo estadio larval de *M. domestica* (Tanani *et al.*, 2022). Esta

perturbación en la acumulación de nutrientes en el cuerpo de las larvas pudiera explicar la disminución del peso en las larvas, pupas y adultos resultantes de este bioensayo. En este estudio, la concentración que generó diferencias significativas en los tres estados fue el tratamiento 6. Otras investigaciones como las de Shen *et al.* (2018) y Wang *et al.* (2018), observaron que la cantidad de carbohidratos en los insectos cambia de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentren, pero hay acuerdo en que los inhibidores de la síntesis de quitina afectan la acumulación de los carbohidratos en el organismo.

En relación al peso de las larvas y el tiempo de desarrollo, Khorshidi *et al.* (2019) investigaron en *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) los efectos de la exposición a insecticidas del grupo BPU, afectan el peso de las larvas con respecto al control. De igual manera encontraron que la duración de la etapa larval se extiende entre 2 a 5 días más con respecto al control. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en este ensayo. El tratamiento con mayor concentración (TR 6), aumentó significativamente el tiempo de desarrollo en 3,7 días respecto al control (Ver Tabla 2). Sin embargo, se observó que, el tratamiento 2 (0,069 mg/kg lufenuron), no registró diferencias significativas en el peso ni en el tamaño de las larvas, tampoco en el peso de las pupas con respecto al control (Ver Tabla 2 y 3). No se observaron diferencias significativas con respecto al control en la reducción de residuos ni en la bioconversión (Ver Tabla 2). Además, se encontró que el peso y el tamaño del adulto macho obtenidos del tratamiento 2, fue significativamente mayor que al control y a los otros tratamientos (Ver Tabla 4). El positivo efecto de lufenuron a concentraciones bajas, como las del tratamiento 2, puede ser atribuido a que en algunos casos se ha observado que los insecticidas a bajas concentraciones inducen una respuesta llamada hormesis (Calabrese & Baldwin, 2001; Guedes & Cutler, 2014; Li *et al.*, 2023). La hormesis se describe como respuesta bifásica de acuerdo a la dosis de un agente estresor a la que se está sometiendo al organismo. Dosis bajas de un estresor, como por ejemplo un insecticida, puede provocar un efecto de estimulación, mientras que dosis mayores son tóxicas (Guedes & Cutler, 2014).

Dosis subletales de insecticidas han sido probadas en diferentes grupos de insectos (Cutler, 2013; Li *et al.*, 2023). Pueden provocar una estimulación en cualquier etapa del ciclo de vida en la que se exponga el agente estresor y puede ocurrir con cualquier tipo de ingrediente activo (Cohen,

2006; Cutler, 2013), encontrándose que respuestas horméticas no generan una consecuencia en la adecuación biológica del insecto por lo que tampoco se verían afectadas las siguientes generaciones (Haddi *et al.*, 2016; Qu *et al.*, 2015). En este ensayo se observó que el tratamiento que presentó hormesis (TR2), si afectó la reproducción y la tasa de eclosión de la progenie (Tabla 6). Por lo que, al igual que lo propuesto por Cutler & Guedes (2017), este fenómeno debe seguir siendo investigado.

Por otro lado, se ha documentado que la exposición a concentraciones subletales de insecticida, provocan una reducción en la longevidad y fecundidad de adultos y además, afectan la viabilidad de los huevos producidos, lo cual tiene un efecto transgeneracional para la especie (Vianna *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2014).

7.1 Daños morfológicos

Los daños morfológicos encontrados en las larvas L5 y en el estado de pupa fueron significativamente mayor con respecto al control cuando se les asignó una dieta mayor o igual a 0,878 mg/kg de lufenuron. Mientras que, en el estado adulto de la especie, solo se encontraron diferencias significativas cuando se alimentó con una dieta a una concentración igual a 1,066 mg/kg de lufenuron.

Fonseca *et al.* (2015) probó en *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae), una dosis subletal de 4,04 mg lufenuron/L aplicado en la dieta de larvas de 10 días, observándose que está concentración, la más baja probada en este ensayo, provocó dificultad para moverse de los individuos y además, diversas deformaciones morfológicas en las larvas tales como: muda incompleta, retención de exuvia y burbujas de aire o líquido en la zona cefálica. Lo descrito tiene semejanza con las deformaciones encontradas en este ensayo en las larvas de *H. illucens* (Fig. 5).

En la especie *Ephestia figulilella* (Lepidoptera: Pyralidae), el modo de aplicación de lufenuron fue distinto al descrito por Fonseca *et al.* (2015) . Se roció el insecticida Match™ % 50 EC de Syngenta Crop Protection, en concentraciones de 500, 750, 1.000, 1.250 y 1.500 mg/l de lufenuron en el último estadio larval de la especie. Se reportó que además de detectar mortalidad de individuos, se

encontró malformación en estos. Las larvas tratadas presentaban una coloración oscura en la parte distal del abdomen y además, éstas no eran capaces de alimentarse por lo que terminaban muriendo. También se registró malformación en las pupas y adultos deformación coloración oscura (Khajepour *et al.*, 2012).

En este bioensayo se usaron concentraciones muy por debajo a las descritas por Fonseca *et al.* (2015) y Khajepour *et al.* (2012). No obstante, los daños descritos son similares a lo observado en los estados de larvas y pupas.

