

## TRABAJOS ORIGINALES

Presentado: 29/04/2019  
Aceptado: 29/04/2020  
Publicado online: 25/05/2020  
Editor:

### Autores

**Miguel Constante Bobadilla Alvarez\* 1**  
mcba\_1122@yahoo.es  
<https://orcid.org/0000-0001-8478-7645>

**Sonia Melinda Reyes Castro 2**  
soniamemo@hotmail.com

### Correspondencia

#### \*Corresponding author

1 Departamento Académico de Ciencias Ambientales. Facultad de Recursos Naturales Renovables. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Carretera Central Km. 1.21, Tingo María. Leoncio Prado. Huánuco. Perú.  
2 Unidad de Salud Ambiental-Vigilancia y Control de Vectores. Microrred de Florencia de Mora. Hospital Distrital El Esfuerzo. Florencia de Mora. Trujillo. La Libertad. Perú.

### Citación

Bobadilla Alvarez MC, Reyes Castro SM. 2020. Efecto tóxico de los extractos de semillas de *Annona muricata* potenciados con dimetilsulfóxido sobre larvas IV y pupas de *Aedes aegypti*. Revista peruana de biología 27(2): 215- 224 (Mayo 2020). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i2.17877>

## Efecto tóxico de los extractos de semillas de *Annona muricata* potenciados con dimetilsulfóxido sobre larvas IV y pupas de *Aedes aegypti*

### Toxic effect of *Annona muricata* seed extracts potentiated with dimethyl sulfoxide on IV larvae and pupae of *Aedes aegypti*

#### Resumen

El objetivo de este estudio fue demostrar que los principios activos de las semillas de *Annona muricata* combinados con el extracto etanólico y dimetilsulfóxido (EE-DMSO), incrementan la mortalidad de larvas IV y pupas de *Aedes aegypti* con relación a extractos acuosos (EA) y extractos etanólicos (EE). Las bioactividades se calcularon por comparación de los porcentajes de mortalidad a las 6, 12, 24 y 48 horas in vitro y campo simulado. Los resultados indicaron mortalidad progresiva dependiente de las concentraciones y tiempos de exposición en larvas y reacción knock-down en pupas. In vitro a 5 mg.L<sup>-1</sup>, EA y EE ejercieron 100% de mortalidad larvaria en 24 horas de exposición (CL<sub>50</sub>=46.16 y 19.28 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente), en contraste con EE-DMSO, que inició sobre 62% con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> a las 6 horas (CL<sub>50</sub>=20.33 mg.L<sup>-1</sup>). La acción pupicida de EA y EE reveló 100% de mortalidad desde 24 horas en todas las concentraciones, a diferencia de EE-DMSO que se alcanzó entre 6 y 12 horas. En campo simulado, EA y EE ejercieron 100% de mortalidad a las 24 horas en larvas (16.91 y 21.21 mg.L<sup>-1</sup>), mientras que en pupas (20.44 y 23.03 mg.L<sup>-1</sup>) ocurrió a las 12 horas, entretanto, la actividad pupicida de EE-DMSO fue 100% en 6 horas. Los efectos comparativos in vitro y campo simulado denotaron patrones similares de respuestas larvicida y pupicida, pero con mayor sensibilidad en pupas. Los principios activos de las semillas de *A. muricata* combinados con EE-DMSO potencian la respuesta mortal de larvas y pupas de *A. aegypti* in vitro y campo simulado.

#### Abstract

The objective of this study was to demonstrate that active ingredients of *Annona muricata* seeds can be enhanced as a result of mixture of both ethanolic extract of *A. muricata* seeds and Dimethylsulfoxide (EE-DMSO). Percentage mortalities at 6, 12, 24 and 48 hours on fourth instar larvae and pupae of *Aedes aegypti* were calculated in order to compare bioactivities of aqueous (AE), ethanolic extracts (EE) and EE-DMSO under laboratory and simulated field conditions. Results showed larval mortality concentration- and time-dependent, and knock-down responses in pupae. In laboratory, AE and EE exerted 100% larval mortality at 5 mg.L<sup>-1</sup> after 24 hours (LC<sub>50</sub> = 46.16 and 19.28 mg.L<sup>-1</sup>). Conversely, EE-DMSO showed between 62 – 100% mortality at 0.5 mg.L<sup>-1</sup> for over 6 hours (LC<sub>50</sub> = 20.33 mg.L<sup>-1</sup>). Pupicidal effects in AE and EE revealed 100% mortality at 24 hours employing all concentrations, except in EE-DMSO which commenced when individuals were exposed between 6 and 12 hours. In simulated field, AE and EE provoked 100% larval mortality at 24 hours (16.91 y 21.21 mg.L<sup>-1</sup>) while pupal mortality at 12 hours (20.44 y 23.03 mg.L<sup>-1</sup>). Percentage mortality of pupae was 100% using EE-DMSO even before 6 hours. Comparative toxic effects of laboratory and simulated-field systems have shown to maintain a similar pattern of larval mortality and more sensitive responses in pupae. Accordingly, larval and pupal mortality responses of *A. aegypti* were enhanced with the use of EE-DMSO and active ingredients of *A. muricata* seeds under laboratory and simulated field conditions.

#### Palabras clave:

Extractos botánicos; insecticidas; larvicida; pupicida; mosquito del dengue; DMSO; *Annonaceae*; guanábana; graviola.

#### Keywords:

Botanical pesticides; insecticides; larvicidal; pupicidal; yellow fever mosquito, DMSO; *Annonaceae*; soursop.

## Introducción

La actividad bioinsecticida de especies de *Annonaceae* ha sido ampliamente conocida desde el descubrimiento de acetogeninas y alcaloides isoquinolínicos, principios activos mayoritariamente causantes de toxicidad en artrópodos de interés agrícola y salud pública (Isman 2006, Hincapié et al. 2008; Álvarez et al. 2007; Isman & Seffrin 2014). *Annona muricata*, una de las especies clave investigadas por sus aplicaciones insecticidas, es capaz de controlar etapas inmaduras de *Aedes aegypti* principal vector de arbovirus como dengue, zika y chikungunya (Ravaomanarivo et al. 2014; Rodrigues et al. 2019).

De otro lado, la bioactividad de principios activos vegetales se correlaciona con el poder de extracción y disolutivo del solvente. Mientras que el empleo aislado de metanol, acetona, éter o cloroformo no garantizan eficientes procesos de extracción de metabolitos, la combinación de ellos encarece costos de extracción, son de difícil accesibilidad comunitaria y en muchos casos, no sinergiza la acción de interés (Palma et al. 2013, Petigny et al. 2015; Dhanani et al. 2017; Caesar & Cech, 2019). Por ende, se requiere de solventes adecuados que permitan la extracción de un amplio rango de principios activos, polares y no polares, de vasta acción plaguicida, siendo además potenciadores del efecto insecticida base. Tal es el caso del dimetilsulfóxido (DMSO;  $C_2H_6OS$ ), molécula orgánica anfipática que tiende a solubilizar variados compuestos orgánicos e inorgánicos (Capriotti & Capriotti, 2013). En la naturaleza el DMSO surge por oxidación biológica del dimetilsulfuro producido en alimentos, suelo, aguas naturales, vegetación y fitoplancton (Pearson et al. 1991). Su relativa baja toxicidad, ha dado lugar a ser extensivamente usado en formulaciones farmacoterapéuticas y biomédicas al acelerar la permeabilidad de antibióticos, barbitúricos y anestésicos (Tunçer et al. 2018), además de agentes disolutivos en plaguicidas con extractos botánicos frente a *A. aegypti* (Nour et al. 2012; Stratton 1985).

