

Artículo original

Actividad larvívica de extractos y fracciones proteicas de *Annona muricata* L. en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

Larvicidal activity of extracts and protein fractions of *Annona muricata* L. on *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

Magaly Alejandra Brousett-Minaya^{1,2,*}, Juan Reyes-Larico², Edgar Chaparro³, Miguel Bobadilla Álvarez⁴

¹Laboratorio de Química, Facultad de Ingenierías, Universidad Nacional Autónoma de Alto Amazonas, Loreto, Perú

²Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Naturales y Formales, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú

³Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú

⁴Programa de Investigación Formativa, Vicerrectorado de Investigación, Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú

Resumen

En el campo de la salud pública, los programas de control de vectores priorizan el uso de insecticidas químicos, excluyendo métodos alternativos ecoamigables derivados de plantas. Se sabe que *Annona muricata* exhibe una actividad biológica insecticida que altera las etapas de desarrollo, los procesos fisiológicos y la mortalidad de insectos transmisores de enfermedades, pero los principios activos y las proteínas de esta especie de *Annonaceae* requieren validación entomotóxica en un modelo biológico de culicidos. Se evaluó la actividad de los extractos etanólico (ExtEtOH) y de alcaloides (ExtAlc) y de las fracciones proteicas (FP) de semillas de *A. muricata* en larvas del IV estadio temprano de *Culex quinquefasciatus* empleando un abordaje comparativo. El análisis cualitativo de metabolitos en ExtEtOH reveló la presencia de alcaloides, aminoácidos, lactonas, taninos, cardenólidos, acetogeninas y flavonoides. Mediante cromatografía de exclusión molecular se separaron cinco fracciones proteicas de las cuales se evaluó la tercera (FP3), la cual exhibió mayor letalidad larval (33 % con 0,5 mg/ml) y potencia revelada en la concentración letal media (CL₅₀) (0,66 mg/ml, p: 0,166). ExtAlc mostró valores de mortalidad cercanos a los de la FP3 (30 %) y su CL₅₀ (0,74 mg/ml, p: 0,754), en tanto que ExtEtOH confirió máxima mortalidad (100 %) y una CL₅₀ inferior (0,03 mg/ml, p: 0,976). Se observaron dos reacciones tóxicas: una respuesta inmediata en ExtEtOH (97 % en 12 h) y una respuesta aguda mediata en FP y ExtAlc extendida hasta finalizar el ensayo (72 % en 72h).

Palabras claves: Enfermedades transmitidas por vectores; Toxicidad; Proteínas de plantas; Extractos vegetales; Control de vectores.

Abstract

In public health, vector control programs prioritize the use of chemical insecticides and exclude alternative eco-friendly plant-derived methods. *Annona muricata* exhibits bioinsecticidal activity that can modify developmental stages, physiological processes, and lethality in disease-transmitting insects. However, Annonaceae species' active principles and proteins require entomotoxic validation using a Culicidae biological model. Ethanolic (ExtEtOH) and alkaloid (ExtAlc) extracts and (PF) protein fractions from *A. muricata* seeds were evaluated on 4th instar larvae of *Culex quinquefasciatus* using a comparative scheme. The qualitative chemical analysis of ExtEtOH revealed alkaloids, amino acids, lactones, tannins, cardenolides, acetogenins, and flavonoids. Protein extract molecular

Citación: Brousett-Minaya MA, et al. Actividad larvívica de extractos y fracciones proteicas de *Annona muricata* L. en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 48(188):623-637, julio-septiembre de 2024. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.2649>

Editor: Myriam Sánchez de Gómez

***Correspondencia:**

Magaly Alejandra Brousett Minaya; mbrousett@unaaa.edu.pe

Recibido: 21 de mayo de 2024

Aceptado: 27 de julio de 2024

Publicado en línea: 29 de agosto de 2024



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

exclusion chromatography allowed the separation of five protein fractions. PF3 exhibited larval mortality of 33% with 0.5 mg/ml, LC₅₀ 0.66 mg/ml (p : 0.166), and ExtAlc showed 30% with LC₅₀ 0.74 mg/ml (p : 0.754) while ExtEtOH conferred 100% mortality and LC₅₀ 0.03 mg/ml (p : 0.976). We observed immediate larvicidal reactions by ExtEtOH of 97% in 12 h and mediate reactions by PF and ExtAlc of 72% in 72 h.

Keywords: Vector-borne diseases; Toxicity; Plant proteins; Vegetable extracts; Vector control.

Introducción

La incidencia y la prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores (ETV) en Perú van de la mano con el incremento de los índices de pobreza y se combaten siguiendo las políticas sanitarias de primera línea de acción que recomiendan el uso de insecticidas químicos (World Health Organization-WHO, 2014). En los programas de salud pública, frecuentemente se aplican organofosforados, organoclorados, neonicotenoides y piretroides durante los brotes de ETV, con una notoria disminución de los índices de morbimortalidad por dengue, Zika, chikungunya y malaria (Instituto Nacional de Salud (Perú), 2024). Sin embargo, el aumento inesperado de ETV en el primer trimestre de 2024 sugiere una asociación con el incremento poblacional de vectores primarios transmisores como *Aedes aegypti* y especies de *Anopheles* spp. (Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, 2024). Aunque tal diseminación podría verse incentivada por el cambio climático, otra causa documentada es la adquisición de mecanismos de resistencia del vector debido, en parte, al poco control de emisión de insecticidas de origen agrícola, doméstico o comercial, que alteran el esquema químico impuesto por los sistemas de salud (Richards *et al.*, 2020). Además, el empleo aislado de insecticidas se contraponen a las directrices del manejo integrado de vectores (MIV) que recomiendan la integración de métodos complementarios (físicos, biológicos o de ordenamiento de hábitats), así como el uso de productos naturales (Rajput *et al.*, 2023).

Un aspecto desatendido en los programas de gestión de las ETV y vigilancia vectorial es la aparición de enfermedades asociadas con *Culex quinquefasciatus* Say. Las reacciones de hipersensibilidad a las molestas picaduras del adulto hematófago resultan en una respuesta distorsionada de los servicios de salud local, que anteponen el alivio de signos y síntomas en detrimento de la mitigación de los criaderos del agente vector (Vander Does *et al.*, 2022). En efecto, en estudios sobre el crecimiento poblacional de *C. quinquefasciatus* se predice un escenario a corto plazo de marcada distribución geográfica del insecto y de enfermedades como la filariasis linfática (FL), la encefalitis japonesa (VEJ) y la fiebre del Nilo occidental en nuevas áreas de dominio en Perú y Chile (Figueroa *et al.*, 2020; Shocket *et al.*, 2020). Este escenario epidemiológico parece ya confirmarse en ciertos países de Suramérica que revelan en *C. quinquefasciatus* la adquisición y transmisión del virus del oeste del Nilo (VON) y en la capacidad de albergar el virus Zika, lo que lo convierte en un doble propagador de la enfermedad junto con *A. aegypti* (Reis *et al.*, 2023). Dichos hallazgos, sumados a la presencia de hábitats condicionantes de alta diseminación del vector (aguas estancadas, plantación de arrozales y sistemas inadecuados de tratamiento de aguas residuales), constituyen indicadores de alerta epidemiológico-ambiental que ameritan un replanteamiento de las medidas preventivas de ordenamiento del medio y vigilancia poblacional de *C. quinquefasciatus*. (Ha *et al.*, 2021) mediante estrategias ecoamigables como el uso de insecticidas botánicos.