Los daños morfológicos observados en los adultos (Fig. 8 y 9), se podría asociar al hecho que los insectos holometábolos poseen discos imaginales indiferenciados invaginados hasta que ocurre la muda de preimaginal a imaginal. Es en ese momento que ocurre la evaginación y se desarrollan patas, alas y otras estructuras del adulto. Cualquier desbalance en la homeostasis hormonal puede generar una interrupción o crecimiento anormal de las etapas de crecimiento (Dhadialla *et al.*, 1998; Nation, 2022). Sierras & Schal (2020) realizaron estudios con insecticidas reguladores del crecimiento que interfieren en la formación de quitina, como por ejemplo los del tipo análogos de la hormona juvenil *Cimex lectularius* y *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae) (chinches de cama). Los resultados muestran una melanización de la cutícula de los individuos tratados con este tipo de insecticidas. Mientras que en estudios de Bennett & Reid (1995 como se citó en Sierras & Schal, 2020) desarrollados en *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae), el insecticida hydroprene, perteneciente al grupo químico análogos de la hormona juvenil, causa melanización y deformaciones en apéndices externos, como genitalia, antenas y alas. En los tejidos internos se observó daños en ovarios y vesícula seminal.

Dhadialla *et al.* (1998) estudiaron los efectos de insecticidas no esteroideos antagonistas a la ecdisona, sobre la especie *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). Las larvas al ser sometidas al insecticida RH-5849, extruyen sus intestinos traseros sufriendo pérdida de hemolinfa y líquido de muda, provocando la desecación y finalmente la muerte de los individuos tratados. Similares efectos se han reportado con este tipo de insecticidas en larvas de lepidópteros (Wing *et al.*, 1988) y larvas de coleópteros (Monthean & Potter, 1992). Lo descrito, es comparable con lo observado en este

bioensayo. La muerte de adultos con detección de herida con liberación de líquido en la pleura del noveno tergito abdominal (Ver Fig 8: C y D).

Cabe mencionar que en la zona distal del abdomen se concentraron daños conspicuos como en la Figura 6: C y D; Figura 7: C, D y E; Fig 8: C y D.

Finalmente, los daños observados en este estudio relacionado a la genitalia (Fig. 8) puede explicar en cierta medida la disminución en la fecundidad de la hembra, pues daños en la genitalia de la hembra y alteraciones en la formación del cerco del macho fueron observados (Fig. 9). Sin embargo, es necesario investigar el daño que provocaría el lufenuron en los tejidos internos en el adulto, como por ejemplo en los ovarios o en los testículos. Es cierto que se observaron daños en la genitalia, pero de acuerdo a lo obtenido en la Tabla 7, sólo hubo diferencias significativas relacionadas con los daños morfológicos entre el control y el tratamiento 6 (1,066 mg/kg lufenuron).

7.2 Bioacumulación

Las concentraciones de lufenuron encontradas en las larvas fue menor a la concentración administrada en la dieta de las larvas de *H. illucens* (anexo 1). Lo que indica que la bioacumulación en las larvas no ocurrió (Tabla 5). Este resultado es concluyente a lo reportado por Meijer *et al.*, (2021) y por Purschke *et al.*, (2017). Larvas de *H. illucens* alimentadas con concentraciones bajo el LMR de los insecticidas: Clorpirifos, Propoxur, Cipermetrina, Imidacloprid, Spinosad y Tebufenozide; obtuvieron un factor de bioacumulación en las larvas menor a 1 y se propone que no hay riesgo de usarlas como producto. Sin embargo, ambos autores advierten sobre el uso de alimentos con estos insecticidas podría afectar el crecimiento y la sobrevivencia de las larvas.

En este estudio se obtuvo que la concentración encontrada en el sustrato (frass) fue mayor a la administrada en la dieta cuando se usó la concentración de 1,066 mg/kg lufenuron (Ver Anexo 2). Lo que podría indicar que las larvas estarían excretando el insecticida y que este queda en el sustrato. Es importante mencionar que el sustrato que genera las larvas de *H. illucens* es considerado fertilizante y es parte del modelo de negocio de economía circular (Fowles & Nansen, 2020). Se

deben realizar estudios sobre el uso de los sustratos generados por las larvas de *H. illucens*, cuando son alimentadas con trazas de insecticidas como el lufenuron. No se conoce si el ingrediente activo mantiene la efectividad del insecticida y, si este, podría dañar a la microfauna y/o artrópodos presentes en el suelo.

Acerca de la estrategia usada en el tratamiento 4, de administrar alimento con lufenuron durante el 60% del tiempo de crianza y luego administrar alimento sin lufenuron. No registró diferencias significativas al tratamiento 3 con respecto a: la reducción de residuo, bioconversión, peso de la larva L5, sobrevivencia, tasa de eclosión de la pupa, radio macho: hembra, BAF, fecundidad de la hembra y eclosión de los huevos (Tabla 2, 3, 4, 5 y 6). Lo que sugiere que una vez que las larvas ingieren el insecticida se genera el daño y que el individuo no es capaz de recuperarse en los siguientes estados ni en la siguiente generación.

