

Actividad nematocida de extractos foliares de cuatro especies de *Piper* contra *Caenorhabditis elegans*

Nematicidal activity of four *Piper* species foliar extracts against *Caenorhabditis elegans*

Oscar Carmona-Hernández¹ ,
 María de Jesús Martínez-Hernández¹ ,
 María del Socorro Fernández² ,
 Jorge Molina-Torres³ ,
 Enrique Ramírez-Chávez³ ,
 Carolina Barrientos-Salcedo⁴ ,
 José Armando Lozada-García^{2*} 

¹Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Col. Zona Universitaria, CP. 91090. Xalapa, Veracruz, México.

²Facultad de Biología Xalapa, Universidad Veracruzana. Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Col. Zona Universitaria, CP. 91090. Xalapa, Veracruz, México.

³Departamento de Biotecnología y Bioquímica CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, Libramiento Norte Km 9.5. CP. 36500. Irapuato, Guanajuato, México.

⁴Facultad de Bioanálisis Veracruz, Universidad Veracruzana, Iturbide s/n, Col. Centro, CP. 91700. Veracruz, Veracruz, México.

*Autor de correspondencia: alozada@uv.mx

Artículo científico

Recibido: 03 de marzo 2021

Aceptado: 29 de octubre 2021

Como citar: Carmona-Hernández O, Martínez-Hernández MJ, Fernández MS, Molina-Torres J, Ramírez-Chávez E, Barrientos-Salcedo C, Lozada-García JA (2021) Actividad nematocida de extractos foliares de cuatro especies de *Piper* contra *Caenorhabditis elegans*. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 8(3): e2943. DOI: 10.19136/era.a8n3.2943

RESUMEN. Las especies del género *Piper* han mostrado potencial como biocidas naturales en diferentes organismos, lo cual es atribuible a la diversidad de metabolitos secundarios que sintetizan. Por lo cual, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto nematocida contra *Caenorhabditis elegans* de los extractos hidroalcohólicos, etanólicos y metanólicos de cuatro especies del género *Piper*. Los resultados mostraron que el extracto de *P. aduncum* fue el que presentó mayor actividad con una concentración letal media (CL₅₀) estimada en 0.650 mg mL⁻¹. Se determinaron perfiles cromatográficos por HPTLC y en GC-EIMS de los extractos de mayor actividad. Los metabolitos identificados fueron alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides, cumarinas y saponinas. En la GC-EIMS se identificaron 67 compuestos potenciales en los extractos etanólicos. Se concluye que el extracto etanólico de *Piper aduncum* presentó mayor actividad nematocida (CL₅₀ de 0.650 mg mL⁻¹) y el de mayor número de compuestos identificados preliminarmente.

Palabras clave: Bioactividad, CG-EIMS, CL₅₀, HPTLC, Probit.

ABSTRACT. *Piper* species have showed a great biological potential as natural biocide, in different organism. This is attributed to the diversity bioactive metabolites present in tissue. In this research we evaluated the nematicidal activity of different foliar extracts from *Piper* species against *Caenorhabditis elegans*. We evaluated the nematicide activity of the hydroalcoholic, methanolic and ethanolic extracts. Chromatography profile by HPTLC and GC-EIMS of the extracts with mayor activity was obtained. The ethanolic extract from *Piper aduncum* displayed higher activity as lethal concentration 50 (LC₅₀) estimated at 0.650 mg mL⁻¹. The bioactive metabolites identified were alkaloids, flavonoids, terpenoids, steroids and coumarins. The GC-EIMS determined 67 compounds in the higher activity extracts. Concluded the *P. aduncum* ethanolic extract has the higher activity and the mayor compounds diversity.

Key words: Bioactivity, CG-EIMS, HPTLC, LC₅₀, Probit.

INTRODUCCIÓN

El género *Piper* comprende cerca de 1 500 especies distribuidas en las zonas tropicales, siendo más abundantes en bosques húmedos premontanos y tierras bajas, de éstas, 136 se encuentran en México y 89 en Veracruz (Jaramillo *et al.* 2008, Villaseñor 2016). Las especies a este género representan un recurso biotecnológico importante en la búsqueda de compuestos bioactivos. Al respecto, se ha reportado que poseen actividad bactericida, insecticida, antiprotozoaria, fungicida, antihelmíntica y nematocida, atribuibles a sus más de 700 compuestos fitoquímicos identificados (Scott *et al.* 2008, Carmona-Hernández *et al.* 2016).

Los nemátodos fitopatógenos causan daño anualmente en aproximadamente un 7% de la producción agrícola mundial, lo cual equivale a 48 991.04 toneladas y en un estimado de 215 769.92 millones de dólares (Abd-Elgawad y Askary 2015). Algunos fitonemátodos responsables de los daños pertenecen a los géneros *Meloidogyne* y *Globodera* (Pehlivan *et al.* 2020), y son causantes de malformaciones en plantas de la familia Solanaceae, así como marchitamiento en algunas hortalizas y plantaciones de café (Del-Prado-Vera *et al.* 2018). Aunado a esto, muchas especies de estos géneros han mostrado resistencia o tolerancia a los nematocidas sintéticos (Roeber *et al.* 2013, Wram y Zasada 2020). Como alternativa al uso y aplicación de estos compuestos, se ha sugerido el uso de extractos naturales de plantas, en particular de las especies de *Piper* que se han evaluado como plaguicidas alternativos por su capacidad toxicológica. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil fitoquímico y efecto nematocida de los extractos foliares de cuatro especies de *Piper* contra *Caenorhabditis elegans*, nemátodo ampliamente utilizado como modelo en bioensayos de actividad biológica por su amplia capacidad de resistencia toxicológica frente a extractos naturales y su estrecha relación filogenética con nemátodos fitopatógenos (Wang *et al.* 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e identificación de especímenes de *Piper*

Las especies utilizadas fueron: *Piper amalago* L., *Piper aduncum* L., *Piper marginatum* Jacq., y *Piper umbellatum* L., las cuales se colectaron en los municipios de Coatepec (19.436502, -96.955859) y San Andrés Tlalnahuayocan (19.516908, -96.976465), en el estado de Veracruz, México. La identificación se realizó en el Herbario XAL del Instituto de Ecología, y con la base de acceso abierto de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Intermountain Regional Herbarium Network y Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem (Carmona-Hernández *et al.* 2014).