Los insecticidas botánicos incluyen los plaguicidas derivados de plantas con algún efecto biológico en organismos (Ayilara *et al.*, 2023). La obtención y procesamiento de la materia prima vegetal, la extracción y biodegradabilidad de los principios activos y la nula generación de resistencia son factores de creciente aceptación internacional ante los exigentes criterios de elección de nuevas categorías de insecticidas (Seiber *et al.*, 2014; Pant *et al.*, 2016). Además, la creación de estándares químicos para su validación y control de calidad (Heng *et al.*, 2013) ha incentivado la permanente innovación de insecticidas

botánicos de nueva generación (micro o nanoemulsiones, formulaciones de liberación controlada o en espiral, etc.), cuya potencia supera, incluso, la de los insecticidas sintéticos (**Bhandari et al.**, 2016).

Un buen prospecto de insecticida botánico es la especie *Annona muricata* L., la graviola o guanábana, por su amplia bioactividad derivada de acetogeninas, alcaloides, diterpenos, flavonoides y compuestos fenólicos (**Riley-Saldaña et al.**, 2017, **Durán-Ruiz et al.**, 2023). Las virtudes asociadas al control de las fases del desarrollo acuático y terrestre de los insectos holometábolos del orden Diptera son de especial interés en salud pública, dado el amplio espectro de acción del vegetal en varios niveles (repelencia, efecto disuasorio de la oviposición por contacto y digestivo), y los cortos periodos y baja concentración de los principios activos que requiere (**Rodrigues et al.**, 2019).

Aunque los modos de acción antivectorial señalados son habituales en moléculas sintetizadas a partir de una vía metabólica secundaria, el descubrimiento de proteínas tóxicas en semillas de *A. muricata* (lectinas, inhibidores de proteasas, proteínas inhibitoras de ribosomas (PIR) y ciclopéptidos), abre una ruta metabólica adicional de control de vectores (**Kocyigit et al.**, 2023). Las propiedades citotóxicas y de defensa frente al ataque de insectos de las proteínas vegetales son propias de varias familias (**Dang & Van Damme**, 2015). Sin embargo, en especies del género *Annona* la entomotoxicidad larvicida se da únicamente en *A. muricata* y en la acción de las lectinas de sus semillas en *C. quinquefasciatus* (**Parthiban et al.**, 2020a; **Parthiban et al.**, 2020b). En Perú no se ha hecho ninguna investigación de referencia que ilustre dicho efecto en la misma especie vegetal y el mismo vector.

En este contexto, nuestro estudio partió de la premisa de que el uso de extractos y fracciones proteicas de las semillas de guanábana en determinadas concentraciones y tiempos de exposición tiene un efecto larvicida y exhibe distintas respuestas tóxicas frente a un culicido modelo de amplia distribución, lo que promete escenarios positivos de un posible empleo de *A. muricata* como insecticida botánico para la disminución poblacional del insecto. En este sentido, se evaluó la actividad de los extractos etanólico y de alcaloides y de las fracciones proteicas de semillas de *A. muricata* en larvas de *C. quinquefasciatus* empleando un abordaje comparativo.

Materiales y métodos

Material vegetal

Los frutos de *A. muricata* se adquirieron en el mercado de Quillabamba - Cusco, situado a 1.050 m de altitud. Se separaron las semillas de 5 kg de frutos y se lavaron con hipoclorito de sodio (0,5 %) para su desinfección; posteriormente se secaron en estufa a 40 °C durante 10 h. Las semillas se molieron hasta obtener un polvo uniforme (**Alegre**, 2017).

Procesamiento de extractos y fracciones proteicas

Extracto etanólico (ExtEtOH). Las semillas pulverizadas (200g) se maceraron en 400 mL de etanol al 96 % en un recipiente de vidrio color ámbar herméticamente cerrado mantenido en oscuridad a 22 °C. El procedimiento incluyó la remoción continua del sistema durante una semana. El extracto etanólico filtrado se concentró en un rotaevaporador (LabTech EV311VA) a 370 mbar de presión y 40 °C (**Bobadilla**, 2005).

Extracto de alcaloides (ExtAlc). La harina de semillas así obtenida se desengrasó durante 8 horas con 2-propanol; luego, 100 g se homogeneizaron con 400 mL de ácido tricloroacético al 5 % en agitación constante durante 12 horas. La mezcla se centrifugó (6000 rpm x 15min) y el sobrenadante se alcalinizó con 10 mL de hidróxido de sodio 10 M en un embudo de separación. Los alcaloides se extrajeron con diclorometano (3 x 50 mL), se recuperó la fase orgánica y se evaporó en un rotaevaporador a 40 °C (**Zamora-Natera et al.**, 2005).

Fracciones proteicas (FP). Las semillas pulverizadas (20g) se desengrasaron con 2-propanol (proporción 1:4 p/v a 15 °C por 4 h). Una doble filtración al vacío eliminó la interferencia de contaminantes grasos. El material desengrasado y seco se extrajo en

solución salina de NaCl 0,15 M (proporción 10:90 p/v) a 4 °C durante 4 h (**Brandão-Costa *et al.*, 2018**). El extracto acuoso se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se filtró por jeringa Minisart® (0,22 µm). Las proteínas se separaron por cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-75, utilizando como eluyente el tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0. La columna se equilibró y se colocaron las muestras con elución de 0,25 mL/min. Las fracciones recuperadas se leyeron por BioSpectrometer® Kinetic Eppendorf (Germany) a 280 nm. La concentración proteica se determinó por el método del ácido bicinónico (BCA, sensibilidad entre 0,02 a 1,0 mg/mL). Para esto, una alícuota de 200 µl de BCA: CuSO₄ (50:1) se agregó a 25 µl de la muestra proteica y se incubó a 37 °C (en oscuridad durante 25 min en placa) y se leyó en el espectrofotómetro a 562 nm (**Brousett-Minaya, 2013**). Por último, los extractos etanólico y de alcaloides y las fracciones proteicas purificadas liofilizadas en un equipo Labconco (2,5 L) se almacenaron a 4 °C.

Tamizaje fitoquímico. El vegetal triturado (20g) fue macerado en diclorometano (CH₂Cl₂), etanol (EtOH) y agua de grado analítico durante cinco días. Para la marcha fitoquímica se empleó la técnica del Instituto Nacional de Salud (INS, 1999), que consiste en un conjunto de reacciones específicas de coloración y precipitación para detectar los tipos de metabolitos secundarios presentes.

Con los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner se determinaron los alcaloides (**Coy, 2014;**), en tanto que con el reactivo de Liebermann-Burchard se rastrearon los esteroides y triterpenos (**Ardila, 2014**). Con las soluciones de Fehling, Baljet, Kedde y Shinoda se detectaron, respectivamente, azúcares reductores, lactonas, cardenólidos, acetogeninas y flavonoides (**Ardila, 2014;**). El hidrato de tricetohidrindeno (ninhidrina) reaccionó a la presencia de aminoácidos y con el ensayo de espuma se reconocieron las saponinas, en tanto que el viraje de color del cloruro férrico (FeCl₃) indicó la presencia de taninos (**Valencia, 2005**). El gradiente de presencia o ausencia de metabolitos se expresó como muy abundante (++++), abundante (+++), moderado (++) , leve (+) o ausente (-).