La demostrada penetrabilidad tegumentaria de biomoléculas activas que ejerce el DMSO al interior celular, favorecerían la bioactividad en órganos blanco (Jacob and Herschler 1986, Notman et al. 2006; Madruga et al. 2017) lo que podría ser replicada en etapas inmaduras de mosquitos vectores. Sin embargo, estudios que revelen el incremento de la acción insecticida de metabolitos activos de *A. muricata* en sinergia con DMSO no han sido reportados. Por lo tanto, el presente trabajo evaluó el efecto potenciador del DMSO en extractos de semillas de *A. muricata* "guanábana" sobre larvas y pupas de *A. aegypti* in vitro y campo simulado.

## Material y métodos

### Fase pre-experimental

#### Obtención de poblaciones silvestres de *A. aegypti*.

El área cubierta para la captura del vector constituye el 2.33% de zonas urbano-marginales (41.36 km<sup>2</sup>) de la provincia de Trujillo. Se seleccionaron seis viviendas distribuidas entre los distritos de Trujillo (08°05'19"S, 79°00'54"W; 08°06'20"S, 79°01'00"W; 08°06'09"S, 79°00'58"W) y Florencia de Mora (08°05'16"S,

79°01'32"W; 08°04'40"S, 79°00'55"W; 08°04'51"S, 79°01'41"W), con dos años consecutivos de Índice Aédico superior a 2%. Dichos antecedentes también indicaron que los recipientes de mayor probabilidad de obtención de larvas correspondieron a baldes de plástico de 4 litros y cilindros de almacenamiento de 200 litros de capacidad de acuerdo con el Índice de Recipiente. Luego de 10 días de vigilancia entre los meses de febrero a marzo, ambos recipientes confirmaron ser las unidades muestrales positivas de larvas, procediendo a la captura con pipetas de plástico en envases herméticos rotulados (MINSA 2017, DIGESA 2011).

**Crianza y mantenimiento de larvas y pupas.-** La crianza masal de *A. aegypti* se desarrolló en la Unidad de Salud Ambiental, Vigilancia y Control de Vectores del Hospital Distrital El Esfuerzo, Florencia de Mora. La crianza se desarrolló por siete generaciones en términos de alcanzar mínima variabilidad en la respuesta al tóxico vegetal. Las larvas se colocaron en fuentes de plástico de 40 x 28 x 5 cm. con 300 mL de agua potable de clorada. Se tuvo en cuenta condiciones de alta esterilidad del criadero aplicando hipoclorito de sodio (NaClO 2.5%) y mezcla sulfocrómica ( $H_2CrO_4$ ) para evitar enfermedades fúngicas o bacterianas. El aporte base de 500 mg/día de alimento consistió en pellets para peces suplementado con hígado de pollo seco (en proporción 1:1), esterilizado en estufa a 80 °C por 1 hora y almacenado en bolsas de papel de aluminio. El suministro de alimento aumentaba progresivamente en proporción a la densidad larvaria y el avance al estadio larval superior, mientras que el recambio de agua se realizó entre las 48 y 96 horas, teniendo en cuenta la ausencia de turbidez y olor por descomposición orgánica (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Cerca de 2000 pupas se acondicionaron en recipientes de plástico con 400 mL de agua potable de clorada, repartidos en 5 insectarios de tul de 80 x 80 x 60 cm similar al modelo de insectario de Barraud en el mantenimiento de adultos (Gerberg et al. 1994).

**Crianza y mantenimiento de adultos.-** Diariamente, la alimentación de zancudos machos consistió en colocar frascos de vidrio estéril con 10 mL de jugo de frutas embebidos en algodón y en contacto con tiras de papel filtro. Así también, la alimentación de las hembras por exposición cutánea del dorso de un cobayo, se realizó en horas de la mañana durante 20 minutos (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994).

**Obtención de huevos.-** El desove se produjo sobre discos de papel filtro en frascos de oviposición con agua. Luego, los huevos se trasladaron a recipientes de plástico estériles (13 x 10 cm) con 200 mL de agua potable de clorada para eclosión larvaria y continuidad de la crianza. Todas las etapas de desarrollo de *A. aegypti* se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura en un rango de 25 ± 3 °C, humedad relativa de 70 ± 10% y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994).

**Selección de frutos y semillas de *A. muricata*.**- Frutos maduros de *A. muricata* se obtuvieron del Mercado Central del distrito de Virú, La Libertad, en los meses de

producción (febrero a julio). Las semillas se lavaron profusamente con agua potable y secaron bajo sombra por una semana.

**Preparación de extractos bioinsecticidas.**- Dos kilogramos de semillas secas trituradas en molino casero, se maceraron en tres litros de agua destilada, etanol 96% y una combinación de etanol 96% y DMSO (1:1) por 3 días en frascos de vidrio ámbar, con periodos de remoción entre 6 a 8 horas a temperatura y humedad ambientales. Luego de filtrar con papel Whatman N° 1, se procedió a evaporar cada extracto en baño maría a 45 °C. El extracto acuoso (EA) se concentró a 200 mL, en tanto que los extractos etanólicos (EE) y etanol-DMSO (EE-DMSO) se redujeron a sequedad para diluirlos a la misma temperatura en 200 mL de agua destilada y 200 mL de DMSO, respectivamente, constituyendo las tres soluciones madre. Con propósitos de preservación, las soluciones se refrigeraron a 4 °C por un máximo de 30 días (Vidal et al. 2009).

#### *Fase experimental in vitro*

**Bioensayos estándar larvicida y pupicida.**- Se realizó un bioensayo rápido de toxicidad aguda con ocho concentraciones (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L) previo al ensayo estándar. El criterio de elección de las concentraciones fue aquel rango que produjo entre 10 y 95% de mortalidad larvaria en 24 horas, estableciéndose a 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L ser incluidas en el bioensayo estándar. Los ensayos independientes larvicidas y pupicidas se conformaron de acuerdo con los solventes de extracción en EA, EE, EE-DMSO (DMSO 1.5%) más el control, C, (250 mL de agua potable declorada con DMSO 1.5%), en en vasos de poliestireno expandido Tecnopor® con 250 mL de solución conteniendo 25 larvas del IV estadio y pupas, sometidas a cuatro repeticiones por concentración. Las lecturas de mortalidad se llevaron a cabo a la 6, 12, 24 y 48 horas que incluyó el retiro de aquellos individuos muertos. Las larvas se consideraron muertas cuando no reaccionaban al punzarlas levemente en la región cervical, mientras que las pupas, al mostrar detención corporal en la superficie de la solución o no reaccionar ante ligeras punciones en el cefalotórax. Todos los grupos se mantuvieron bajo condiciones controladas de iluminación por luz fría, temperatura entre 25±2 °C y humedad relativa entre 75 a 80%. La mortalidad de ambos estadios se registraron en hojas técnicas estandarizadas (McLaughlin et al. 1998; WHO 2005).