El ensayo presentado es el primero en estudiar el daño provocado en la larva, pupa, adulto y progenie cuando el insecticida lufenuron es administrado en la dieta de las larvas de *Hermetia illucens*. Se realizó un análisis a los parámetros productivos necesarios para la crianza en cautiverio con fines económicos de la especie, además se realizó una evaluación entomológica de los daños morfológicos detectados y por último se realizó un balance cuantitativo de lufenuron a través de cromatografía líquida (UPLC) para así poder calcular la bioacumulación del insecticida en las larvas y en el sustrato.

Se han realizados otros estudios enfocados a la bioacumulación de insecticidas y a la inocuidad de los subproductos que pudiera generar las larvas de *Hermetia illucens* cuando consume algún tipo de insecticida en la dieta (E.g Hoek-van den Hil *et al.*, 2022; Li & Bischel, 2022; Meijer *et al.*, 2021; Purschke *et al.*, 2017). Pero ninguno de los estudios mencionados tuvo dentro de sus objetivos analizar los estados siguientes a la larva L5. Lo cual se puede deber a que comercialmente los criaderos de esta especie realizan la cosecha de la etapa de engorda de la larva en este estadio. Por lo que quizás, no es de interés comercial estudiar las siguientes etapas del ciclo de vida de la especie, pero sí es muy importante conocer los consecuentes daños que pudieran ocurrir en el ciclo de vida de la especie al estar en presencia de un insecticida como el lufenuron.

La información presentada indica que el lufenuron causa efectos en el desempeño de la larva como reductora de residuos y en la sobrevivencia de los individuos. Además, causa daños severos en el desempeño de los individuos cuando son destinados a reproductores ya que existen daños morfológicos que afectan a la reproducción y fertilidad de la hembra. Siendo detectado incluso daños transgeneracionales al evidenciarse daños en la eclosión de los huevos de la progenie. Estos factores pueden ocasionar profundos daños a la colonia de *H. illucens*.

Es aconsejable realizar nuevos estudios de los efectos del insecticida BPU, como el lufenuron, sobre las rutas metabólicas que usan los insectos, como *H. illucens*, para enfrentar este tipo de sustancias u otros agentes. Además es recomendable investigar el sustrato que generan las larvas cuando son alimentadas con un insecticida como el lufenuron. No se conoce si la efectividad del insecticida se mantiene o disminuye al ser ingerido y excretado por las larvas.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Adou, K., Bontoyan, W. R., & Sweeney, P. J. (2001). Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4153–4160. <https://doi.org/10.1021/jf001528q>
- Ahire, K. C., Arora, M. S., & Mukherjee, S. N. (2008). Development and application of a method for analysis of lufenuron in wheat flour by gas chromatography-mass spectrometry and confirmation of bio-efficacy against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 861(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.026>
- Akhtar, Y., & Isman, M. B. (2018). Insects as an Alternative Protein Source. *Proteins in Food Processing*, 2, 263–288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00011-5>
- Barros, L. M., Gutjahr, A. L. N., Ferreira- Keppler, R. L., & Martins, R. T. (2019). Morphological description of the immature stages of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae). *Microscopy Research and Technique*, 82(3), 178–189. <https://doi.org/10.1002/jemt.23127>
- Berendsen, B. J. A., Wegh, R. S., Memelink, J., Zuidema, T., & Stolker, L. A. M. (2015). The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*, 132, 258–268. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.022>
- Bessa, L. W., Pieterse, E., Marais, J., Dhanani, K., & Hoffman, L. C. (2021). Food safety of consuming black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae: Microbial, heavy metal and cross-reactive allergen risks. *Foods*, 10, 1934. <https://doi.org/10.3390/foods10081934>
- Beutel, R., Friedrich, F., Ge, S.-Q., & Yang, X.-K. (2013). *Insect Morphology and Phylogeny: A textbook for students of entomology*. Berlin, Boston: De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110264043>
- Boxshall, G. A., & Bravo, S. (2000). On the identity of the common Caligus (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contributions to Zoology*, 69(1–2), 137–146. <https://doi.org/10.1163/18759866-0690102015>
- Bravo, S., & Treasurer, J. (2023). The management of the sea lice in Chile: A review. *Reviews in*

- Aquaculture*. 1-16. <https://doi.org/10.1111/raq.12815>
- Bruno, D., Bonacci, T., Reguzzoni, M., Casartelli, M., Grimaldi, A., Tettamanti, G., & Brandmayr, P. (2020). An in-depth description of head morphology and mouthparts in larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Arthropod Structure & Development*, 58, 100969. <https://doi.org/10.1016/J.ASD.2020.100969>
- Cai, M., Li, L., Zhao, Z., Zhang, K., Li, F., Yu, C., Yuan, R., Zhou, B., Ren, Z., Yu, Z., & Zhang, J. (2022). Morphometric Characteristic of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) • Wuhan Strain and Its Egg Production Improved by Selectively Inbreeding. *Life*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/life12060873>
- Calabrese, E., & Baldwin, L. (2001) Hormesis: A Generalizable and Unifying Hypothesis. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(4-5), 353-424, <https://doi.org/10.1080/20014091111730>
- Cohen, E. (1993). Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22(1–2), 245–261. <https://doi.org/10.1002/arch.940220118>
- Cohen, E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: A revisit. *Pest Management Science*, 57(10), 946–950. <https://doi.org/10.1002/ps.363>
- Cohen, E. (2006). Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.09.002>
- Cohen, E. (2006). Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.09.002>
- Costa, Costa, M. A., Moscardini, V. F., da Costa Gontijo, P., Carvalho, G. A., de Oliveira, R. L., & de Oliveira, H. N. (2014). Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Toxicity of insecticides to *Trichogramma galloi*. *Ecotoxicology*, 23(8), 1399–1408. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1282-y>
- Cutler, G. (2013). Insects, Insecticides and Hormesis: Evidence and Considerations for Study. *Dose-response*, 11, 154-177. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-008>.
- Cutler G, Guedes R. (2017). Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects. Simposio Pesticide dose: Effects on the environment and target and non-target organisms: ACS