Material biológico. Las larvas y pupas de *C. quinquefasciatus* procedían de estanques artificiales del margen rural del distrito de La Yarada-Los Palos (Tacna, Perú) (**Figura 1**). Las larvas se mantuvieron hasta la emergencia de adultos dentro de cubetas de plástico protegidas con tela de tul, según el protocolo estándar (**Kauffman *et al.*, 2017**). En el

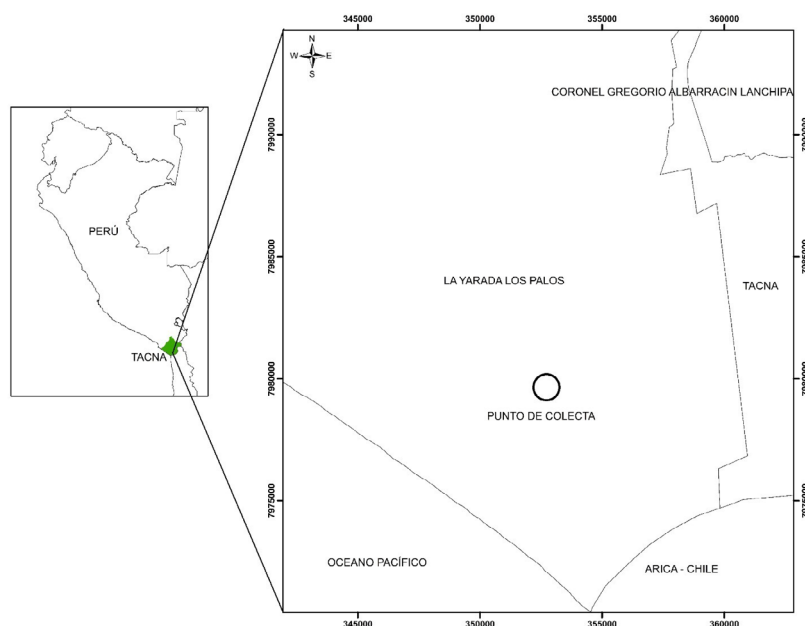


Figura 1. Mapa de ubicación del sitio de recolección de larvas de *C. quinquefasciatus*

laboratorio las variables abióticas registradas fueron las siguientes: temperatura de 20 a 23 °C, humedad relativa de 67 a 70 %, fotoperiodo de 12:12 h (claro: oscuro). Se criaron 300 larvas de mosquito en bandejas de plástico de 30,3 x 22,1 x 7,5 en un volumen de 3L alimentadas con el suministro diario de detrito vegetal mezclado con alimento estéril para peces en proporción de 1:1. La determinación taxonómica incluyó el análisis morfológico de las cerdas, el tamaño del sifón y la papila anal en larvas, los tergitos abdominales, la morfología y el color de las patas, y la disposición de las escamas cefálicas en las hembras adultas (**Consoli & Oliveira, 1994**).

Ensayo de mortalidad. Este se adecuó a partir de un modelo de bioensayo estándar para evaluar la potencia de sustancias derivadas de plantas (**Karunaratne et al., 2022; Ahmad et al., 2023**). Dado que se trataba de un estudio de base con el propósito de suministrar evidencias primarias de mortalidad de metabolitos proteicos, nuestro procedimiento no incluyó protocolos estrictos de vigilancia de la susceptibilidad con alguna cepa de referencia para detectar la resistencia a los insecticidas convencionales (**Grossman et al., 2020**). La revisión bibliográfica de reportes sobre el estado local del agua medido por estándares peruanos de calidad hídrica, demostró que esta es apta para el consumo de animales y humanos previa cloración (pH, coliformes, metales disueltos y otros) (**Chino, 2019**). Sin embargo, la ausencia total de reportes sobre la afectación ambiental por insecticidas se contraponen a la gran extensión de áreas agrícolas que al 2020 (**Alvarado et al., 2020**) se dedicaba a actividades económicas demandantes de cantidades considerables de agroquímicos debido al alto riesgo de que estos penetren los reservorios hídricos y, por ende, afecten a los invertebrados acuáticos. En ese contexto, en la evaluación de la mortalidad se emplearon larvas fl libres de insecticidas provenientes de la generación parental recolectada en campo (**WHO, 2005**).

La unidad experimental del ensayo consistió en un vaso de plástico estéril que contenía una solución bioinsecticida y 20 larvas del IV estadio temprano. En un volumen final de 150 ml, cada unidad experimental recibió tres réplicas de 0,05; 0,1; 0,3 y 0,5 mg/mL de ExtEtOH, ExtAlc y FPs, respectivamente, además de controles de agua potable sin cloro. Las concentraciones se determinaron con base en las experiencias previas con las semillas de la especie frente a *A. aegypti* (**Bobadilla, 2005**). La mortalidad registrada a las 24, 36, 48, 60 y 72 h fue acumulativa y se confirmó por inamovilidad corporal de los individuos al punzar el mesotórax con un estilete de extremo romo.

El porcentaje de mortalidad se corrigió empleando la fórmula de Abbott cuando la mortalidad en el control se situó entre el 5 y el 10 % (**Abbott, 1925**).

$$\% \text{ mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ mortalidad en tto} - \% \text{ mortalidad en grupo control}}{100 - \% \text{ mortalidad grupo control}} \times 100$$

Análisis estadístico

Los datos transformados a función probit evidenciaron al linealizarse la naturaleza sigmoide de la respuesta (relación dosis-respuesta) para estimar la concentración letal media (CL_{50}) y comparar la bioactividad (**Robertson, 2017**). El valor de probabilidad (p) del ajuste ($p > 0,05$) o del ajuste no adecuado ($p < 0,05$) de los datos se confirmó con la prueba de bondad de ajuste de ji al cuadrado (X^2)

La mortalidad larval se evaluó en seis ocasiones (hora) en función de la concentración y el tipo de sustancia larvívica. Estos criterios fundamentaron la elección del análisis de varianza de medidas repetidas (RM-ANOVA) para determinar las diferencias significativas ($p < 0,05$) y no significativas ($p > 0,05$) en las concentraciones de FP, ExtEtOH y ExtAc (variable independiente) y la mortalidad (variable dependiente) (**Hothorn, 2014**). Los supuestos del RM-ANOVA incluyeron la verificación de la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$, se acepta la H_0 de distribución normal de datos inferior a 50 sujetos por unidad experimental) (1) y la prueba de esfericidad de Mauchly para la igualdad de varianzas (**Ohba et al., 2013**). El paquete “rstatix” en la librería (rstatix) del RStudio sirvió para desarrollar el test de bondad de ajuste de X^2 (función `chisq_test()`), además de aplicar el RM-ANOVA (función `anova_test()`), el test de Shapiro-Wilk (función `shapiro`).

test(x), donde x es un vector numérico con datos, y la prueba de esfericidad de Mauchly, la cual se reportó automáticamente con la función `anova_test()` (Kasaambara, 2023). Todo el análisis estadístico se procesó con el *software* libre RStudio, ver. 4.3.1, para Windows (R Project for Statistical Computing).

Resultados

Fraciones proteicas

El cromatograma reveló la separación de cinco fracciones proteicas (FP) (1 – 5) (Figura 2). La FP1 (0,5 mg/ml), la FP2 (0,3 mg/ml) y la FP3 (0,5 mg/ml) mostraron concentraciones aceptables y se eligieron para la evaluación larvicida.