#### *Fase experimental en campo simulado*

**Elección de unidades experimentales.**- Referenciándonos en los índices de recipiente positivos, las unidades experimentales seleccionadas fueron baldes de plástico de 4 litros de capacidad. A los recipientes de experimentación y control se les asignó un código de tal manera que su elección se fundamente en muestreos sin reposición, donde un código solo puede ser elegido por única vez. En esta asignación el primer código (letras del alfabeto) fue el indicado para el recipiente control y el resto para los experimentales (Ventosilla et al. 2001).

**Bioensayos estándar larvicida y pupicida.**- Las pruebas larvicidas y pupicidas se realizaron en baldes de

4 litros capacidad con agua potable declorada y 50 larvas del IV estadio y pupas, respectivamente, por tres repeticiones más el grupo control (agua con DMSO al 1.5%). Se emplearon las concentraciones provenientes de las  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  del bioensayo in vitro, en cantidades proporcionales que demandaron añadir a los 4 litros de solución de prueba. Los baldes fueron cubiertos con doble pliegue de malla de tul, sujetados con ligas gruesas de caucho para evitar el ingreso y salida de organismos. La exposición de los sistemas a luz solar continua en el mes de marzo, se llevó a cabo en un jardín engramado de interior desde la 6:00 am. con evaluaciones de la mortalidad a las 6, 12 y 24 horas, registrados en hojas técnicas estándar y bajo los mismos criterios de mortalidad por estadio empleados en los bioensayos in vitro. Los rangos aproximados naturales de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, alcanzaron temperaturas atmosféricas entre 21 a 27 °C y humedad relativa de 75 a 82% (WHO 2005).

**Análisis estadístico.**- Se empleó el software R ver. 3.5.2 for Windows (R Project for Statistical Computing) para el cálculo de las  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$ , y ANOVA de medidas repetidas con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre concentraciones y tiempos de exposición. Además, se estableció la prueba de bondad de ajuste, chi cuadrado ( $X^2_{\text{adj}}$ ), para un valor P mayor que 0.05 aceptándose el modelo. Así también se determinó el Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ) como ajuste del modelo para la relación de variables X e Y.

## Resultados y discusión

La Tabla 1, muestra el efecto tóxico agudo en porcentaje de mortalidad de larvas y pupas. Los extractos confieren mínima mortalidad entre 2 a 10% (5 mg.L<sup>-1</sup>/EE-EA/larvas) desde las 6 horas de exposición y una máxima de 100% (10 mg. L<sup>-1</sup>/EE y EE-DMSO/larvas y pupas) hasta las 48 horas en ambos estadios, a excepción de EA con 73% de muerte larvaria. En general, el porcentaje de mortalidad es gradual a 0.5 y 1 mg.L<sup>-1</sup> en todos los extractos, a diferencia de las concentraciones 5 y 10 mg.L<sup>-1</sup> cuyas respuestas parecen tener efecto tóxico muy potente en EE y EE-DMSO superior a 75% desde las 12 horas. En contraste, la alta sensibilidad de las pupas reveló intensa respuesta tóxica en todos los extractos entre las 6 y 12 horas, superior a 67% en EE y EE-DMSO, en comparación al grupo larvario y control.

La Tabla 2 evidencia que las respuestas tóxicas, serían dependientes del estadio y tipo de extracto. Además, el análisis probit demostró que los datos se ajustaron mayoritariamente al modelo de respuesta dicotómica (sobrevivencia/mortalidad) de los organismos, cuya sensibilidad estimó las  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  (Stenersen 2004; Finney 1978). No obstante, los datos referidos a la acción de EE-DMSO no se ajustaron convenientemente debido al estrecho margen de mortalidad cercano al 100% desde las 12 horas impidiendo la estimación de la  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  y parámetros estadísticos adicionales. En perspectiva, la sensibilidad larvaria al estímulo químico fue constante a las 6 horas en los tres extractos. A partir de las 12 horas, EA y EE exhiben un progresivo patrón de letalidad que se extiende a las 48 horas

( $R^2$ : 0.52 – 0.96, b: 28.03 – 37.18,  $X^2$ : 12.91 – 26.42,  $P$ : 0.48 – 0.77), a excepción de EE-DMSO que supera el 95% de mortalidad a larvas y pupas desde las 12 horas. El ajuste óptimo de las variables (b: 4.81,  $X^2$ : 27.94,  $P$ : 0.37) y elevada interdependencia ( $R^2$  entre 0.77 – 0.98) se consiguió a las 6 horas, reflejando potencia letal del extracto. Por lo tanto, la toxicidad de los extractos sugieren conferir bioactividad en larvas y pupas, siendo las últimas más sensibles.

La Tabla 3 resume las CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> extraídas de la Tabla 2. Dichas concentraciones, ejecutadas para los experimentos de campo simulado, tuvieron en cuenta que los tiempos de exposición muestren un  $X^2$  mayor a 2 y  $R^2$  entre el 61 y 98% de asociación de variables a fin de respaldar el ajuste del modelo (Robertson et al. 2017). En el ensayo larvicida, el efecto de una misma concentración

produce respuestas nulas o tardías de toxicidad mayormente en EA y EE con relación a EE-DMSO hasta las 12 horas de exposición. Por ejemplo, la mínima CL<sub>50</sub>, 16.91 mg/L, no evidencia mortalidad larvaria entre 6 y 12 horas, en contraste con la inmediata superior, 21.21 mg/L, que repunta a 85% en EA a las 12 horas y 100% en EE y EE-DMSO. Además, este último es superior en efectividad al aplicar la CL<sub>90</sub>, 41.6 mg/L, con 94% las 6 horas e incrementando a 100% a las 12 horas (Tabla 4). En contraste, la acción pupicida es temprana, 78% en EA a 23.03 mg/L desde las 6 horas, y total en todas las concentraciones de los extractos a partir de las 12 horas, salvo en la CL<sub>90</sub>, 53.18 mg/L que, en contra de lo esperado, genera mortalidad a las 24 horas en EE-DMSO. De igual manera, la CL<sub>50</sub>, 23.03 mg/L, en EA y EE ejercen 78% y 63% de mortalidad a las 6 horas y 100% a las 12 horas (Tabla 5).