Preparación de extractos

Aproximadamente 1.5 kg de hojas de cada especie se secaron a 50 ± 5 °C en una estufa, para posteriormente obtener un polvo fino (Soberon *et al.* 2006). A partir de este, se realizaron extracciones a reflujo continuo con etanol (EtOH), metanol (MetOH) y etanol-agua 50:50 (EtOH:H₂O), en un equipo Soxhlet por 10 h continuas. Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida en un rotavapor a 50 °C y se estimó el rendimiento bruto (Moreno *et al.* 2000, Wiratno *et al.* 2009, Agyare *et al.* 2014).

Cultivo de *Caenorhabditis elegans*

La cepa N2 de *C. elegans* fue obtenida del laboratorio Evolution of Metabolic Diversity (LANGE-BIO) y se cultivó a temperatura promedio de 22 ± 2 °C, en cajas Petri con nematode medium growth (NMG) (17 g de agar bacteriológico, 2.5 g de peptona, 3 g de NaCl, 1 mL de CaCl₂ 1 M, 1 mL de MgSO₄ 1 M, 25 mL de KH₂PO₄ 1 mL de solución de colesterol de 5 mg mL⁻¹ en EtOH) e inoculadas previamente con *Escherichia coli* cepa OP50, la cual sirvió de alimento para los nemátodos (Katiki *et al.* 2011, Sant'anna *et al.* 2013).

Bioensayos de toxicidad

Se usaron nemátodos en instar larvar L4, para ello se sincronizaron por el método de blanqueamiento alcalino, los gusanos se extrajeron de las cajas Petri

con NMG y con solución Buffer M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 0.25 g MgSO₄ 7H₂O en un litro de agua) (Porta de la Riva *et al.* 2012, Agyare *et al.* 2014, Ow y Hall 2015).

Se realizaron los ensayos en microplacas de 96 pozos, en cada microcelda se depositaron 10 larvas L4, con diferentes concentraciones de los extractos aleatorizados más un control (Buffer M9). El diseño experimental consistió en cinco concentraciones equidistantes del extracto de cada especie disuelto en Buffer M9, con cinco repeticiones, cada una de ellas correspondía a una placa. La exposición fue por 24 h a temperatura 22 ± 2 °C, transcurrido el tiempo se contabilizó el número de organismos sobrevivientes, mediante la inspección visual con ayuda de un microscopio estereoscópico (Roh y Choi 2007, Katiki *et al.* 2011, Agyare *et al.* 2014).

Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar para cada extracto y se compararon entre las diferentes concentraciones, para determinar diferencias significativas y poder estimar una curva dosis-repuesta. Los resultados se expresaron en medias, graficadas en el programa Statistica 10. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y para todos los casos se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias. El cálculo de la CL₅₀ se estimó mediante el modelo de regresión lineal Probit, donde la concentración de cada extracto fue la variable independiente y la mortalidad de las larvas en porcentaje, la variable dependiente (Finney 1987, Jensen *et al.* 2006), para lo cual se utilizó el programa estadístico BioStat V5.

Caracterización fitoquímica preliminar y perfiles por HTPLC

Los metabolitos secundarios se identificaron por pruebas fitoquímicas preliminares, para alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas y triterpenos y esteroides, de acuerdo con una escala cualitativa (Domínguez 1979, Carmona-Hernández *et al.* 2014). Además, se realizaron perfiles químicos para alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos, cumarinas y saponinas usando el equipo High Per-

fomance Thin Layer Chromatography (HTPLC) (CAMAG Mutenz, Switzerland) (Lebot *et al.* 2014, Riffault *et al.* 2014). Las placas desarrolladas se digitalizaron con el software Wincats 1.4.3 y fueron tomadas con el equipo TLC Visualizar (CAMAG) a longitudes de onda de 360 y 260 nm, luz blanca visible superior e inferior. Con la ayuda del software Wincats 1.4.3 se estimaron los factores de retención (Rf) y se realizaron los perfiles gráficos mediante el modelado de bandas (Annegowda *et al.* 2013, Lebot *et al.* 2014, Upadhyaya *et al.* 2016).

Análisis por Cromatografía de Gases asociada a Espectrometría de Masas con ionización por Impacto Electrónico (CG-EIMS)

El análisis se realizó para los extractos de mayor actividad usando un equipo de GC-EIMS Agilent Technologies serie 7890A, acoplado a un detector selectivo de masas con ionización por impacto electrónico y separación por cuadrupolo de la marca Agilent Technologies serie 5979C. La separación de los compuestos se realizó en una columna DB1MS UI Agilent Technologies (60 m x 250 mm x 0.25 mm), se utilizó Helio de ultra alta pureza (99.9999) como gas acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹; la temperatura de inyección fue de 250 °C. La programación de la corrida fue: temperatura inicial 150 °C durante 3 min, 4 °C min⁻¹ a 300 °C por 13 min. Los compuestos fueron identificados mediante la base de datos NIST 11 (National Institute Standard and Technology) (Robles-Zepeda *et al.* 2006).