Análisis fitoquímico

Se observó un mayor número e intensidad de metabolitos en la fracción correspondiente a ExtEtOH (Tabla 1), características relevantes para su elección en las pruebas larvicidas, al igual que en el extracto de alcaloides. La extracción orgánica con CH₂Cl₂ reveló una

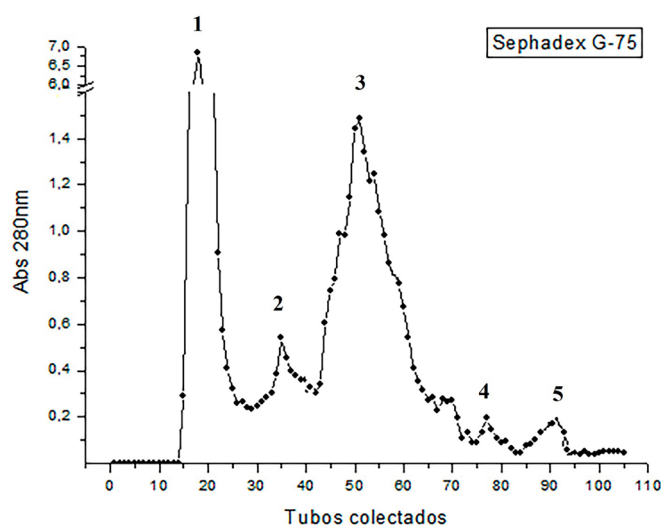


Figura 2. Cromatograma de exclusión molecular de semillas de *A. muricata* que revela cinco fracciones proteicas: 1.FP1; 2.FP2; 3.FP3; 4.FP4 y 5.FP5

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de las semillas de *A. muricata*

Solvente	Metabolitos	Intensidad ^a	Reactivos
EtOH	Alcaloides	++++	Dragendorff
		++++	Mayer
		++++	Wagner
	Lactonas	+	Baljet
	Flavonoides	++	Shinoda
	Aminoácidos	+++	Ninhidrina
	Cardenólidos/acetogeninas	++	Kedde
CH ₂ Cl ₂	Azúcares reductores	+	Felhing
		-	Liebermann-Burchard
H ₂ O	Saponinas	-	Espuma
	Taninos/fenoles	+	FeCl ₃

^a (++++) muy abundante, (+++) abundante, (++) moderado, (+) leve, (-) ausente.

EtOH: etanol al 96 %; CH₂Cl₂: diclorometano

intensidad nula de esteroides y triterpenos, o cualquier otro metabolito, y, juntamente con la extracción acuosa asociada con una débil o nula presencia de saponinas y fenoles, determinaron su exclusión de los ensayos larvicidas.

Actividad larvica

La FP3 mostró control larval a 0,5 mg/ml (7 %) en 12 h, en contraste con las FP1 y FP2, las cuales produjeron una mortalidad menor a 3 % entre las 24 y las 36 h. Si bien estas dos fracciones evidenciaron un control lento y progresivo hasta la finalización del ensayo (FP1: 25 % y FP2: 23 %), la FP3 tuvo un mayor efecto (70 %) en 72 h. La toxicidad de ExtEtOH (96 %) se evidenció en las primeras 24 h, con un patrón de control similar en potencia con la mínima concentración de 0,05 mg/ml, la cual indujo mortalidad desde el inicio del ensayo (12 %) hasta las 48 h (100 %). La mortalidad larval producida por ExtAlc fue, en general, inferior a la de ExtEtOH y la FP3 (**Tabla 2**).

El modelo probit ajustó los datos para el cálculo de las CL_{50} ($p > 0,05$, X^2) (**Tabla 3**). La disminución gradual de los valores de la CL_{50} fue inversa al incremento de los tiempos de exposición del bioensayo. Esto significa que mantener el patrón de mortalidad larval al 50 % requerirá de menor concentración de FP a medida que los tiempos de exposición aumentan. Al comparar las CL_{50} de las tres FP, la menor demanda gradual de FP3 entre las 36 h (0,66 mg/ml, $p = 0,166$) y las 72 h (0,28 mg/ml, $p = 0,227$) reveló mayor potencia larvica con respecto a las CL_{50} de FP1 y FP2. Sin embargo, la CL_{50} de ExtEtOH (0,03 mg/ml, $p = 0,976$) demostró un control larval superior a las 36 h que el de la FP3 y el ExtAlc (0,74 mg/ml, $p = 0,754$). El 100 % de mortalidad producida por ExtEtOH entre las 48 h y las 72 h imposibilitó el procesamiento de las CL_{50} , restricción que coincidió con las CL_{50} de FP y ExtAlc entre las 12 y las 24 h debido a la nula o baja mortalidad vectorial.

Análisis de la respuesta larvica frente a FP, ExtEtOH y ExtAlc

Factores de variación como la concentración, las fracciones proteicas y los extractos a lo largo de los seis tiempos de exposición implicaron respuestas larvicidas significativamente distintas ($p < 0,05$) (**Tabla 4**). Con ciertas excepciones en las que los valores de R^2 no se calcularon en FP1 y FP2 (**Figura 3a-c**), ni en ExtEtOH (**Figura 3d-f**) debido a registros extremos de mortalidad nula o total, el ajuste del modelo de regresión se explicó con el 50 % ($R^2 > 0,60$) de la variabilidad total. A lo largo del ensayo las sustancias ejercieron dos patrones de toxicidad: la asociada a la letalidad larval inmediata en ExtEtOH y la mediata en FP y ExtAlc. En el primer caso, la respuesta larvica iniciada a las 12 h ($R^2 = 0,75$) se incrementó hasta las 48 h ($R^2 = np$), momento que se refleja en la línea horizontal indicadora de máxima mortalidad (**Figura 3d-f**). En contraste, las respuestas larvicidas bajas y similares de FP y ExtAlc ($R^2: 0,50-0,89$) a partir de las 12 h tuvieron una evolución escalonada hasta un máximo a las 48 h ($R^2: 0,65-0,84$), con tendencia a la estabilización del control larval dentro de las 72 h ($R^2: 0,66-0,78$) (**Figura 3d-f**).

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *C. quinquefasciatus* entre las 12 y las 72 horas de exposición al extracto etanólico (ExtEtOH), el extracto de alcaloides (ExtAlc) y las tres fracciones proteicas (FP1, FP2 y FP3)

Tiempos (h)	12					24					36					48					60					72						
Concentraciones (mg/ml)	0,05	0,1	0,3	0,5	0,05	0,1	0,3	0,5	0,05	0,1	0,3	0,5	0,05	0,1	0,3	0,5	0,05	0,1	0,3	0,5	0,05	0,1	0,3	0,5	0,05	0,1	0,3	0,5	0,05	0,1	0,3	0,5
ExtEtOH	12	32	42	97	53	68	83	100	92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ExtAlc	0	0	3	3	0	12	15	18	0	23	25	30	0	30	32	38	0	32	37	42	0	32	37	43	0	32	37	43	0	32	37	43
FP1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	3	5	0	5	12	10	0	12	22	18	0	12	25	25	0	12	25	25	0	12	25	25
FP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	7	8	8	0	17	15	15	0	17	18	23	0	17	18	23	0	17	18	23
FP3	0	0	0	7	0	0	3	15	0	15	18	33	7	30	35	52	12	43	45	63	12	50	50	70	0	50	50	70	0	50	50	70
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3. CL₅₀ (mg/ml) del extracto etanólico (ExtEtOH), el extracto de alcaloides (ExtAlc), y las fracciones proteicas (FP1, FP2 y FP3) de semillas de *A. muricata* en *C. quinquefasciatus*

Tiempos (h)	Extractos				Fracciones proteicas					
	ExtEtOH	X ² (p)*	ExtAlc	X ² (p)	FP1	X ² (p)	FP2	X ² (p)	FP3	X ² (p)
12	0,25	0,231	np	np	np	np	np	np	np	np
24	0,02	0,169	0,97	0,351	np	np	np	np	np	np
36	0,03	0,976	0,74	0,754	1,05	0,500	1,12	0,764	0,66	0,166
48	np**	np	0,60	0,708	1,17	0,106	1,55	0,135	0,47	0,140
60	np	np	0,54	0,336	0,91	0,098	1,40	0,054	0,34	0,241
72	np	np	0,52	0,389	0,73	0,113	0,88	0,075	0,28	0,227

*X² (p): valor de probabilidad del test de bondad de ajuste de ji al cuadrado

**np: valor de ji cuadrado no procesado

Tabla 4. ANOVA de medidas repetidas de concentraciones (Cc.) extractos (Extr.) y fracciones proteicas (FP) en seis tiempos de exposición (12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas). Se muestran las diferencias significativas (p<0,05) en cada factor de variación.