**Tabla 1.** Porcentaje de mortalidad in vitro de larvas del IV estadio y pupas de *A. aegypti* por exposición de extractos de *A. muricata*. TE: Tipo de extracto; EA: Extracto acuoso; EE: Extracto etanólico; EE-DMSO: Extracto etanol-dimetilsulfóxido; C: Control; T: Tiempos de exposición en horas; L: Larvas del IV estadio; P: Pupas.

TE	0.5 (mg/L)				1.0 (mg/L)				5.0 (mg/L)				10 (mg/L)			
	EA	EE	EE/DMSO	C	EA	EE	EE/DMSO	C	EA	EE	EE/DMSO	C	EA	EE	EE/DMSO	C
T	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
6	0	64	0	92	62	93	0	0	11	61	0	95	74	98	0	0
12	32	93	40	100	86	100	0	0	39	97	72	100	90	100	0	0
24	53	100	67	100	100	100	0	0	100	100	81	100	100	100	0	0
48	73	100	79	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0

**Tabla 3.** Resumen de las CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> in vitro de semillas de *A. muricata*. Las concentraciones subrayadas se emplearon en los ensayos de campo simulado. CL: Concentración Letal; EA: Extracto acuoso; EE: Extracto etanólico; EE-DMSO: Extracto etanol-dimetilsulfóxido; ND: Concentraciones letales no determinadas.

	EA (mg.L <sup>-1</sup> )				EE (mg.L <sup>-1</sup> )					EE/DMSO (mg.L <sup>-1</sup> )			
	Larvas		Pupas		Larvas		Pupas			Larvas		Pupas	
	6h	12h	6h	12h	6h	12h	24h	6h	12	6h	12h	6h	12h
CL <sub>50</sub>	19.87	<u>21.21</u>	<u>20.44</u>	23.42	13.55	<u>16.91</u>	19.28	<u>23.03</u>	ND	20.33	21.82	23.48	ND
CL <sub>90</sub>	30.10	39.0	40.56	52.97	17.86	33.41	40.52	51.81	ND	<u>41.60</u>	48.14	<u>53.18</u>	ND

**Tabla 4.** Porcentaje de mortalidad de larvas IV de *A. aegypti* en campo simulado. TE: Tiempo de exposición; CL: Concentración Letal; EA: Extracto acuoso; EE: Extracto etanólico; EE-DMSO: Extracto etanol-dimetilsulfóxido.

TE	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )						CL <sub>90</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )		
	EA		EE		EE/DMSO		EA	EE	EE/DMSO
	16.91	21.21	16.91	21.21	16.91	21.21	41.60		
6 h	0	0	0	0	0	0	0	94	
12 h	0	85	0	100	0	100	0	100	
24 h	100	100	100	100	100	100	0	100	

**Tabla 5.** Porcentaje de mortalidad de pupas de *A. aegypti* en campo simulado. TE: Tiempo de exposición; CL: Concentración Letal; EA: Extracto acuoso; EE: Extracto etanólico; EE-DMSO: Extracto etanol-dimetilsulfóxido.

TE	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )						CL <sub>90</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )		
	EA		EE		EE/DMSO		EA	EE	EE/DMSO
	20.44	23.03	20.44	23.03	20.44	23.03	53.18		
6 h	0	78	0	61	0	100	0	0	
12 h	100	100	92	100	100	100	0	0	
24 h	100	100	100	100	100	100	100	100	



**Tabla 2.** Análisis probit de los extractos de semillas de *A. muricata* sobre larvas IV y pupas de *A. aegypti* in vitro. TE: Tiempo de exposición; Es.: Estadio; CL: Concentración Letal; L: Larva del IV estadio; P: Pupa; LC: Límite de Confianza; R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación; b(±ES): pendiente (±error estándar); X<sup>2</sup>: Chi cuadrado; P: Valor de probabilidad (0.05). -<sup>a</sup> Parámetros no calculados.

TE	Es.	Extracto acuoso						Extracto etanólico						Extracto etanol-dimetilsulfóxido					
		CL (m.g. l <sup>-1</sup> )	Valor	R <sup>2</sup>	b (±ES)	X <sup>2</sup>	P	Valor	R <sup>2</sup>	b (±ES)	X <sup>2</sup>	P	Valor	R <sup>2</sup>	b (±ES)	X <sup>2</sup>	P		
6	L	CL <sub>50</sub>	19.87	0.70	20.0	5.28	0.15	13.55	0.54	35.23	2.02	0.99	20.33	0.98	23.52	18.95	0.27		
		LC	[15.28-32.17]		(±0.16)			[11.84-19.76]		(±0.23)			[14.19-41.30]		(±0.26)				
	CL <sub>90</sub>	30.10					17.86					41.60							
	LC	[22.35-51.45]					[14.63-30.30]					[27.99-89.26]							
6	P	CL <sub>50</sub>	20.44	0.61	21.60	16.48	0.90	23.03	0.95	6.37	27.27	0.51	23.48	0.77	4.81	27.94	0.37		
		LC	[14.43-39.88]		(±0.23)			[14.60-74.85]		(±0.15)			[14.71-82.91]		(±0.24)				
	CL <sub>90</sub>	40.56					51.81					53.18							
	LC	[27.65-83.38]					[31.44-180.14]					[31.86-201.15]							
12	L	CL <sub>50</sub>	21.21	0.96	37.18	12.91	0.48	16.91	0.89	44.76	20.30	0.14	21.82	0.96	11.60	25.52	0.12		
		LC	[15.23-39.25]		(±0.18)			[12.76-27.02]		(±0.16)			[14.29-58.48]		(±0.31)				
	CL <sub>90</sub>	39.0					33.41					48.14							
	LC	[27.12-76.65]					[24.42-56.09]					[30.24-137.62]							
12	P	CL <sub>50</sub>	23.42	0.85	4.50	27.50	0.46	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>		
		LC	[14.70-81.61]		(±0.14)			- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		
	CL <sub>90</sub>	52.97					- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>							
	LC	[31.80-197.72]					- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>							
24	L	CL <sub>50</sub>	46.16	0.52	16.1	5.32	0.14	19.28	0.93	25.77	21.81	0.71	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>		
		LC	[28.14 - 18.34]		(±0.24)			[13.56-38.10]		(±0.19)			- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		
	CL <sub>90</sub>	119.0					40.52					- <sup>a</sup>							
	LC	[77.15 - 44.48]					[27.46-84.77]					- <sup>a</sup>							
24	P	CL <sub>50</sub>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>		
		LC	- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>				- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>			
	CL <sub>90</sub>	- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>							
	LC	- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>							
48	L	CL <sub>50</sub>	21.22	0.52	28.03	26.42	0.77	21.88	0.51	12.52	26.72	0.67	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>		
		LC	[14.11-52.76]		(±0.33)			[14.29-59.60]		(±0.28)			- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		
	CL <sub>90</sub>	46.47					48.45					- <sup>a</sup>							
	LC	[29.66-123.08]					[30.34-140.8]					- <sup>a</sup>							
48	P	CL <sub>50</sub>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>		
		LC	- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>				- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>		- <sup>a</sup>			
	CL <sub>90</sub>	- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>							
	LC	- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>					- <sup>a</sup>							

Los tres extractos ejercen 100% de mortalidad a las 24 horas evidenciando mayor sensibilidad a pupas con relación a las CL50 de larvas (16.91 y 21.21 mg/L) a pesar de no representar marcadas diferencias cuantitativas.