RESULTADOS

Actividad nematocida en *C. elegans*

En 11 de los 12 extractos evaluados se determinó actividad nematocida sobre *C. elegans*. Los extractos etanólicos fueron los de mayor actividad, seguidos de los hidroalcohólicos y los metanólicos. Los extractos etanólicos de las cuatro especies tuvieron mortalidades superiores al 90%. En los hidroalcohólicos la actividad fue variada, mientras que para *P. umbellatum* la mortalidad fue del 100% a 3 mg mL⁻¹, para *P. amalago* no superó el 40% de mortalidad. De los extractos metanólicos, el menos ac-

tivo fue el de *P. marginatum* con 0% de mortalidad, en contraste el extracto de *P. amalago* presentó una mortalidad mayor a 90% seguido de *P. umbellatum* (Figura 1).

La CL₅₀ estimada para el extracto etanólico de *P. aduncum* fue de 0.650 mg mL⁻¹, siendo la de mayor toxicidad con menor concentración. Seguida del extracto etanólico de *P. marginatum* con 0.836 mg mL⁻¹, *P. umbellatum* con una CL₅₀ de 1.389 mg mL⁻¹ y finalmente *P. amalago* tuvo una CL₅₀ de 2.962 mg mL⁻¹ (Tabla 1). Los extractos hidroalcohólicos presentaron actividad biológica en rangos no superiores al 80%; el de *P. marginatum* tuvo una CL₅₀ en 2.214 mg mL⁻¹, seguida de *P. umbellatum* con 3.101 mg mL⁻¹ y *P. amalago* con una CL₅₀ de 10.907 mg mL⁻¹. Para *P. aduncum* la concentración letal media estimada fue de 58.677 mg mL⁻¹, siendo el menos activo sobre *C. elegans*. Los extractos metanólicos fueron los de menor actividad comparados con los etanólicos y los hidroalcohólicos, donde las CL₅₀ para *P. aduncum* fue de 168.741 mg mL⁻¹, *P. umbellatum* de 4.630 mg mL⁻¹, *P. amalago* de 4.161 mg mL⁻¹ y *P. marginatum* no tuvo actividad en *C. elegans*.

Análisis fitoquímicos y perfiles por HPLC

Mediante las pruebas fitoquímicas preliminares se identificó la presencia de alcaloides y flavonoides en los 12 extractos, las cumarinas estuvieron ausentes en los extractos de *P. umbellatum*, los terpenos y esteroides no se detectaron en los extractos etanólicos, y las saponinas solo se identificaron en los extractos hidroalcohólicos (Tabla 2). Por HPLC se identificaron las las bandas correspondientes a Rf = 0.5 y 0.6 pertenecientes a alcaloides en los tres extractos de *P. amalago*. Los extractos de *P. marginatum* tuvieron presencia de alcaloides, con Rf similar en las bandas 0.5 y 0.6; y en *Piper umbellatum* fue la banda de Rf = 0.6 (Tabla 3).

Los flavonoides estuvieron ausentes en el extracto hidroalcohólico de *P. umbellatum*, en cambio para metanol y etanol se encontró una sola banda cada una con Rf = 0.739 y 0.900, respectivamente. Los flavonoides en *P. marginatum* se presentaron en los tres extractos. En *P. amalago*, el extracto etanólico

presentó el mayor número de bandas con Rf = 0.752, 0.876, 0.885. Finalmente, para los extractos de *P. aduncum* se determinó un Rf similar a 0.800.

Las cumarinas estuvieron presentes en todos los extractos, y el hidroalcohólico de *P. amalago* tuvo el mayor número de bandas con siete. Las saponinas fueron los compuestos de mayor abundancia después de los terpenos. El extracto etanólico de *P. aduncum* tuvo 14 bandas con Rf = 0.057, 0.17, 0.182, 0.287, 0.329, 0.44, 0.512, 0.514, 0.681, 0.746, 0.788, 0.795, 0.863, 0.969. Los terpenos estuvieron presentes en todas las muestras analizadas, estando mayormente representados en el extracto etanólico de *P. marginatum* con 12 bandas con Rf = 0.025, 0.096, 0.106, 0.179, 0.241, 0.267, 0.292, 0.429, 0.485, 0.559, 0.697, 0.774 (Tabla 3).

Análisis por GC-EIMS

En la caracterización química tentativa de los extractos etanólicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EIMS), se registró en su mayoría compuestos de origen terpénico y aceites esenciales, así como algunas cumarinas y compuestos fenólicos. Otros compuestos identificados tentativamente fueron cadaleno, δ cadineno, β copaeno, α -gurjuneno y calameneno para *P. umbellatum* (Tabla 4).

En *P. aduncum* se identificaron germacreno D, ácido (Z)-cinámico, γ sitosterol, estigmasterol, ácido mirístico y humuleno (Tabla 5); en *P. marginatum*: cadaleno, α calacoreno, aromandendreno, ácido cinámico, cis-muurool-3,5-dieno (Tabla 6); y para *P. amalago*: piranona, coumarano, piperonal y 2-nonadecano (Tabla 7). Finalmente, para todos los extractos analizados se identificaron tentativamente ácido esteárico, ácido linoleico y ácido palmítico.