	FV	SC	gl	CM	Razón F	p
12 h	Cc.	12,60	11	1,15	2,694	0,010
	Extr./FP	84,83	4	21,21	49,891	0,000
	Error	18,70	44	0,43		
	Total	116,13	59			
24 h	Cc.	20,37	11	1,85	4,302	0,000
	Extr./FP	141,92	4	35,48	82,412	0,000
	Error	18,94	44	0,43		
	Total	181,23	59			
36 h	Cc.	29,14	11	2,65	7,822	0,000
	Extr./FP	232,94	4	58,23	171,952	0,000
	Error	14,90	44	0,34		
	Total	276,98	59			
48 h	Cc.	24,02	11	2,18	9,729	0,000
	Extr./FP	202,23	4	50,56	225,217	0,000
	Error	9,88	44	0,22		
	Total	236,14	59			
60 h	Cc.	30,20	11	2,75	10,658	0,000
	Extr./FP	180,01	4	45	174,723	0,000
	Error	11,33	44	0,26		
	Total	221,54	59			
72 h	Cc.	34,09	11	3,10	11,803	0,000
	Extr./FP	173,84	4	43,46	165,487	0,000
	Error	11,56	44	0,26		
	Total	219,49	59			

FV: fuente de variación; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios

La evaluación independiente de cada sustancia indicó la tendencia de las larvas a responder diferencialmente a la potencia tóxica, con una mortalidad completa en ExtEtOH antes de las 48 horas (**Figura 4a**) en contraste con ExtAlc (**Figura 4b**) y FP3 (**Figura 4c**). Esta última, tomada como referente de mayor toxicidad de las fracciones proteicas, proporcionó, además, un esquema general de discreta respuesta inicial que se amplió gradualmente sin alcanzar la mortalidad total (72 h).

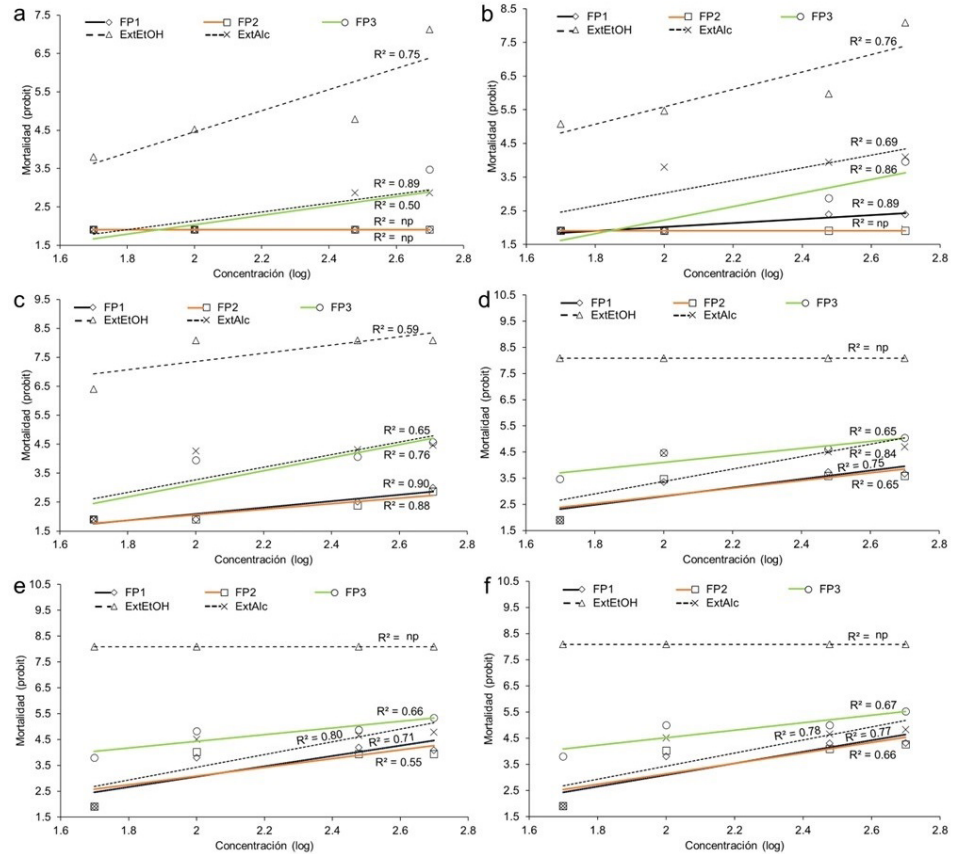


Figura 3. Actividad larvica basada en la concentración (log) del extracto etanólico (ExtEtOH), el extracto de alcaloides (ExtAlc) y tres fracciones proteicas (FP1, FP2 y FP3) Vs. mortalidad (probit) de *C. quinquefasciatus*. La mortalidad larval observada a las 12 h (a), 24 h (b), 36 h (c), 48 h (d), 60 h (e) y 72 h (f) se muestra en comparación con ExtEtOH y ExtAlc (líneas discontinuas), así como FP1 (línea sólida negra), FP2 (línea sólida anaranjada) y FP3 (línea sólida verde). Los coeficientes de determinación (R^2) se indican en el extremo de las líneas de tendencia y su no procesamiento se denota por np

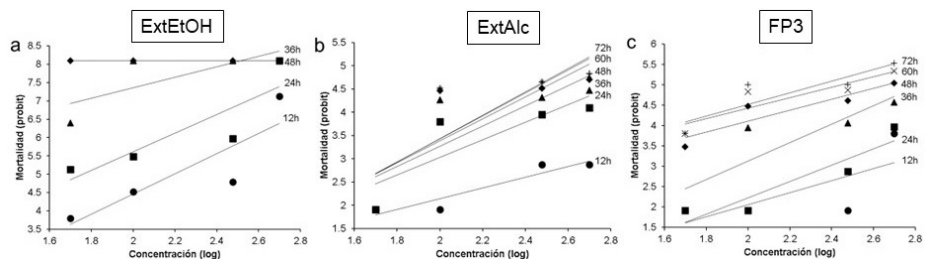


Figura 4. Diferencial tóxico del extracto etanólico ExtEtOH (a), el extracto de alcaloides ExtAlc (b) y la fracción proteica FP3 (c) en seis tiempos de exposición (12h, 24h, 36h, 48h, 60h y 72 h)

Discusión

Los distintos valores de mortalidad de las sustancias (ExtEtOH, ExtAlc y FP) sugieren dos mecanismos de toxicidad larval: la respuesta inmediata y la respuesta mediata. En la respuesta inmediata, las concentraciones, la parte vegetal y el solvente de extracción (etanol al 95 %) revelaron que el ExtEtOH ejerció un efecto temprano adverso sobre las larvas del culicido. La respuesta en las 12 h iniciales (12 - 97 %) fue total a las 48 h (**Tabla 2**), resultados que son congruentes con las pruebas de insecticidas en *A. aegypti* y *Anopheles* sp., incluso a partir de los 60 minutos de iniciado el bioensayo (**Bobadilla et al.**, 2002; **Bobadilla et al.**, 2005).