La fase de laboratorio es el primera de cuatro fases recomendadas por la WHO (2005) tendientes a comprobar el desempeño de un insecticida. La segunda fase de campo simulado a escala reducida, intentó preliminarmente abordar la durabilidad por exposición solar de los metabolitos de *A. muricata* mediada por extractos aislados y en combinación con DMSO al tener por referente la variación de los porcentajes de mortalidad. Aunque los tiempos de evaluación pudieron ampliarse, la potencia

de los extractos determinó que el 100% de mortalidad ocurra dentro de las 24 horas sugiriendo que los metabolitos sean aún activos. Adicionalmente, esta fase ratifica los hallazgos de mortalidad en laboratorio sobre la mayor bioactividad de EE-DMSO, que también fueron dependientes del estadio larva o pupa.

Las Tablas de la 6 a 11 indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tiempos, concentraciones e interacción de ambos factores sobre larvas y pupas respondiendo diferencialmente al efecto creciente de los estímulos químicos.

**Tabla 6.** ANOVA de extracto acuoso de semillas de *A. muricata* en larvas de *A. aegypti* in vitro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Valor P	Valor F
Concentraciones	55.22	3	18.40	1125.68	1.84x10 <sup>-44**</sup>	2.79
Tiempos de exposición	170.68	3	56.89	3479.13	4.01x10 <sup>-56**</sup>	2.79
Interacción	12.0	9	1.33	81.56	5.24x10 <sup>-26**</sup>	2.08
Dentro del grupo	0.78	48	0.02			
Total	238.69	63				

**Tabla 7.** ANOVA de extracto etanólico de semillas de *A. muricata* en larvas de *A. aegypti* in vitro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Valor P	Valor F
Concentraciones	81.64	3	27.21	622.37	2.09x10 <sup>-38**</sup>	2.79
Tiempos de exposición	209.22	3	69.74	1594.99	4.74x10 <sup>-48**</sup>	2.79
Interacción	23.07	9	2.56	58.64	7.52x10 <sup>-23**</sup>	2.08
Dentro del grupo	2.09	48	0.04			
Total	316.04	63				

**Tabla 8.** ANOVA de extracto etanólico-Dimetilsulfóxido de semillas de *A. muricata* en larvas de *A. aegypti* in vitro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P	Valor F
Concentraciones	8.16	3	2.72	558.48	2.62x10 <sup>-37**</sup>	2.79
Tiempos de exposición	50.64	3	16.88	3463.03	4.48x10 <sup>-56**</sup>	2.79
Interacción	10.53	9	1.17	240.13	9.04x10 <sup>-37**</sup>	2.08
Dentro del grupo	0.23	48	0.01			
Total	69.58	63				

**Tabla 9.** ANOVA de extracto acuoso de semillas de *A. muricata* en pupas de *A. aegypti* in vitro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P	Valor F
Concentraciones	6.38	3	2.12	10.99	1.29x10 <sup>-5**</sup>	2.79
Tiempos de exposición	53.50	3	17.83	92.08	6.36x10 <sup>-20**</sup>	2.79
Interacción	9.08	9	1.09	5.209	6.158x10 <sup>-5**</sup>	2.08
Dentro del grupo	9.29	48	0.19			
Total	78.27	63				

**Tabla 10.** ANOVA de extracto etanólico de semillas de *A. muricata* en pupas de *A. aegypti* in vitro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P	Valor F
Concentraciones	2.12	3	0.70	16.18	2.098x10 <sup>-7**</sup>	2.79
Tiempos de exposición	6.02	3	2.08	45.94	3.783x10 <sup>-14**</sup>	2.79
Interacción	6.36	9	0.70	16.18	8.826x10 <sup>-12**</sup>	2.08
Dentro del grupo	2.09	48	0.04			
Total	16.60	63				

**Tabla 11.** ANOVA de extracto etanólico-Dimetilsulfóxido de semillas de *A. muricata* en pupas de *A. aegypti* in vitro.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P	Valor F
Concentraciones	1.71	3	0.57	14.59	6.956x10 <sup>-7**</sup>	2.79
Tiempos de exposición	3.85	3	1.28	32.77	1.117x10 <sup>-11**</sup>	2.79
Interacción	5.15	9	0.57	14.59	5.151x10 <sup>-11**</sup>	2.08
Dentro del grupo	1.88	48	0.039			
Total	12.61	63				

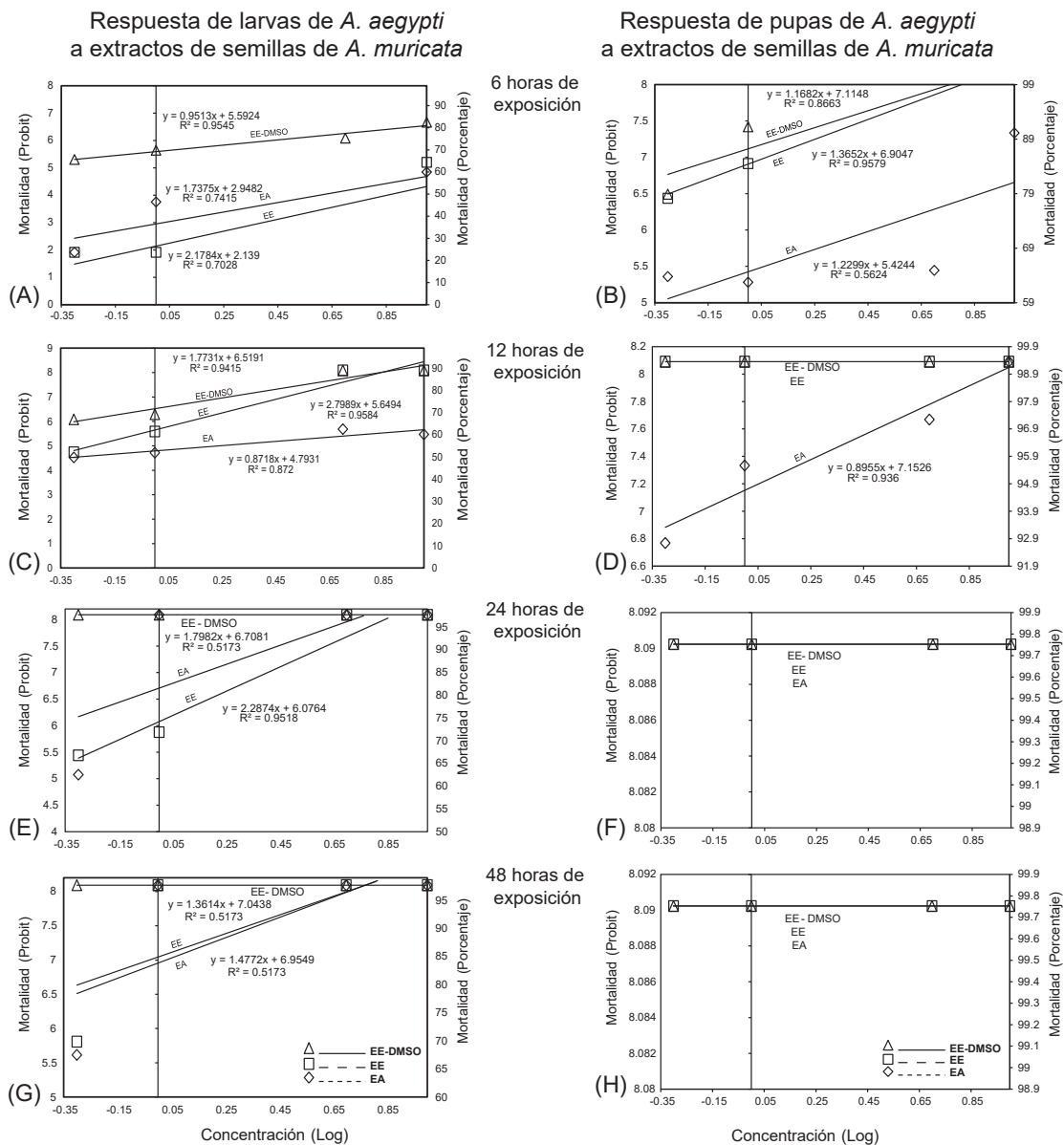
\* $p > 0.05$  no hay diferencias significativas