DISCUSIÓN

La mayoría de los extractos de las especies de *Piper* mostraron actividad nematocida contra *C. elegans* a bajas concentraciones, lo que coincide con lo reportado para otras especies del mismo género (Atjanasuppat et al. 2009). Los extractos etanólicos de las cuatro especies mostraron ser más ac-

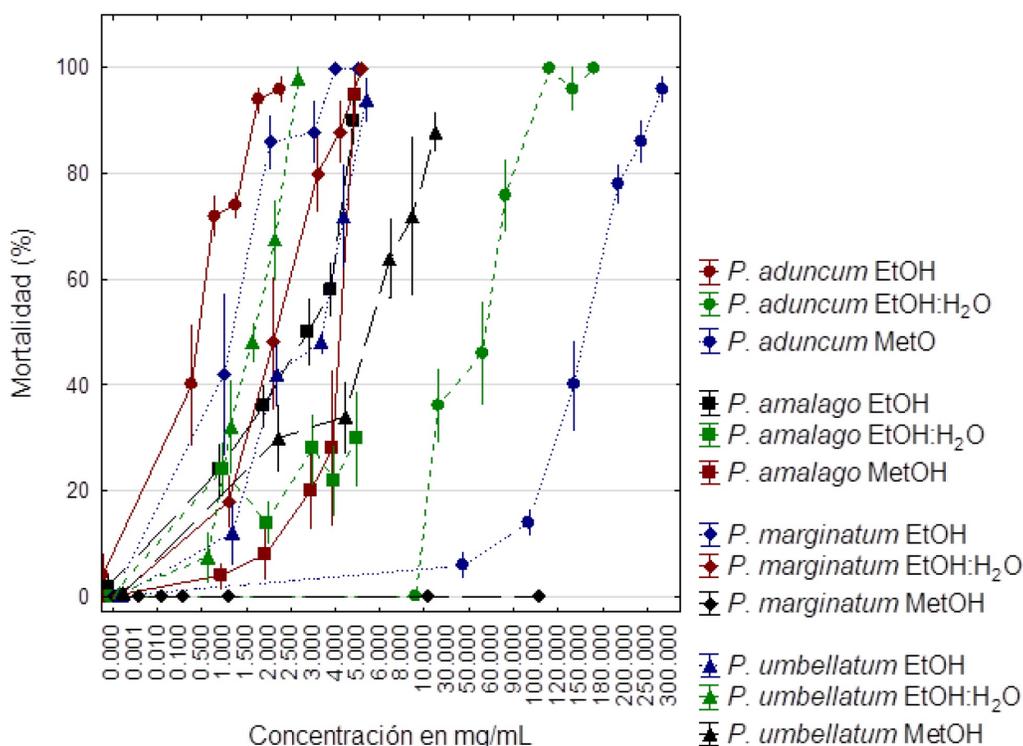


Figura 1. Mortalidad de *Caenorhabditis elegans*, después de 24 h de exposición a extractos de *Piper* spp. $P < 0.05$, a excepción del extracto metanólico de *P. marginatum* $p > 0.05$ EtOH-Etanol, MetOH-Metanol, EtOH:H₂O: Hidroalcohólico al 70%.

Tabla 1. Concentración letal media (CL₅₀) de los extractos de las especies de *Piper* en *C. elegans*.

	Extracto	Concentración Letal Media (CL ₅₀) mg mL ⁻¹	Error estándar
<i>P. aduncum</i>	EtOH	0.650	0.375
	H ₂ O+EtOH 50:50	58.677	10.782
	MetOH	168.741	17.120
<i>P. amalago</i>	EtOH	2.962	0.202
	H ₂ O+EtOH (50:50)	10.979	1.584
	MetOH	4.161	0.456
<i>P. marginatum</i>	EtOH	0.836	0.129
	H ₂ O+EtOH (50:50)	2.214	0.319
	MetOH	s/a	N/D
<i>P. umbellatum</i>	EtOH	1.389	0.165
	H ₂ O+EtOH (50:50)	3.101	0.449
	MetOH	4.630	1.545

s/a: sin actividad, N/D: no determinada. EtOH-Etanol, MetOH-Metanol, EtOH:H₂O: Hidroalcohólico al 70%.

tivos que lo reportado para extractos de *P. nigrum* y *P. betle* en *Schistosoma mansoni* y *Meloidogyne incognita* (Atjanasuppat et al. 2009, Wiratno et al. 2009, Dammini-Premachandra et al. 2014). El extracto etanólico de *P. aduncum* fue el de mayor actividad contra *C. elegans* con una CL₅₀ estimada en 0.650

mg mL⁻¹, similar a la reportada contra *Haemonchus contortus* y *Meloidogyne incognita*, además de tener efecto supresor en la formación de nódulos de plántulas de tomate infestadas con *Meloidogyne* sp. (Singh y Khuma 2006, Oliveira et al. 2014).

En contraste, se evidenció que el extracto

Tabla 2. Análisis fitoquímico preliminar de las cuatro especies de *Piper*.