Una explicación del potente control larval se debería a los principios activos detectados en el tamizaje fitoquímico (**Tabla 1**). ExtEtOH se compone mayoritariamente de alcaloides, cardenólidos o acetogeninas y compuestos que contienen grupos aminos libres (aminoácidos, péptidos), como se ha reportado en trabajos previos (**Neglo et al.**, 2021; **Zubaidi et al.**, 2023). La intensa reacción observada en alcaloides puede indicar un marcado contenido de los clasificados como isoquinoleínicos, aporfínicos y protoberberínicos (**Moghadamtousi et al.**, 2015). A pesar de que su acción insecticida no ha sido completamente esclarecida en *A. muricata*, la citotoxicidad de estos compuestos en líneas celulares y el efecto inhibitorio a la acetilcolinesterasa encargada de la correcta transmisión neuromuscular (**Iranshahy et al.**, 2014), son hallazgos que sugieren la acción larvicida en *C. quinquefasciatus*.

La reacción positiva al reactivo de Kedde puede responder a la presencia de anillos α - β -insaturados o gamma-lactona saturados, los cuales revelan la presencia de acetogeninas (ACG) (**Aguilar-Hernández et al.**, 2020), lo que se relacionaría con la fuerte actividad larval en ExtEtOH, tal como se ha revelado en otro estudio (**Al Kazman et al.**, 2022). Por otro lado, la ninhidrina detectó una relativa intensidad de aminoácidos, aunque también demuestra su especificidad para péptidos y proteínas (**Friedman**, 2004). La presencia de estas moléculas sugiere la acción insecticida en ExtEtOH mediada por fitopéptidos tóxicos (orbitidos) inhibidores de proteasas (PIR ciclohexapéptido), lo que también se ha revelado en la extracción etanólica o metanólica de semillas de *A. muricata* (**Fisher et al.**, 2019).

El análisis de los principios activos contenidos en ExtEtOH sugiere que hay potencia larvicida de acción multiobjetivo en un patrón de interacción por contacto e ingesta. Conceptualmente la sinergia alude a valores muy altos de toxicidad en el efecto combinado de sustancias vegetales e insecticidas (**Mansour et al.**, 2010), en tanto que el control por contacto e ingesta en acetogeninas (**Costa et al.**, 2018;) y la neurotoxicidad de los alcaloides (**Riley-Saldaña et al.**, 2017) pueden ser indicadores del efecto combinado e independiente por interacción aditiva de los metabolitos (**Fong et al.**, 2017). Las evidencias que respaldan preliminarmente este postulado son la rápida mortalidad en ExtEtOH (**Tabla 2**), la relación dosis-respuesta (**Figura 4a**) y los mínimos valores de CL_{50} (**Tabla 3**), lo que sugiere una eficiente penetrabilidad de principios activos a los órganos blanco de la larva y su subsiguiente muerte. Aunque hay una posibilidad de interacción antagónica, como sucede en los biopesticidas (**Harte et al.**, 2024), ante el potente control larval de ExtEtOH se infiere una posible acción larvicida aditiva contra *C. quinquefasciatus* si ésta produce en concordancia con el modo de acción de los diversos metabolitos, comparada con la sola actividad del conjunto de alcaloides en ExtAlc y de las proteínas en FP. Sin embargo, la determinación exacta de las posibles interacciones de las sustancias en el extracto queda por resolverse en futuros análisis de fraccionamientos biodirigidos y modelamientos estadísticos (curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y factor de toxicidad) (**Mansour et al.**, 2011) como respaldo de la hipotética respuesta inmediata.

Una posible explicación de la acción mediata de las FP respondería a la bioactividad de los inhibidores de proteasas y lectinas en la vía digestiva (**Vandenborre et al.**, 2011). Los inhibidores de proteasas pertenecientes a la familia Kunitz y Bowman-Birk (BBI) reprimen la bioquímica de la serina, la cisteína, el aspartato o las metaloproteinasas, disminuyendo la actividad de proteasas digestivas en el mesenterio de *C. quinquefasciatus*.

con el subsiguiente efecto larvicida (Dantzger *et al.*, 2015; Ayana-Gayathri & Evans, 2018). Según estos antecedentes, los estudios más recientes de BBI extraídos de semillas de *A. muricata* han revelado la capacidad inhibitoria de las cisteína proteasas del mesenterio larval de *A. aegypti* (Aparna *et al.*, 2021), lo que se considera clave para entender el modo de acción similar de tales inhibidores en el aparato intestinal del vector en estudio. Otro grupo de proteínas circunscritas a lectinas confiere un efecto insecticida debido al enlazamiento químico con la membrana de borde en cepillo del epitelio intestinal y la membrana peritrófica en insectos (Lagarda-Díaz *et al.*, 2017). La letalidad de larvas de *A. aegypti* por deterioro y desorganización estructural del mesenterio sucede, al parecer, por la acción de las lectinas (Parthiban *et al.*, 2020a), en contraste con el control larval del contenido de fracciones proteicas. Ambos resultados se explican razonablemente por la ingestión de fuentes proteicas de alto peso molecular ya probada en experimentos *in vivo* e *in vitro* en larvas de culicidos (Al-Mehmadi & Al-Khalaf, 2010), lo cual valida nuestra hipótesis de la toxicidad digestiva de proteínas tóxicas que, análogamente, producen alteración del mesenterio en *C. quinquefasciatus*.

Por consiguiente, el efecto larvicida por ingesta de FP3 desde las 24 h, y en menor intensidad de FP1 y FP2 pasadas las 36 h (Figuras 3, 4), podría ser consecuencia de los daños en el aparato intestinal que se reflejan en la respuesta larvicida retardada. Mientras la alteración de la matriz peritrófica no haya sido evidenciada ultraestructuralmente en *C. quinquefasciatus*, es previsible que ocurra una respuesta enterotóxica muy semejante, tal como Parthiban *et al.* (2020b) lo plantearon en larvas de *A. aegypti*.

Conclusión

El extracto etanólico y de alcaloides y las fracciones proteicas de las semillas de *A. muricata* produjeron mortalidad en las larvas de *C. quinquefasciatus*. La letalidad del extracto etanólico fue inmediata y total hasta la mitad del tiempo del bioensayo, en contraste con el extracto de alcaloides y las fracciones proteicas, cuya toxicidad fue parcial y progresiva, extendiéndose al máximo tiempo de evaluación. La respuesta inmediata producida por el extracto etanólico puede explicarse por el efecto aditivo de contacto y digestivo de la bioactividad del amplio espectro de metabolitos, comparado con la sola acción digestiva del extracto de alcaloides y las fracciones proteicas de respuesta mediata.

Contribución de los autores

BM: concepción y diseño del proyecto, desarrollo de la parte experimental en el laboratorio, revisión de la literatura y escritura del manuscrito. JRL: monitoreo del desarrollo del proyecto, extracciones etanólicas, aislamiento de alcaloides. ECh: trabajo de campo relacionado con las larvas, aplicación de tratamientos. MB: planteamiento del diseño experimental, cálculos estadísticos, escritura del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses, ni haber obtenido apoyo financiero para la realización del trabajo o la publicación del manuscrito de ninguna institución pública o privada.