\*\* $p < 0.05$  hay diferencias significativas

Las respuestas de la población por exposición a los tóxicos revelaron patrones de sensibilidad y tolerancia (Figura 1, A-H), lo cual se correlaciona con las pendientes superior a 2 en condiciones acuáticas (Vonesh & Chini-chilli 1997; Carr 1998; Yu 2008). Aunque las pendientes suelen ser mínimas en EE-DMSO, los valores de R2 con un máximo de 95%, indicarían alta toxicidad larvicida y pupicida hasta por 48 horas, de acuerdo con el tiempo máximo de duración del bioensayo. Además, dado que los trazados de las rectas probit-logarítmicas mantienen tendencias de control larvicida relativamente exponencial (Figuras 1A, C, D, G), contrariamente, la actividad pupicida de los tres extractos fue fulminante al observar la configuración de rectas planas (Figuras 1D, F y H), sugiriendo elevada potencia tóxica (Kacew & Byung-Mu 2013). En esencia, la respuesta a los tratamientos con rectas iguales (planas) (Figuras 1F, H), paralelas (Figuras

1A, B) y no paralelas (Figuras 1C, D, E, G), revelarían distintos modos de detoxificación de los individuos de prueba frente a la absorción cuticular, intestinal, sensibilidad al órgano blanco y excreción del tóxico por el organismo (Robertson et al. 2017). No obstante, futuros análisis bioquímicos son necesarios para confirmar dichas hipótesis.

La eficacia insecticida de extractos vegetales es altamente dependiente del tipo o polaridad del solvente empleado (Ghosh et al 2012). Además, la actividad larvicida y pupicida sobre *A. aegypti*, suele variar respecto al órgano vegetal de *A. muricata*, siendo la extracción etanólica de semillas las que confieren mayor mortalidad (Bobadilla et al 2005), a pesar de la extracción alternativa y eficiente con solventes de distinta polaridad (agua, cloroformo y hexano) en el biocontrol de otros insectos (Bobadilla 1998; Bobadilla et al. 2003).



**Figura 1.** Respuesta de larvas (A, C, E, G) y pupas (B, D, F, H) de *A. aegypti* a extractos de semillas de *A. muricata* a las 6, 12, 24 y 48 horas de exposición. EA: Extracto acuoso, EE: Extracto etanólico, EE-DMSO: Extracto etanólico-Dimetilsulfóxido.

En nuestro propósito por evaluar el incremento de la respuesta larvica y pupica con la inclusión del potenciador DMSO en etanol como solvente referencial, nuestros hallazgos revelaron que dichas bioactividades aumentan significativamente *in vitro* manteniéndose en campo simulado. Una explicación se fundamentaría en el fácil mecanismo de solubilización, penetrabilidad y partición de sustancias bioactivas fomentadas por el DMSO (Dragicevic et al. 2015), por lo que la doble función solvente-potenciador, podría habilitar cuticularmente el traslado tegumentario de acetogeninas (He et al. 1997), alcaloides triptamínicos (Moghadamtousi et al. 2015) y ciclopéptidos (Coria et al. 2018), principios activos de semillas, que eventualmente podrían ser potenciados por el DMSO en alusión a su carácter aprótico dipolar característico de potenciadores por penetración (Barbosa, et al 2003; Marren 2011).

Evidencias que respalden nuestro planteamiento potenciador del DMSO es revelado por aumento de la penetración de principios activos de extractos herbáceos al integumento del ácaro *Rhipicephalus annulatus* por remoción de la capa sérica epicuticular (Ravindran et al. 2011). Asimismo, la asociación de principios insecticidas con DMSO y metanol en medio acuoso fueron muy efectivos en larvas de *Culex* (Bowman et al. 1981). En ensayos de aplicación oral de acetogeninas anonáceas en larvas de *Spodoptera frugiperda* e inyección hemolínfica en *Leptinotarsa decemlineata* con DMSO (Guadaño et al. 2000), demuestran potencia insecticida con escaso efecto en organismos controles (Gonçalves et al. 2007). Por lo tanto, desde el punto de vista de la solubilización y procesamiento de extractos bioinsecticidas, EE y la combinación EE-DMSO, ejercerían mayor amplitud de solubilidad y potencia tóxica al basarnos en los porcentajes de mortalidad y en virtud a que los potenciadores por penetración suelen ser fácilmente solubles por solventes orgánicos como el etanol (Magnusson et al. 2001), sin desmerecer la solubilidad ejercida por EA que evidenció actividad larvica y pupica en menor intensidad.