Extracto	Compuesto Prueba Especie	Alcaloides			Flavonoides			Saponinas		Cumarinas	Terpenos y/o esteroides
		M	D	W	A	C	S	E	SL	C	LB
Etanólico	<i>P. aduncum</i>	+	++	++	+	+	+	-	n/d	+	-
	<i>P. marginatum</i>	+	+	++	+	++	+	-	n/d	+	-
	<i>P. amalago</i>	++	+++	+++	+++	++	+	-	n/d	+	-
	<i>P. umbellatum</i>	++	+	++	+	+	+	-	n/d	-	-
Hidroalcohólico	<i>P. aduncum</i>	+++	+++	+	++	+++	+++	+	n/d	+	+
	<i>P. marginatum</i>	+++	++	+	++	+++	+++	+	n/d	+	+
	<i>P. amalago</i>	+++	+++	++	+++	++	+++	+	n/d	+	+
	<i>P. umbellatum</i>	+	+	+	+	+	++	+	n/d	-	+
Metanólico	<i>P. aduncum</i>	++	+++	+	+	+++	+	-	n/d	+	++
	<i>P. marginatum</i>	++	+++	+	++	++	+	-	n/d	+	++
	<i>P. amalago</i>	++	+++	+	+	+++	+	-	n/d	+	++
	<i>P. umbellatum</i>	+	+	+	+	+	+	-	n/d	-	++

Alcaloides: M = Prueba de Mayer, D = Prueba de Drangendorff y W = Prueba de Wagner. Flavonoides: A = Prueba del H₂SO₄, C = Prueba del FeCl₂, S = Prueba de Shinoda. Saponinas: E = Prueba de la espuma, SL = Prueba de Lieberman. Cumarinas: C = Prueba de fluorescencia. Triterpenos y/o Esteroides: LB = Prueba de Lieberman-Bouchard. Intensidad: mayor +++, media++, baja +, nula - y n/d no determinada.

metanólico de *P. marginatum* no presentó actividad en dosis de 500 mg mL⁻¹, lo que coincide con lo reportado de que el extracto acuoso de esta especie no es efectivo contra *Meloidogyne incognita* (Vinueza et al. 2006).

Los extractos etanólicos en este estudio presentaron efecto biocida mayor que el indicado en otros estudios, en los cuales los plaguicidas sintéticos como el clorpirifó, carbosulfán y deltramina, tuvieron CL₅₀ estimadas en 19.4, 25.3 y 40 mg mL⁻¹, respectivamente (Wiratno et al. 2009, Sant'anna et al. 2013). Esta función se puede atribuir a los diferentes compuestos secundarios presentes en los extractos, como terpenos y/o esteroides, ácidos grasos, flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides-amidas, las cuales actúan a nivel de sistema nervioso central en insectos y nemátodos (Scott et al. 2008, Suzuki y Yamato 2018). Compuestos como el dilapiol son agentes clastogénicos cuyo isómero apiol se encontró presente en el extracto etanólico de *P. marginatum*, lo que puede explicar su efecto tóxico en *C. elegans* (Razzaghi-Abyaneh et al. 2007, Rafael et al. 2008). Además de taninos, saponinas, glucósidos cianogénicos y otros compuestos reportados en extractos crudos de *Piper* que pudieran ser causantes de este efecto (Ejele et al. 2012, Varsha y Sonali 2014, Kumar y Babu 2014, Shailesh 2015).

Los perfiles fitoquímicos determinados por HPTLC muestran que existe una diversidad de

metabolitos secundarios presentes. Se encontró similitud en los valores de R_f, con una banda de R_f = 0.8, reportada anteriormente para *P. nigrum*, la cual corresponde a un flavonoide; esto puede indicar que este compuesto es químicamente similar, es decir un homólogo o isómero del mismo (Valencia 1995). Las bandas de alcaloides o alcalamidas fueron escasas, y se encontraron en los extractos de tres especies de las cuatro en estudio, el compuesto más común fue el correspondiente al R_f = 0.6, que puede corresponder de manera similar a lo reportado por Rajopadhye et al. (2011), para una alcalamida presente en *P. nigrum* (pimenta negra), *P. nigrum* (pimienta blanca), *P. longum*, *P. retrofractum*, *P. cubeba* y *P. betle*.

Los compuestos mayoritarios en los extractos etanólicos fueron el ácido palmítico y el fitol, ya reportados también para *P. umbellatum*, *P. betle*, *P. aduncum*, *P. auritum*, *P. decurrens* y *P. methysticum* (Parmar et al. 1997, Lee et al. 2004, Hezekiah et al. 2015). El cadineno fue identificado en sus formas β y δ, el cual fue reportado para *P. marginatum*, *P. amalago* y *P. aduncum* (Ferraz et al. 2010, Sant'anna et al. 2015) en el caso de β cadineno se ha reportado para *P. nigrum* (Bagheri et al. 2014).

Los monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos identificados como α-gurjuneno, aromandendreno, aloaromadendreno, L-calameneno, cadaleno, pineno, β-cubebeno, germacreno D, piperotona, cariofileno, piperonal, α-cadinol, β-

Tabla 3. Valores de Rf de los perfiles fitoquímicos de los extractos foliares de las cuatro especies de *Piper* por HPTLC.