Referencias

- Abbott, W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Aguilar-Hernández, G., Vivar-Vera, M. D. L. Á., García-Magaña, M. D. L., González-Silva, N., Pérez-Larios, A., Montalvo-González, E. (2020). Ultrasound-Assisted extraction of total acetogenins from the soursop fruit by response surface methodology. *Molecules*, 25(5), 1139. <https://doi.org/10.3390/molecules25051139>
- Ahmad, A., Khan, G. Z., Ullah, M., Ahmed, N., Sohail, K., Ullah, I., Bukhari, N. A., Perveen, K., Ali, I., Li, K. (2023). Evaluation of different high doses aqueous plant extracts for the sustainable control of *Aedes aegypti* mosquitoes under laboratory conditions. *Journal of King Saud University - Science*, 35(11), 102991. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102991>

- Alegre, A., Iannacone, J., Carhuapoma, M.** (2017). Toxicidad del extracto acuoso, etanólico y hexánico de *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis* y *Chenopodium quinoa* sobre *Tetranychus urticae* y *Chrysoperla externa*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Science, ex Agro-Ciencia*, 33(3), 273-284. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902017005000705>.
- Alvarado, A., Capristán, P., Corahua, C., Ruiz, C., Velásquez, G.** (2020). Variación del área agrícola en el distrito La Yarada Los Palos, Tacna, Perú. *Espacio y Desarrollo*, 31(35), 99-120. <https://doi.org/10.18800/espacioydesarrollo.202001.004>
- Ardila, D.** (2014). Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de las plantas *Annona muricata*, *Annona cherimola* y *Physalis peruviana* en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de seno. [Tesis], Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- Al Kazman, B. S. M., Harnett, J. E., Hanrahan, J. R.** (2022). Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities of Annonaceae. *Molecules*, 27(11), 3462. <https://doi.org/10.3390/molecules27113462>
- Al-Mehmadi, R. M. & Al-Khalaf, A. A.** (2010). Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of King Saud University - Science*, 22(2), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.02.004>
- Aparna, N., Parambil, R. P., George, N., Meethal, K. V.** (2021). Toxicity of plant extracts containing trypsin inhibitor to the larvae of *Aedes aegypti*. *International Journal of Mosquito Research*, 8(3), 22-27. <https://doi.org/10.22271/23487941.2021.v8.i3a.533>
- Ayana-Gayathri, R. V. & Evans, D. A.** (2018). *Culex quinquefasciatus* Say larva adapts to temperature shock through changes in protein turn over and amino acid catabolism. *Journal of Thermal Biology*, 74, 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.03.016>
- Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., Omole, R. K., Johnson, R. M., Uthman, Q. O., Babalola, O. O.** (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1040901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>
- Bhandari, P., Pant, M., Patanjali, P. K., Raza, S. K.** (2016). Advances in Bio-Botanicals Formulations with Incorporation of Nanotechnology in Intensive Crop Management. En R. Prasad (Ed.), *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology* (pp. 291-305). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42990-8_14
- Bobadilla-Álvarez, M., Zavaleta-Espejo, G., Gil-Franco, F., Pollack-Velásquez, L., Sisniegas-González, M.** (2002). Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller “chirimoya” Y *A. muricata* Linnaeus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. *Revista Peruana de Biología*, 9(2), 64-73. <https://doi.org/10.15381/rpb.v9i2.2525>
- Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegas, M., Zavaleta, G., Mostacero, J., Taramona, L.** (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>
- Brandão-Costa, R.M.P., Araújo, V.F., Porto, A.L.F.** (2018). CgTI, a novel thermostable Kunitz trypsin-inhibitor purified from *Cassia grandis* seeds: Purification, characterization and termiticidal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(Pt B), 2296-306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.110>
- Brousett-Minaya, M.A., Baldasso, P.A., Marangoni, S.** (2013). Biochemical and Pharmacological Characterization of TLBbar, a New Serine Protease with Coagulant Activity from *Bothrops barnetti* Snake Venom. *Journal of Toxins*. 2013, 1-11, <https://doi.org/10.1155/2013/207170>
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC).** (2024). *Boletín Epidemiológico del Perú*. Ministerio de Salud. https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_202422_08_080424.pdf
- Chino, M.** (2019). Identificación y evaluación de impactos ambientales por afluencia turística en la playa Los Palos – Tacna. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Ambiental], Facultad de Ingeniería. Universidad Privada de Tacna.
- Consoli, R.A. & Oliveira, R.L.** (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz.
- Costa, M. D. S., De Paula, S. O., Martins, G. F., Zanuncio, J. C., Santana, A. E. G., Serrão, J. E.** (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.pmpp.2017.04.001>

- Coy, C., Parra, J., Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Revista Elementos*, 4(4), 32-39. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/207170>
- Dang, L. & Van Damme, E. J. M. (2015). Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 117, 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.020>
- Dantzer, M., Vasconcelos, I. M., Scorsato, V., Aparicio, R., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. (2015). Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. *Phytochemistry*, 118, 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.013>
- Durán-Ruiz, C. A., González-Esquinca, A. R., de-la-Cruz-Chacón, I. (2024). *Annonaceous acetogenins*: A comparative analysis of insecticidal activity. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 46, e-508. <https://doi.org/10.1590/0100-29452024508>
- Figuroa, D. P., Scott, S., González, C. R., Bizama, G., Flores-Mara, R., Bustamante, R., Canals, M. (2020). Estimating the climate change consequences on the potential distribution of *Culex pipiens* L. 1758, to assess the risk of West Nile virus establishment in Chile. *Gayana (Concepción)*, 84 (1), 46-53. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382020000100046>
- Fisher, M. F., Zhang, J., Berkowitz, O., Whelan, J., Mylne, J. S. (2019). Novel Cyclic Peptides in Seed of *Annona muricata* are Ribosomally Synthesized. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1167-1173 <https://doi.org/10.1101/647552>
- Fong, C. R., Bittick, S. J., Fong, P. (2018). Simultaneous synergist, antagonistic and additive interactions between multiple local stressors all degrade algal turf communities on coral reefs. *Journal of Ecology*, 106(4), 1390-1400. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12914>
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385-406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Grossman, MK., Oliver, SV., Brooke, BD., Thomas, MB. (2020). Use of alternative bioassays to explore the impact of pyrethroid resistance on LLIN efficacy. *Parasites Vectors*, 13(1),179. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04055-9>.
- Ha, T. V., Kim, W., Nguyen-Tien, T., Lindahl, J., Nguyen-Viet, H., Thi, N. Q., Nguyen, H. V., Unger, F., Lee, H. S. (2021). Spatial distribution of *Culex mosquito* abundance and associated risk factors in Hanoi, Vietnam. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(6), e0009497. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009497>
- Harte, S. J., Bray, D. P., Nash-Woolley, V., Stevenson, P. C., Fernández-Grandon, G. M. (2024). Antagonistic and additive effect when combining biopesticides against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Scientific Reports*, 14(1), 6029. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56599-w>
- Heng, M. Y., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Ong, E. S. (2013). Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.03.012>
- Hothorn LA. (2014). Statistical evaluation of toxicological bioassays – a review. *Toxicol Research*, 3(6), 418-32. <https://doi.org/10.1039/c4tx00047a>.
- Instituto Nacional de Salud. (2024). *Rotación de insecticidas para el control de Aedes aegypti*. Ministerio de Salud. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/6028979/5338114-revision-rapida-n-01-2024-rotacion-de-insecticidas-y-aedes-aegypti%282%29.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. (1999). *Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud*. Vol. 1. Ministerio de Salud. Lima. <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/20.500.14196/169>.
- Iranshahy, M., Quinn, R. J., Iranshahi, M. (2014). Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. *RSC Advances*, 4(31), 15900. <https://doi.org/10.1039/C3RA47944G>
- Karunarathne, P., Pocquet, N., Labbé, P., Milesi, P. (2022). BioRssay: An R package for analyses of bioassays and probit graphs. *Parasites & Vectors*, 15(1), 35.
- Kassambara, A. (2023). *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests (R package version 0.7.2)*. <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>.
- Kauffman, E., Payne, A., Franke, M., Schmid, M., Harris, E., Kramer, L. (2017). Rearing of *Culex* spp. and *Aedes* spp. Mosquitoes. *Bio Protocol*, 7(17), e2542. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2542>
- Kocyyigit, E., Kocaadam-Bozkurt, B., Bozkurt, O., Ağagündüz, D., Capasso, R. (2023). Plant Toxic Proteins: Their Biological Activities, Mechanism of Action and Removal Strategies. *Toxins*, 15(6), 356. <https://doi.org/10.3390/toxins15060356>