Las probables vías de control en larvas de *A. aegypti*, han determinado por incluir modos de acción por contacto e ingesta (Gusmão et al. 2002; Costa et al, 2018). Así también, dado que la mayoría de los insecticidas controladores de mosquitos ejercen actividad por ingestión (Antonio-Nkondjio et al. 2018), la ausencia de alimentación en pupas conllevaría a que las sustancias sólo ejerzan acción por contacto (Pereira et al. 2013). En contexto con nuestros resultados, la bioactividad pupica desencadenó movimientos de distensión y retracción de la pupa de 2 segundos de duración a intervalos de 15 a 20 segundos, previos a la anulación del desplazamiento y flotabilidad característicos de la exposición a insecticidas por contacto, así como inmovilidad y muerte que revelarían toxicidad neuromuscular (Tomé et al. 2014). La respuesta tóxica probablemente haya iniciado por penetrabilidad de la cubierta proteica del conjunto laminar del exoesqueleto de la pupa (Liu et al. 2017), cuya toxicidad sugeriría acción *knockdown* o de aniquilación inmediata, tal como señala la WHO (2016). Es decir que la condición *knockdown* partiría por la emisión vía cuti-

cular de los principios activos para rápida penetrabilidad y respuesta inmediata (Stocky et al. 2001), lo cual se produjo desde los 15 minutos (resultados no mostrados), tal como lo realizan los piretroides al asociarlos con el sinergista Butóxido de Piperonilo (BPO) (Giddings et al. 2016). No obstante, bajo los propósitos de determinar la mortalidad acorde a los tiempos del bioensayo, probablemente la disminución de la concentración del tóxico estime la precisión de las  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  a fin de observar respuestas susceptibles graduales y ajustables.

**Conclusiones.-** Los extractos acuosos, etanólicos y combinación etanol-DMSO de las semillas de *A. muricata* ejercen acción larvica y pupica *in vitro* y campo simulado. La toxicidad se incrementa en relación directa a las concentraciones, tipos de extracto y estadio de desarrollo. Los altos porcentajes de mortalidad de la combinación etanol-DMSO evidenciaron mayor potencia tóxica que los extractos acuoso y etanólico. La potencia es superior en pupas que en larvas sugiriendo alta sensibilidad vinculada a posibles mecanismos de penetración por contacto presuntivamente relacionadas a respuestas neuromusculares. Estos alcances primarios promoverán investigaciones de control vectorial, operatividad, factibilidad y aplicabilidad comunitaria de extractos de *A. muricata* potenciados.

## Literatura citada

- Álvarez O. et al. 2007. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Pesticide Science*. 80(1): 63-67. <https://doi.org/10.1007/s10340-006-0149-2>.
- Antonio-Nkondjio C., N. Sandjo, P. Awono-Ambene, & C. Wondji. 2018. Implementing a larviciding efficacy or effectiveness control intervention against malaria vectors: key parameters for success. *Parasites & vectors*, 11(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2627-9>
- Barbosa I., R. Martins M. Melo & A. Soares. 2003. Acute and Chronic Toxicity of Dimethylsulfoxide to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(6), 1264-1268. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0119-9>.
- Bobadilla M., F. Zavala M. Sisniegas G. Zavaleta J. Mostacero y L. Taramona. 2005. Evaluación larvica de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus "guanábana" sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Revista peruana de Biología*. 12(1): 145-152. <https://doi.org/10.15381/rpb.v12i1.2369>
- Bobadilla M., F. Zavala M. Sisniegas G. Zavaleta y L. Pollack. 2003. Evaluación tóxica comparativa de las semillas de *Annona cherimolia*, *Annona muricata* y *Cucurbita maxima* sobre larvas y pupas de *Anopheles*. *REBIOL* 23 (1-2): 51-58.
- Bobadilla M., M. Salazar y P. Arellano. 1998. Efecto biocida de fitoconstituyentes de semillas de *Annona cherimolia* (Magnoliales) sobre *Brevicoryne brassicae* (Homóptera) en condiciones de laboratorio. *REBIOL*. 18(1-2): 1-9.
- Bowman M. et al. 1981. Stressed Bioassay Systems for Rapid Screening of Pesticide Residues. Part I: Evaluation of Bioassay Systems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 10(1):9-24. <https://doi.org/10.1007/BF01057571>



- Caesar L. & N. Cech. 2019. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*. 36(6):845-936. <https://doi.org/10.1039/C9NP00011A>.
- Capriotti K & J. Capriotti. 2013. Dimethyl Sulfoxide: History, Chemistry, and Clinical Utility in Dermatology. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 5(9): 24-26
- Carr W. 1988. The molecular nature of chemical stimuli in the aquatic environment. In: Atema J, Fay R, Popper A, Tavolga W. eds. *Sensory Biology of Aquatic Animals*. Springer-Verlag. New York. Part I, pp 3-27.
- Consoli R. e R. Lourenço de Oliveira. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fio-cruz. Rio de Janeiro. 228 pp.
- Costa M. et al. 2018. Modes of action of squamocin in the anal papillae of *Aedes aegypti* larvae. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. (101): 172-177. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2017.04.001>.
- Coria A. et al. 2018. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*. 11(5): 662-691. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>.
- Dhanani T. et al. 2017. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1): S1193-S1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>
- DIGESA. 2011. Norma Técnica de Salud para la Implementación de la Vigilancia y Control del *Aedes Aegypti*, vector del Dengue en el Territorio Nacional. Ministerio de Salud. Lima. 62 p.
- Dragicevic N., J. Atkinson & H. Maibach. 2015. Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action. In: Dragicevic N & H. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers. Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 11-27. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>
- Finney D. 1978. *Statistical Method in Biological Assays*. 3<sup>rd</sup> edit. Charles Griffin and Company LTD. High Wycombe. England. 524 pp.
- Gerberg E., D. Barnard & R. Ward. 1994. *Manual for mosquito rearing and experimental techniques*. 2<sup>nd</sup> edit. American Mosquito Control Association, Inc. California. pp.41-57.
- Gonçalves K. E. Toigo, B. Ascoli, G. von Poser & V. Ribeiro. 2007. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitology Research* 100(6):1267-1270. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0418-2>.
- Guadaño A. C. Gutiérrez, E. de la Peña, D. Cortes & A. González-Coloma. 2000. Insecticidal and Mutagenic Evaluation of Two Annonaceae Acetogenins. *Journal of Natural Products*. 63(6): 773-776. <https://doi.org/10.1021/np990328+>
- Ghosh A. N. Chowdhury & G. Chandra. 2012. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian journal of medical research*. 135(5): 581-598.
- Giddings J. J. Gagne & Sharp J. 2016. Synergistic effect of piperonyl butoxide on acute toxicity of pyrethrins to *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(8):, 2111-2116. <https://doi.org/10.1002/etc.3373>
- Gusmão D., V. Páscoa, L. Mathias, I. Curcino, R. Braz-Filho & F. Alves. 2002. Derris (*Lonchocarpus*) urucu (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(3): 371-375. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000300017>
- He K, Zeng L, Ye Q, Shi G, Oberlies NH, Zhao G-X, Njoku CJ, McLaughlin JL. 1997. Comparative SAR Evaluations of Annonaceous Acetogenins for Pesticidal Activity. *Pesticide Science*. 49(4):372-378. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199704\)49:4<372::AID-PS543>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199704)49:4<372::AID-PS543>3.0.CO;2-K).
- Hincapié C. D. Lopera e M. Ceballos. 2008. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonácea) sobre *Sitophilus zeamais* (coleóptera:Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 34 (1):76-82.
- Isman B. & R. Seffrin. 2014. Natural Insecticides from the Annonaceae: A Unique Example for Developing Biopesticides. In Singh D. eds. *Advances in Plant Biopesticides*, New Delhi. 21-33pp. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_2)
- Isman M. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51(1): 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.15>.
- Jacob S. & R. Herschler. 1986. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 23(1): 14-27. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(86\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(86)90014-3)
- Kacew S. & L. Byung-Mu. 2013. *Lu's Basic Toxicology. Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment*. 6<sup>th</sup> edit. Informa Healthcare, London EC1R 3DA. 416 pp.
- Kotake Y. et al. 2004. Detection and determination of reticuline and N-methylcoculaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 806(1): 75-78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.017>.
- Liu W. et al. 2017. Involvement of cecropin B in the formation of the *Aedes aegypti* mosquito cuticle. *Scientific Reports* 7(16395): 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16625-6>
- Madruga E. et al. 2017. Comparative use of dimethyl sulfoxide (DMSO) in different animal species. *Veterinárni Medicina*. 62 (04): 179-185. <https://doi.org/10.17221/176/2015-VETMED>.
- Magnusson B. K. Walters & M. Roberts. 2001. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50(3): 205-227. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00158](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00158).
- Marren K. 2011. Dimethyl Sulfoxide: An Effective Penetration Enhancer for Topical Administration of NSAIDs. *The Physician and Sportsmedicine*. 39(3): 75-82 <https://doi.org/10.3810/psm.2011.09.1923>
- Mc Laughlin J., R. Lingling & J. Anderson. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 32(2): 513-524. <https://doi.org/10.1177/009286159803200223>.
- MINSa. 2017. Programa de entrenamiento en salud pública dirigido a personal del servicio militar voluntario: Vigilancia y Control Vectorial. Guía del practicante. Ministerio de Salud e Instituto Nacional de Salud. Lima. 233 p.
- Moghadamtousi S. M. Fadaeinasab S. Nikzad G. Mohan H. Ali & H. Kadir. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences* 16(7): 15625-15658. <https://doi.org/10.3390/ijms160715625>.