- Symposium serie 1249, 101-119. <https://doi.org/10.1021/bk-2017-1249.ch008>
- Douris, V., Steinbach, D., Panteleri, R., Livadaras, I., Pickett, J. A., Van Leeuwen, T., Nauen, R., & Vontas, J. (2016). Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(51), 14692–14697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618258113>
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., & Le, D. P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual review of entomology*, 43, 545–569. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.545>
- Diener, S., Zurbrügg, C., & Tockner, K. (2009). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: Establishing optimal feeding rates. *Waste Management and Research*, 27(6), 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- Doelle, K., Oliveira, F., List, R., & O'reilly, J. R. (2015). Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(5), 147–152. <https://www.researchgate.net/publication/305378530>
- Fachin, D. A., González, C.R., Elgueta, M., & Hauser, M. (2021). A catalog of Stratiomyidae (Diptera: Brachycera) from Chile, with a new synonym and notes on the species. *Zootaxa*, 5004(1), 1–57. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5004.1.1>
- Fachin, D. A., & Hauser, M. (2022). Large Flies Overlooked: the Genus *Hermetia* Latreille, 1804 (Diptera: Stratiomyidae) in the Neotropics, with 11 Synonyms and a New Species to Brazil. *Neotropical Entomology*, 51(5), 660–690. <https://doi.org/10.1007/s13744-022-00978-3>
- Fasolin, L. H., Pereira, R. N., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Andrade, C. C. P., Ramos, O. L., & Vicente, A. A. (2019). Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*, 125, 108586. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, C., Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., & Zaks, D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>
- Fonseca, A. P. P., Marques, E. J., Torres, J. B., Silva, L. M., & Siqueira, H. Á. A. (2015). Lethal and

- sublethal effects of lufenuron on sugarcane borer *Diatraea flavipennella* and its parasitoid *Cotesia flavipes*. *Ecotoxicology*, 24(9), 1869–1879. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1523-8>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008. FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides. Lufenuron. <http://www.fao.org>
- Fowles, T.M., Nansen, C. (2020). Insect-Based Bioconversion: Value from Food Waste en Närvänen, E., Mesiranta, N., Mattila, M., Heikkinen, A. (Eds). *Food Waste Management* (pp. 321-346). Palgrave Macmillan, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20561-4_12
- Gonzalez, P. V., & Harburguer, L. (2020). Lufenuron can be transferred by gravid *Aedes aegypti* females to breeding sites and can affect their fertility, fecundity and blood intake capacity. *Parasites & Vectors*, 13(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04130-1>
- Generalovic, T. N., McCarthy, S. A., Warren, I. A., Wood, J. M. D., Torrance, J., Sims, Y., Quail, M., Howe, K., Pipan, M., Durbin, R., & Jiggins, C. D. (2020). A high-quality, chromosome-level genome assembly of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.). *BioRxiv*, 2020.11.13.381889. <https://doi.org/10.1101/2020.11.13.381889>
- Gobbi, F. P. (2013). *Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de Hermetia illucens (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa* [Tesis de doctorado, Universidad de Alicante. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/28345>
- Guedes, R. N. C., & Cutler, G. C. (2014). Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. In *Pest Management Science* (Vol. 70, Issue 5, pp. 690–697). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ps.3669>
- Haddi, K., Mendes, M. V., Barcellos, M. S., Lino-Neto, J., Freitas, H. L., Guedes, R. N. C., & Oliveira, E. (2016). Sexual success after stress? Imidacloprid-induced hormesis in males of the neotropical stink bug euschistus heros. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156616>
- Hammock B. D. & Quistad G. B. (1981) Metabolism and mode of action of juvenile hormone, juvenoids and other insect growth regulators. In *Progress in Pesticide Biochemistry* (Edited by Huston H. and Roberts T. R.), pp. 11-23. Wiley, New York
- Hogsette, J. A. (1992). New diets for production of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae) in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*, 85(6), 2291–2294. <https://doi.org/10.1093/JEE/85.6.2291>
- Hoek-van den Hil, E. F., van de Schans, M. G. M., Bor, G., & van der Fels-Klerx, H. J. (2022). Effects of