- Lagarda-Díaz, I., Guzmán-Partida, A., Vázquez-Moreno, L.** (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
- Mansour, S. A., Bakr, R. F., Hamouda, L. S.** (2010). Toxic and Synergistic Properties of Several Botanical Extracts against Larval and Adult Stages of the Mosquito, *Anopheles pharoensis*. *Biopesticides International*, 6(2), 129-145.
- Moghadamtousi, S., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H., Kadir, H.** (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>
- Monsour, S. A., Bakr, R. F., Mohamed, R. I., Hasaneen, N. M.** (2011). Larvicidal Activity of Some Botanical Extracts, Commercial Insecticides and their Binary Mixtures Against the Housefly, *Musca domestica* L. *The Open Toxicology Journal*, 4(1), 1-13. <https://doi.org/10.2174/1875414701104010001>
- Neglo, D., Tettey, C. O., Essuman, E. K., Amenu, J. D., Mills-Robertson, F. C., Sedohia, D., Boakye, A. A., Abaye, D. A.** (2021). Evaluation of the Modulatory Effect of *Annona muricata* Extracts on the Activity of Some Selected Antibiotics against Biofilm-Forming MRSA. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2021/9342110>
- Ohba, S., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., Takagi, M.** (2013). The Effect of Pyriproxyfen as a "Population Growth Regulator" against *Aedes albopictus* under Semi-Field Conditions. *PLoS ONE*, 8(7), e67045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067045>
- Pant, M., Dubey, S., Patanjali, P. K.** (2016). Recent Advancements in Bio-botanical Pesticide Formulation Technology Development. En Vijay Veer & R. Gopalakrishnan (Eds.), *Herbal Insecticides, Repellents and Biomedicines: Effectiveness and Commercialization* (pp. 117-126). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2704-5_7
- Parthiban, E., Arokiyaraj, C., Ramanibai, R.** (2020a). *Annona muricata*: An alternate mosquito control agent with special reference to inhibition of detoxifying enzymes in *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 110050. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110050>
- Parthiban, E., Arokiyaraj, C., Janarthanan, S., Ramanibai, R.** (2020b). Purification, characterization of mosquito larvicidal lectin from *Annona muricata* and its eco-toxic effect on non-target organism. *Process Biochemistry*, 99, 357-366. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.025>
- Rajput, D., Patil, U. K., Chauhan, D. N., Shah, K., Chauhan, N. S.** (2023). Potentials of natural products in vector-borne diseases management: Current and future perspectives. En *Natural Products in Vector-Borne Disease Management* (pp. 1-25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91942-5.00015-X>
- Reis, L. A. M., Silva, E. V. P. D., Dias, D. D., Freitas, M. N. O., Caldeira, R. D., Araújo, P. A. D. S., Silva, F. S. D., Rosa Junior, J. W., Brandão, R. C. F., Nascimento, B. L. S. D., Martins, L. C., Neto, J. P. N.** (2023). Vector Competence of *Culex quinquefasciatus* from Brazil for West Nile Virus. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 217. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8040217>
- Richards, S. L., Byrd, B. D., Reiskind, M. H., White, A. V.** (2020). Assessing Insecticide Resistance in Adult Mosquitoes: Perspectives on Current Methods. *Environmental Health Insights*, 14, 117863022095279. <https://doi.org/10.1177/1178630220952790>
- Riley-Saldaña, C. A., Cruz-Ortega, M. D. R., Martínez-Vázquez, M., De-la-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., González-Esquinca, A. R.** (2017). Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 72(11-12), 497-506. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0060>
- Robertson, J.L.** (2017). *Bioassays with arthropods*. 3th. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Rodrigues, A. M., Silva, A. A. S., Pinto, C. C. C., Santos, D. L. D., Freitas, J. C. C. D., Martins, V. E. P., Morais, S. M. D.** (2019). Larvicidal and Enzymatic Inhibition Effects of *Annona Muricata* Seed Extract and Main Constituent Annonacin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Pharmaceuticals*, 12(3), 112. <https://doi.org/10.3390/ph12030112>
- Seiber, J. N., Coats, J., Duke, S. O., Gross, A. D.** (2014). Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(48), 11613-11619. <https://doi.org/10.1021/jf504252n>

- Shocket, M. S., Verwillow, A. B., Numazu, M. G., Slamani, H., Cohen, J. M., El Moustaid, F., Rohr, J., Johnson, L. R., Mordecai, E. A.** (2020). Transmission of West Nile and five other temperate mosquito-borne viruses peaks at temperatures between 23°C and 26°C. *eLife*, 9, e58511. <https://doi.org/10.7554/eLife.58511>
- Valencia, E., Mac, D., Cuyos, M., Dueñas, R.** (2005). Extracción, identificación y evaluación de saponinas. *Biotempo*, 5, 31-36. <https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo/articulo/download/889/805/1958>
- Vandenborre, G., Smagghe, G., Van Damme, E. J. M.** (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72(13), 1538-1550. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.024>
- Vander-Does, A., Labib, A., Yosipovitch, G.** (2022). Update on mosquito bite reaction: Itch and hypersensitivity, pathophysiology, prevention, and treatment. *Frontiers in Immunology*, 13, 1024559. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1024559>
- World Health Organization (WHO).** (2014). *A global brief on vector-borne diseases*. World Health Organization. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/111008/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- World Health Organization (WHO).** (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/69101>
- Zamora-Natera, J.F., Bernal-Alcocer, A., Ruiz-López, M.** (2005). Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la Evaluación Antifúngica del Extracto Alcaloideo y Lupanina contra Fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 23(2), 124-129.
- Zubaidi, S. N., Mohd Nani, H., Ahmad Kamal, M. S., Abdul Qayyum, T., Maarof, S., Afzan, A., Mohmad Misnan, N., Hamezah, H. S., Baharum, S. N., Mediani, A.** (2023). *Annona muricata*: Comprehensive Review on the Ethnomedicinal, Phytochemistry, and Pharmacological Aspects Focusing on Antidiabetic Properties. *Life*, 13(2), 353. <https://doi.org/10.3390/life13020353>