Extracto	Compuesto Fase móvil Revelador Especie	Alcaloides A D	Flavonoides F PN	Cumarinas C HS	Saponinas S AA	Terpenos T VS
Etanólico	<i>P. aduncum</i>		0.874	0.7,0.781, 0.886	0.057, 0.17, 0.182, 0.287, 0.329, 0.44, 0.512, 0.514 0.681, 0.746, 0.788, 0.795, 0.863, 0.969	0.04, 0.079, 0.119, 0.148, 0.184, 0.223, 0.268, 0.302, 0.707, 0.747, 0.93
	<i>P. marginatum</i>	0.572, 0.649	0.541, 0.813	0.656, 0.901	0.262, 0.37, 0.558, 0.614, 0.805, 0.951	0.025, 0.096, 0.106, 0.179, 0.241, 0.267, 0.292, 0.429, 0.485, 0.559, 0.697, 0.774
	<i>P. amalago</i>	0.52, 0.588, 0.646, 0.786	0.752	0.648, 0.714, 0.768	0.170, 0.284, 0.239, 0.444, 0.478, 0.666	0.023, 0.099, 0.123, 0.17, 0.197, 0.265, 0.487, 0.692
	<i>P. umbellatum</i>	0.588, 0.648	0.739	0.646, 0.719, 0.869	0.162, 0.390, 0.685, 0.694	0.018, 0.58, 0.104, 0.126, 0.179, 0.234, 0.250, 0.284, 0.703, 0.883
Hidroalcohólico	<i>P. aduncum</i>		0.885	0.793, 0.802, 0.878	0.514, 0.681, 0.795, 0.864, 0.961	0.084, 0.111, 0.262, 0.299, 0.692
	<i>P. marginatum</i>	0.595, 0.648	0.693	0.487, 0.648, 0.759	0.116, 0.167, 0.649, 0.805, 0.869, 0.954	0.094, 0.173, 0.212, 0.256
	<i>P. amalago</i>	0.593, 0.632, 0.744, 0.824	0.752, 0.876, 0.886	0.648, 0.722, 0.769, 0.837, 0.847, 0.898, 0.937	0.165, 0.284, 0.319, 0.377, 0.44, 0.67, 0.791, 0.979	0.019, 0.097, 0.123, 0.180, 0.199, 0.258, 0.267, 0.484, 0.561, 0.700
	<i>P. umbellatum</i>	0.588, 0.642		0.646, 0.712, 0.761, 0.863	0.397, 0.686, 0.786, 0.967	0.019, 0.052, 0.101, 0.179, 0.14, 0.253, 0.273, 0.297
Metanólico	<i>P. aduncum</i>		0.864	0.769, 0.878	0.180, 0.284, 0.321, 0.448, 0.519, 0.68, 0.802, 0.864, 0.973	0.132, 0.18, 0.234, 0.267, 0.695
	<i>P. marginatum</i>	0.638	0.898	0.661, 0.742, 0.797, 0.907	0.123, 0.173, 0.175, 0.346, 0.626, 0.957	0.052, 0.096, 0.177, 0.218, 0.712
	<i>P. amalago</i>	0.558, 0.637	0.747, 0.886	0.653, 0.727, 0.768	0.157, 0.289, 0.317, 0.383, 0.411, 0.485	0.019, 0.075, 0.114, 0.117, 0.197, 0.256, 0.417, 0.482, 0.697
	<i>P. umbellatum</i>	0.597, 0.592, 0.646, 0.648	0.900	0.646, 0.761, 0.866	0.390, 0.688	0.023, 0.060, 0.104, 0.179, 0.214, 0.272, 0.702

A: tolueno-cloroformo-etanol (28.5:57:41.5, v/v/v), F: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26, v/v/v/v), C: acetato de etilo-tolueno (1:1 v/v) 10% ácido acético, S: cloroformo-ácido acético-metanol-agua (60:32:12:8 v/v/v/v), T: tolueno-acetato de etilo (93:7 v/v); D: Dragendorff, PNP: productos naturales polietilenglicol, HS: hidróxido de sodio 10% en etanol, AA: anisaldehído acético (115°C), VS: vainillina sulfúrica (115°C).

copaeno, α -selineno y pirano estuvieron presentes en los extractos etanólicos analizados. Estos ya se han reportado para las especies de *P. aduncum*, *P. marginatum*, *P. amalago* y *P. umbellatum* (Ferraz et al. 2010, Souto et al. 2012, Oliveira et al. 2014, Brazão et al. 2014, Hezekiah et al. 2015). Por lo anterior se recomienda hacer estudios biodirigidos sobre los compuestos que pudieran ejercer el efecto tóxico o determinar si existe una asociación sinérgica entre los compuestos presentes.

CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos estudiados tienen

efecto nematocida sobre *C. elegans* a bajas concentraciones, e inclusive superior a lo reportado en la bibliografía para plaguicidas sintéticos comerciales. Los extractos de *Piper amalago* mostraron efecto tóxico sobre *Caenorhabditis elegans* por debajo de 10 mg mL⁻¹. Para las cuatro especies de *Piper*, los extractos metanólicos fueron los de menor actividad, seguidos de los hidroalcohólicos. El extracto metanólico de *P. marginatum* no tuvo actividad nematocida en las concentraciones evaluadas. Se determinó la presencia de alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides, saponinas y cumarinas de acuerdo con las pruebas fitoquímicas preliminares y los perfiles fitoquímicos por HPTLC. Por medio de la GC-EIMS

Tabla 4. Composición química del extracto etanólico de *Piper marginatum* determinado por GC-EIMS.

Pico	Compuesto	Tiempo de Retención	Área (%)	Similitud
11	(Z) -Muuroala-3,5-dieno	24.892	0.34	94
13	Ácido cinámico	25.935	0.48	93
14	α -Gurjuneno	26.605	0.67	99
15	Aloaromadendreno	27.337	0.66	91
17	Aromandendreno	27.849	0.3	95
18	α -Muuroleone	28.086	0.58	98
19	β -Cubebeno	28.288	0.25	95
21	Biciclogermacreno	28.678	2.8	93
23	L-Calameneno	29.068	0.81	90
24	δ -Cadineno	29.159	0.54	98
25	α -Calacoreno	29.549	0.27	96
30	β -Celineno	30.713	0.56	96
31	Apiol	30.963	6.9	90
34	α -Cadinol	32.128	0.74	93
35	Cadaleño	32.487	0.2	98
41	Pineno	36.157	0.93	93
44	Ácido palmítico	38.339	11.14	99
46	Nerolidol	39.643	0.41	91
48	Ácido linoleico	41.496	10.78	99
49	α -Ácido linoleico	41.569	6.85	99
50	Ácido esteárico	41.966	3.31	99
52	Dipropil sulfito	43.489	0.69	94
59	Eicosano	51.462	0.66	94
52	α -Tocoferol	52.266	0.85	94
65	Campesterol	57.13	0.83	91

Similitud: con el espectro reportado con máxima similitud en la base de datos NIST.