- veterinary drugs on rearing and safety of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of Insects as Food and Feed*, 8(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.3920/jiff2021.012>
- Jansen, L. J. M., van de Schans, M. G. M., de Boer, D., Bongers, I. E. A., Schmitt, H., Hoeksma, P., & Berendsen, B. J. A. (2019). A new extraction procedure to abate the burden of non-extractable antibiotic residues in manure. *Chemosphere*, 224, 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.166>
- Junquera, P., Hosking, B., Gameiro, M., & MacDonald, A. (2019). Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. *Parasite*, 26, 1-26. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019026>
- Kelkenberg, M., Odman-Naresh, J., Muthukrishnan, S., & Merzendorfer, H. (2015). Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.11.005>
- Khajepour, S., Izadi, H., & Asari, M. J. (2012). Evaluation of two formulated chitin synthesis inhibitors, hexaflumuron and lufenuron against the raisin moth, *Ephestia figulilella*. *Journal of insect science*, 12(102). <https://doi.org/10.1673/031.012.10201>
- Khorshidi, M., Pour Abad, R. F., Saber, M., & Zibae, A. (2019). Effects of hexaflumuron, lufenuron and chlorfluazuron on certain biological and physiological parameters of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101270>
- Klammsteiner, T., Turan, V., Juárez, M. F. D., Oberegger, S., & Insam, H. (2020). Suitability of black soldier fly frass as soil amendment and implication for organic waste hygienization. *Agronomy*, 10(10), 1578. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101578>
- Lalander, C., Diener, S., Zurbrügg, C., & Vinnerås, B. (2019). Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Journal of Cleaner Production*, 208, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>
- Lehnert, M. S., Tarver, L. A., & Feng, J. (2022). Material Properties and Morphology of Prestomal

- Teeth in Relation to the Feeding Habits of Diptera (Brachycera). *Insects*, 13(2), 207. <https://doi.org/10.3390/insects13020207>
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D. & Green, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Li, X., Li, Y., Zhu, X., Li, X., Cheng, D., & Zhang, Y. (2023). Effects of imidacloprid-induced hormesis on the development and reproduction of the rose-grain aphid *Metopolophium dirhodum* (Hemiptera: Aphididae). *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1113464>
- Lopes, I. G., Lalander, C., Vidotti, R. M., & Vinnerås, B. (2020). Using *Hermetia illucens* larvae to process biowaste from aquaculture production. *Journal of Cleaner Production*, 251, 119753. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.119753>
- McAlpine, JF (1981). Morphology and terminology - adults pp 9-22. JF McAlpine et al (Eds) Manual of Nearctic Diptera Vol. 1 Monograph 27 Ottawa, Canada. Research Branch Agriculture Canada.
- Meijer, N., de Rijk, T., van Loon, J. J. A., Zoet, L., & van der Fels-Klerx, H. J. (2021). Effects of insecticides on mortality, growth and bioaccumulation in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *PLoS ONE*, 16(4): e0249362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249362>
- Merzendorfer, H. (2013). Chitin synthesis inhibitors: Old molecules and new developments. *Insect Science*, 20(2), 121–138. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01535.x>
- Mekonnen, M. M., & Hoekstra, A. Y. (2012). A Global Assessment of the Water Footprint of Farm Animal Products. *Ecosystems*, 15(3), 401–415. <https://doi.org/10.1007/s10021-011-9517-8>
- Miglietta, P. P., De Leo, F., Ruberti, M., & Massari, S. (2015). Mealworms for food: A water footprint perspective. *Water (Switzerland)*, 7(11), 6190–6203. <https://doi.org/10.3390/w7116190>
- Monthean, C., & Potter, D. (1992). Effects of RH 5849, a Novel Insect Growth Regulator, on Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 85(2), 507–513. <https://doi.org/10.1093/jee/85.2.507>
- Mommaerts, V., Sterk, G., & Smagghe, G. (2006). Hazards and uptake of chitin synthesis inhibitors in

- bumblebees *Bombus terrestris*. *Pest Management Science*, 62(8), 752–758.
<https://doi.org/10.1002/ps.1238>
- Mondal, K. A. M. S. H., & Parween, S. (2000). Insect growth regulators and their potential in the management of stored-product insect pests. *Integrated Pest Management Reviews*, 5, 255–295.
<https://doi.org/10.1023/A:1012901832162>
- Nation, Sr., J.L. (2022). *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781003279822>
- Ojha, S., Bußler, S., & Schlüter, O. K. (2020). Food waste valorization and circular economy concepts in insect production and processing. *Waste Management*, 118, 600–609.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.010>
- Oliveira, F. R., Doelle, K., & Smith, R. P. (2016). External morphology of *Hermetia illucens* (Stratiomyidae: Diptera) (L. 1758) based on electron microscopy. *Annual Research and Review in Biology*, 9(5). <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/22973>
- Oonincx, D. G. A. B., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., & Van Loon, J. J. A. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>
- Oonincx, D. G. A. B., Van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., Van den Brand, H., Van Loon, J. J. A., & Van Huis, A. (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS ONE*, 5(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>
- Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M. A., & Barba, A. (2013). Influence of the matrix in bioavailability of flufenoxuron, lufenuron, pyriproxyfen and fenoxycarb residues in grapes and wine. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.013>
- Pezzi, M., Leis, M., Chicca, M., Falabella, P., Salvia, R., Scala, A., & Whitmore, D. (2017). Morphology of the antenna of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): An ultrastructural investigation. *Journal of Medical Entomology*, 54(4), 925–933. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx055>
- Pezzi, M., Scapoli, C., Bharti, M., Faucheux, M. J., Chicca, M., Leis, M., Marchetti, M. G., Mamolini, E., Salvia, R., Falabella, P., & Bonacci, T. (2021). Fine structure of maxillary palps in adults of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Medical Entomology*, 58(2), 658–665.