- Notman R., M. Noro. B. O'Malley & J. Anwar. 2006. Molecular basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on lipid membranes. *Journal of American Chemical Society*. 128(43):13982-13983. <https://doi.org/10.1021/ja063363t>
- Nour A., J. Sandanasamy & A. Nour. 2012. Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes aegypti* mosquitoes' larvae. *Scientific Research and Essays* 7(31): 2810-2815. <https://doi.org/10.5897/SRE12.133>
- Palma M. et al. 2013. Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects., in M. Rostagno and J. Prado, eds. *Natural Product Extraction Principles and Applications*, Royal Society of Chemistry (RSC Green Chemistry Series, 21), Cambridge CB4 0WF, UK. pp. 58-88. <https://doi.org/10.1039/9781849737579-00058>
- Pearson Th. H. Dawson & H. Lackey. 1991. Natural Occurring Levels of Dimethyl Sulfoxide in Selected Fruits, Vegetables, Grains, and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29(5): 1089-1091. <https://doi.org/10.1021/jf00107a049>.
- Pereira L. M. Tejo & E. Barbosa. 2013. Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(4):420-425. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0118-2013>.
- Petigny L. et al. 2015. Water as Green Solvent for Extraction of Natural Products, in F. Chemat and J. Strube, eds. *Green Extraction of Natural Products*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 237-264. <https://doi.org/10.1002/9783527676828.ch7>.
- Ravaomanarivo R. et al. 2014. Efficacy of seed extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata* (Annonaceae) for the control of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(10): 787-795. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1264>
- Ravindran R. et al. 2011. Toxicity of DMSO, Triton X 100 and Tween 20 against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Journal of Parasitic Diseases* 35(2):237-239. <https://doi.org/10.1007/s12639-011-0054-3>.
- Robertson J., MJ. Moneen, E. Olguin. & B. Alberts. 2017. *Bioassays with arthropods*. 3<sup>rd</sup> edit. CRC Press. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton. 194 pp.
- Rodrigues A. et al. 2019. Larvicidal and Enzymatic Inhibition Effects of *Annona muricata* Seed Extract and Main Constituent Annonacin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland). 12(3): 112. <https://doi.org/10.3390/ph12030112>
- Stenersen J. 2004. *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. CRC Press. Boca Raton. 276 pp.
- Stocky L., D. Cantalupi. J. Lucas & R. Kowalik. 2001. Formulating options for aerosol insecticides. In: A. Mueninghoff, Viets K & R. Downer, eds. *Pesticide formulation and application systems: A new century for agricultural formulations*. America Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA. Pp. 90-98.
- Stratton GW. 1985. The influence of solvent type on solvent-pesticide interactions in bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 14(6): 651-658. <https://doi.org/10.1007/BF01055771>.
- Tomé H. et al. 2014. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors* 24(7): 195. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-195>
- Tunçer et al. 2018. Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Nature Scientific Report* 8:14828. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33234-z>.
- Ventosa P., B. Infante J. Merello y J. Chauca. 2001. *Guía de Práctica para la Producción de Bacillus thuringiensis subsp. israelensis usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades*. OPS/OMS/ROW/IMTA/H. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. 64 p.
- Vidal J., A. Carbajal M. Sisniegas y M. Bobadilla. 2009. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. *Revista Peruana de Biología*. 15(2): 103-109. <https://doi.org/10.15381/rpb.v15i2.1733>
- Vonesh E. & V. Chinichilli. 1997. *Linear and Nonlinear Models for the Analysis of Repeated Measurements*. Marcel Dekker, New York. 541 pp.
- WHO 2005. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. 39 pp.
- WHO 2016. *Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations. Interim guidance for entomologists*. WHO/ZIKV/VC/16.1. Geneva.13 pp.
- Yu S. 2008. *The toxicology and biochemistry of insecticides*. Taylor and Francis Group. LLC. Boca Raton, Florida. 283 pp.

#### Agradecimientos / Acknowledgments:

Nuestro especial agradecimiento a la Blga. Elizabeth Judith Vidal Ulloa (Centro de Salud Progreso, Chimbote) y al Dr. Carlos José Ramírez Biaggi (Hospital distrital "El Esfuerzo" - Florencia de Mora, Trujillo) por el soporte logístico brindado al desarrollo de la presente investigación.

#### Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores no incurrir en conflictos de intereses.

#### Rol de los autores / Authors Roles:

MB realizó la crianza masiva de *A. aegypti*, ejecución de bioensayos, análisis de datos y redacción del manuscrito. SR realizó la colecta de frutos de *A. muricata*, crianza masiva de *A. aegypti*, ejecución de bioensayos y redacción del manuscrito.

#### Fuentes de financiamiento / Funding:

Los autores declaran no haber recibido un fondo específico para este trabajo.

#### Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Los autores declaran no haber incurrido en aspectos antiéticos. El material biológico utilizado no tiene una legislación específica sobre investigación.