Tabla 5. Composición química del extracto etanólico de *Piper umbellatum* determinado por GC-EIMS.

Pico	Compuesto	Tiempo de Retención	Área (%)	Similitud
1	Pyranono	18.078	1.98	90
8	α -Gurjuneno	26.709	0.82	99
9	Aromandendreno	27.452	0.71	93
11	β -Cadineno	28.202	0.65	95
13	2,5-dimetil-3-metilen-hepta-1,5-dieno	28.787	3.06	90
14	β -Copaeno	29.122	0.51	92
15	Calameneno	29.183	0.81	90
16	δ -Cadineno	29.275	0.6	93
22	α -Selineno	31.305	1.24	95
23	2-isopropil-5-metil-9-metilen-biciclo-1-deceno (4.4.0)	31.951	0.45	90
24	α -Cadinol	32.255	0.85	98
25	Cadaleño	32.609	0.2	96
31	Ácido palmítico	38.485	12.2	99
32	Ácido palmítico, éster metil	39.064	0.29	96
34	Fitol	41.478	10.39	98
35	Ácido linoleico	41.654	11.57	99
36	α -Ácido linoleico	41.734	7.71	99
37	Ácido esteárico	42.160	3.17	99

Similitud: con el espectro reportado con máxima similitud en la base de datos NIST.

se confirmó que cuentan con una diversidad de compuestos en su mayoría de origen terpenico y fenolico, así como componentes de aceites esenciales.

AGRADECIMIENTOS

El autor del trabajo agradece al CONACYT por

la beca 408116 otorgada para la realización de estudios de posgrado. Así mismo al Dr. Rafael Montiel y la Dra. Hilda Ramos del Evolution of Metabolic Diversity-LANGEBIO-CINVESTAV-IPN, Irapuato por la donación de las Cepas N2 y OP50 de *C. elegans* y *E. coli*.

Tabla 6. Composición química del extracto etanólico de *Piper amalago* determinado por GC-EIMS.

Pico	Compuesto	Tiempo de Retención	Área (%)	Similitud
7	Pirano	18.066	1.38	93
8	Coumaran	20.278	1.21	93
9	Piperonal	23.417	0.47	91
21	Ácido palmítico	38.381	2.74	99
22	Ácido palmítico, éster metil	39.058	0.23	90
27	Fitol	41.502	18.77	96
28	Ácido linoleico	41.661	5.14	99
31	α -Ácido linoleico	42.191	0.39	95

Similitud: con el espectro reportado con máxima similitud en la base de datos NIST.

Tabla 7. Composición química del extracto etanólico de *Piper aduncum* determinado por GC-EIMS.

Pico	Compuesto	Tiempo de Retención	Área (%)	Similitud
6	Piperotona	21.583	0.56	96
9	Germacreno D	25.776	0.06	90
10	(Z)-ácido cinámico	26.050	0.13	95
11	Cariofileno	26.934	0.2	94
12	Humuleno	27.775	0.21	91
18	δ -adineno	29.275	0.19	95
40	Ácido mirístico	34.236	0.08	98
52	Ácido palmítico	38.503	3.07	99
53	Ácido palmítico, éster metil	39.064	0.08	95
55	Fitol	41.514	3.14	99
57	Ácido linoleico	41.788	1.53	98
58	α -Ácido linoleico	42.130	0.21	94
59	Ácido esteárico	42.192	0.78	99
69	Estigmasterol	47.433	0.03	95
73	γ -Sitosterol	51.151	0.43	91

Similitud: es el espectro reportado con máxima similitud en la base de datos NIST.

LITERATURA CITADA

- Abd-Elgawad, MM, Askary TH (2015) Impact of phytonematodes on agriculture economy. In Askary TH, Martinello PRP (Ed) Biocontrol agents of phytonematodes. CAB International. Wallingford, UK. pp. 3-49.
- Agyare C, Spiegler V, Sarkodie H, Asase A, Liebau E, Hensel A (2014) An ethnopharmacological survey and *in vitro* confirmation of the ethnopharmacological use of medicinal plants as anthelmintic remedies in the Ashanti region, in the central part of Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* 158: 255-263.
- Annegowda HV, Tan PY, Mordi MN, Ramanathan S, Hamdan MR, Sulaiman MH, Mansor SM (2013) TLC-Bioautography-guided isolation, HPTLC and GC-MS-assisted analysis of bioactives of *Piper betle* leaf extract obtained from various extraction techniques: *in vitro* evaluation of phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities. *Food Analytical Methods* 6: 715-726.
- Atjanasuppat K, Wongkham W, Meepowpan P, Kittakoop P, Sobhon P, Bartlett A, Whitfield PJ (2009) *In vitro* screening for anthelmintic and antitumor activity of ethnomedicinal plants from Thailand. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 475-482.
- Bagheri H, Manap MBA, Solati Z (2014) Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. *Talanta* 121: 220-228.
- Brazao MA, Brazao F, Maia JG, Monteiro M (2014) Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13: 517-526.