<https://doi.org/10.1093/jime/tjaa251>

- Pimentel, D., Berger, B., Filiberto, D., Newton, M., Wolfe, B., Karabinakis E., Clark S., Poon E., Abbett E., & Nandagopal S. (2004). Water Resources, Agricultural and the Environmental Issues. *BioScience*, 54, 909–918. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0909:WRAAEI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0909:WRAAEI]2.0.CO;2)
- Pujol-Luz, J., Francez, P., Ururahy-Rodrigues, A., & Constantino, R. (2008). The Black Soldier-fly, *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae), Used to Estimate the Postmortem Interval in a Case in Amapá State, Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, 53, 476–478. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00659.x>
- Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., & Jäger, H. (2017). Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on the growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(8), 1410–1420. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946>
- Qu, Y., Xiao, D., Li, J., Chen, Z., Biondi, A., Desneux, N., Gao, X., & Song, D. (2015). Sublethal and hormesis effects of imidacloprid on the soybean aphid *Aphis glycines*. *Ecotoxicology*, 24(3), 479–487. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1396-2>
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. (2015). *EFSA Journal*, 13(10). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4257>
- Resolución 1.560 de 2019 [Ministerio de Salud de Chile] Fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. 11 de septiembre de 2019.
- Rösner, J., Wellmeyer, B., & Merzendorfer, H. (2020). *Tribolium castaneum*: A Model for Investigating the Mode of Action of Insecticides and Mechanisms of Resistance. *Current Pharmaceutical Design*, 26(29), 3554–3568. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200513113140>
- Roy, S., Chakraborty, S. K., Parui, P., & Mitra, B. (2018). Taxonomy of Soldier Flies (Diptera:

- Stratiomyidae) of Sunderban Biosphere Reserve, India. *Proceedings of the Zoological Society*, 71(2), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s12595-016-0200-0>
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- Sampson, B. J., Werle, C. T., Stringer, S. J., & Adamczyk, J. J. (2017). Ingestible insecticides for spotted wing Drosophila control: a polyol, Erythritol, and an insect growth regulator, Lufenuron. *Journal of Applied Entomology*, 141(1–2), 8–18. <https://doi.org/10.1111/jen.12350>
- Shen, D., Wang, L., Ji, J., Liu, Q., & An, C. (2018). Identification and characterization of C-type lectins in *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Science*, 18(2). <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev011>
- Shumo, M., Osuga, I. M., Khamis, F. M., Tanga, C. M., Fiaboe, K. K. M., Subramanian, S., Ekesi, S., Van Huis, A., & Borgemeister, C. (2019). The nutritive value of black soldier fly larvae reared on common organic waste streams in Kenya. *Scientific Reports*, 9(1), 10110. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46603-z>
- Sierras, A., & Schal, C. (2020). Lethal and sublethal effects of ingested hydroprene and methoprene on development and fecundity of the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, 57(4), 1199–1206. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa038>
- Sparks, T.C., Nauen, R., 2015. IRAC : mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 122–128.
- Szymank, A., Kearns, C. A., Pape, T., & Thompson, F. C. (2008). Pollinating Flies (Diptera): A major contribution to plant diversity and agricultural production. *Biodiversity*, 9(1–2), 86–89. <https://doi.org/10.1080/14888386.2008.9712892>
- Sun, R., Liu, C., Zhang, H., & Wang, Q. (2015). Benzoylurea Chitin Synthesis Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6847–6865. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02460>
- Surendra, K. C., Olivier, R., Tomberlin, J. K., Jha, R., & Khanal, S. K. (2016). Bioconversion of organic wastes into biodiesel and animal feed via insect farming. *Renewable Energy*, 98, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.022>
- Surendra, K. C., Tomberlin, J. K., Van Huis, A., Cammack, J. A., Heckmann, L. H. L., & Khanal, S. K. (2020). Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly

- (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). *Waste Management*, 117, 58–80.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.050>
- Syngenta. (2021). *Etiqueta Sorba® 050 EC*. <https://www.syngenta.cl/product/crop-protection/insecticidas/sorbar-050-ec-2#links>
- Tanani, M. A., Hasaballah, A. I., & Hussein, R. M. (2022). Assessment of the perturbation induced by chitin synthesis inhibitors lufenuron, flufenoxuron and hexaflumuron in the house fly, *Musca domestica vicina* (Diptera: Muscidae). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 83(1).
<https://doi.org/10.1186/s41936-022-00291-w>
- United Nations - Department of Economic and Social Affairs. (2022). *World Population Prospects 2022 Summary of Results*. <https://www.un.org>
- Üstüner, T., Hasbenli, A., & Rozkošný, R. (2003). The first record of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Stratiomyidae) from the Near East. *Studia Dipterologica*. 10. 181-185.
- Van der Fels-Klerx, H. J., Camenzuli, L., Van der Lee, M. K., & Oonincx, D. G. A. B. (2016). Uptake of Cadmium, Lead and Arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from Contaminated Substrates. *PLOS ONE*, 11(11), e0166186. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0166186>
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. (2013). *Edible insects: future prospects for food and feed security*. (FAO forestry paper; No. 171). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://edepot.wur.nl/258042>
- Vianna, U. R., Pratisoli, D., Zanuncio, J. C., Lima, E. R., Brunner, J., Pereira, F. F., & Serrão, J. E. (2009). Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effect on descendant generation. *Ecotoxicology*, 18(2), 180–186.
<https://doi.org/10.1007/s10646-008-0270-5>
- Wang, Z. L., Wang, X. P., Li, C. R., Xia, Z. Z., & Li, S. X. (2018). Effect of dietary protein and carbohydrates on survival and growth in larvae of the henosepilachna vigintioctopunctata (F.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Insect Science*, 18(4).
<https://doi.org/10.1093/jisesa/iev067>
- Wilson, T. G., & Cryan, J. R. (1997). Lufenuron, a Chitin-Synthesis Inhibitor, Interrupts Development of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental Zoology*, 278(1),37-44.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19970501\)278:1<37::aid-jez4>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19970501)278:1<37::aid-jez4>3.0.co;2-7)
- Wing, K. D., Slawecki, R. A., & Carlson, G. R. (1988). RH 5849, a Nonsteroidal Ecdysone Agonist: Effects

on Larval Lepidoptera. *Science*, 241(4864), 470–472.
<https://doi.org/10.1126/science.241.4864.470>

Woodley, N. (2001). A World Catalog of the Stratiomyidae (Insecta: Diptera). *Myia*, 11, 1–475.

Xiao, X., Mazza, L., Yu, Y., Cai, M., Zheng, L., Tomberlin, J. K., Yu, J., van Huis, A., Yu, Z., Fasulo, S., & Zhang, J. (2018). Efficient co-conversion process of chicken manure into protein feed and organic fertilizer by *Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae) larvae and functional bacteria. *Journal of Environmental Management*, 217, 668–676.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2018.03.122>

Yeates, D., & Wiegmann, B. (2017). Phylogeny of Diptera. In: Kirk-Spriggs, A.H. & Sinclair, B.J. (Eds.), *Manual of Afrotropical Diptera. Volume 1. Brachycera—Cyclorrhapha, excluding Calyptratae. Suricata 4*. South African National Biodiversity Institute, Pretoria, pp, 253–265.

Zheng, L., Hou, Y., Li, W., Yang, S., Li, Q., & Yu, Z. (2012). Biodiesel production from rice straw and restaurant waste employing black soldier fly assisted by microbes. *Energy*, 47(1), 225–229.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.09.006>

Zhu, K. Y., Merzendorfer, H., Zhang, W., Zhang, J., & Muthukrishnan, S. (2016). Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. *Annual Review of Entomology*. 61, 177–196.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023933>

9 ANEXOS I

Resultados del análisis de concentración de lufenuron en dieta, larva y sustrato (excreta de larva más residuo de dieta) en (mg/Kg).

Promedio y desviación estándar (n=3).

Tratamiento	Análisis de lufenuron en Dieta administrada (mg/Kg)	Análisis de lufenuron en Larva (mg/Kg)	Análisis de lufenuron Sustrato (mg/Kg)
TR1	0	0	0
TR2	0,069	0,024 ± 0,001	0,138 ± 0,036
TR3	0,149	0,044 ± 0,001	0,161 ± 0,067
TR4	0,282	0,107 ± 0,012	0,481 ± 0,041
TR5	0,878	0,392 ± 0,042	1,642 ± 0,169
TR6	1,066	0,622 ± 0,099	2,450 ± 0,233

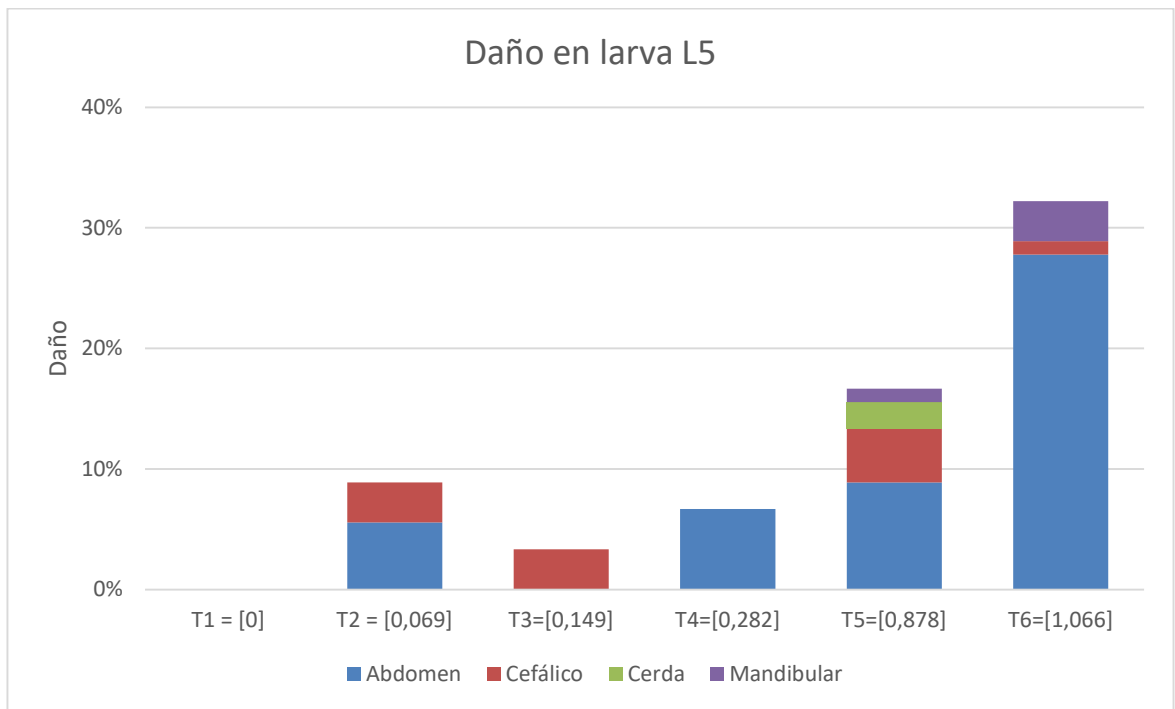
10 ANEXOS II

Resultados del análisis de concentración de lufenuron en dieta, larva y sustrato (excreta de larva más residuo de dieta) en (mg/Kg). Resultados entregados en **base seca**.

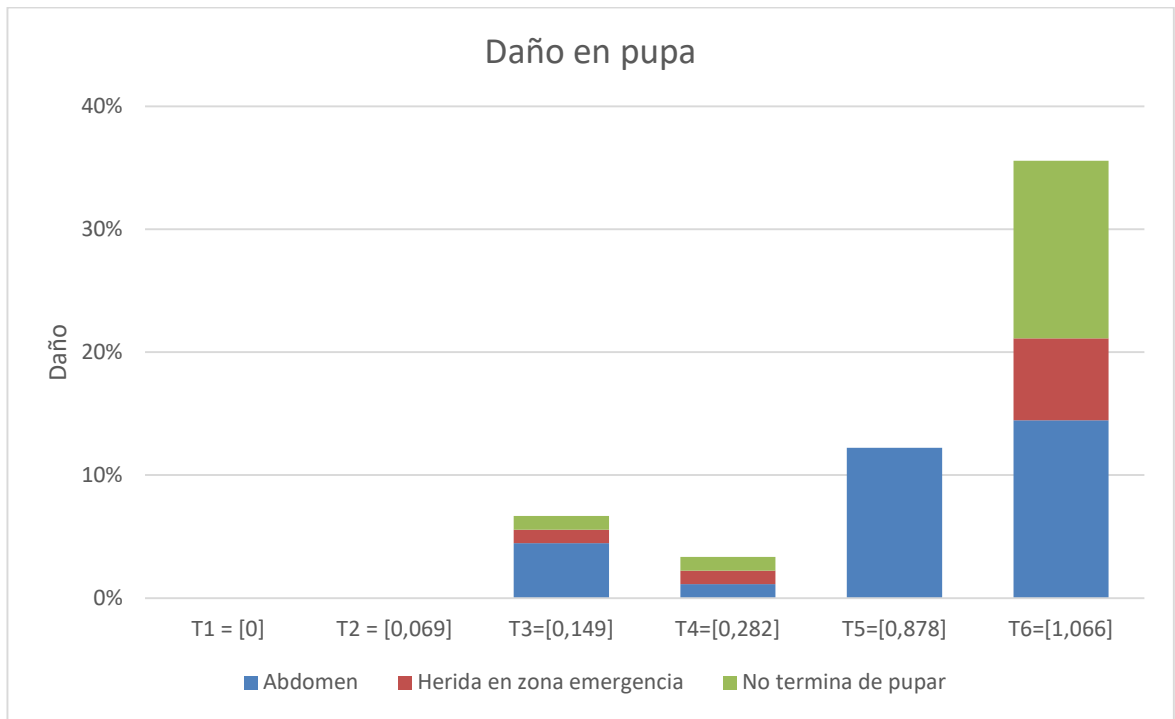
Promedio y desviación estándar (n=3).

Tratamiento	Análisis de lufenuron en Dieta administrada (mg/Kg)	Análisis de lufenuron en Larva (mg/Kg)	Análisis de lufenuron Sustrato (mg/Kg)
TR1	0	0	0
TR2	0,230	0,060 ± 0,002	0,190 ± 0,049
TR3	0,498	0,111 ± 0,003	0,218 ± 0,077
TR4	0,940	0,261 ± 0,023	0,625 ± 0,059
TR5	2,927	0,947 ± 0,069	2,300 ± 0,310
TR6	3,553	1,561 ± 0,207	3,443 ± 0,508

11 ANEXOS III: Detalle del tipo de daño en larva L5, pupa y adulto



12 ANEXOS III: Detalle del tipo de daño en larva L5, pupa y adulto



13 ANEXOS III: Detalle del tipo de daño en larva L5, pupa y adulto