- Carmona-Hernández O, Fernández MS, Palmeros-Sánchez B, Lozada-García JA (2015) Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 30: 67-73.
- Carmona-Hernández O, Lozada-García JA, Martínez-Hernández MJ, Fernández MS, Torres-Pelayo VR (2016) *Piper* L. genus potential as natural biocide. Wulfenia Journal 23: 65-95.
- Dammini-Premachandra WTS, Mampitayarachchi H, Ebssa L (2014) Nematotoxic potential of Betel (*Piper betle* L.) (Piperaceae) leaf. Crop Protection 65: 1-5.
- Del-Prado-Vera IC, Franco-Navarro F, Godínez-Vidal D (2018) Plant parasitic nematodes and management strategies of major crops in Mexico. In: Subbotin S, Chitambar J (eds) Plant parasitic nematodes in sustainable agriculture of North America. Sustainability in plant and crop protection. Springer Cham, Switzerland. pp: 211-239
- Domínguez AX (1979) Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México. 281p.
- Ejele AE, Duru IA, Ojukwe CE, Iwu IC (2012) Phytochemistry and antimicrobial potential of basic metabolites of *Piper umbellatum*, *Piper guineense*, *Ocimum gratissimum* and *Newbouldia laevis* extracts. Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences 3: 09-14.
- Ferraz A, Balbino JM, Zini CA, Ribeiro VLS, Bordignon SAL, Von Poser G (2010) Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. Parasitology Research 107: 243-248.
- Finney DL (1987) Statistical method in biological assay: The biomathematics of disease. 3th Edition. Oxford University Press. London UK. 522p.
- Hezekiah AS, Labunmi L, Joseph OB (2015) Chemical composition and bioactivity of essential oil from *Piper umbellatum* against grain storage insects. Canadian Journal of Pure and Applied Sciences 9: 3621-3627.
- Jaramillo MA, Callejas R, Davidson C, Smith JF, Stevens AC, Tepe EJ (2008) A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron psbj-petA. Systematic Botany 33: 647-660.
- Jensen HR, Scott IM, Sims S, Trudeau VL, Arnason JT (2006) Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of *Piper nigrum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 1289-1295.
- Katiki LM, Ferreira JFS, Zajac AM, Masler C, Lindsay DS, Chagas ACS, Amarante AFT (2011) *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintic for veterinary use. Veterinary Parasitology 182: 264-268.
- Lebot V, Do TKT, Legendre L (2014) Detection of flavokavins (A, B, C) in cultivars of kava (*Piper methysticum*) using high performance thin layer chromatography (HPTLC). Food Chemistry 151: 554-560.
- Lee A, Richards J, Dodson CD (2004) Insolation, synthesis and evolutionary ecology of *Piper* Amides. In: Dyer LA, Palmer AD (ed). *Piper: A model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution*. Kluwer Academic-Plenum Publishers, New York USA. pp: 117-139.
- Moreno ME, González S, Acevedo L, Morales G, Betancur M, López JJ, Peláez CA (2000) *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida (El Neem- *Azadirachta indica*- un caso particular). Revista Colombiana de Entomología 62: 51-55.
- Oliveira GL, Vieira TM, Nunes VF, Ruas MdeO, Duarte ER, Moreira DdeL, Coelho KMAC, Kaplan M, Martins ER (2014) Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. Brazilian Journal of Pharmacognosy 24: 288-292.

- Ow MC, Hall SE (2015) A method for obtaining large populations of synchronized *Caenorhabditis elegans* dauer larvae. In: Strange K (ed) *C. elegans: Methods and applications*. Humana Press. New Jersey, USA. pp: 209-219.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Om D, Tyagi AK, Prasad J, Wengel TCE, Olsen, Boll PM (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 591-673.
- Pehlivan HD, Kaşkavalci G, Uludamar EBK, Toktay, H, Elekcioglu H (2020) Identification and prevalence of potato cyst nematodes and root-knot nematodes in the potato production areas of İzmir Province, Turkey. *Turkish Journal of Entomology* 44: 259-272.
- Porta de la Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Cerón J (2012) Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of Visualized Experiments* 64: 4019-4019.
- Rafael MS, Hereira-Rojas WJ, Roper J, Nunomura SM, Tadei WP (2008) Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research* 7: 772-781.
- Rajopadhye AA, Namjoshi TP, Upadhye AS (2012) Rapid validated HPTLC method for estimation of piperine and piperlongumine in root of *Piper longum* extract and its commercial formulation. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 1355-1361.
- Razzaghi-Abyaneh M, Yoshinari T, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Nagasawa H, Sakuda S (2007) Dillapiol and Apiol as specific inhibitors of the biosynthesis of aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71: 2329-2332.
- Riffault L, Destandau E, Pasquier L, André P, Elfakir C (2014) Phytochemical analysis of *Rosa hybrida* cv. "Jardin de Granville" by HPTLC, HPLC-DAD and HPLC-ESI-HRMS: Polyphenolic fingerprints of six plant organs. *Phytochemistry* 99: 127-134.
- Robles-Zepeda RE, Molina-Torres J, Lozoya-Gloria E, López MG (2006) Volatile organic compounds of leaves and flowers of *Montanoa tomentosa*. *Flavour and Fragrance Journal* 21: 225-227.
- Roeber F, Jex AR, Gasser RB (2013) Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites y Vectors* 6: 1-13.
- Roh JY, Choi J (2008) Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 483-489.
- Sant'anna V, Vommaro RC, de Souza W (2013) *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: Ultrastructural study of the effects of albendazole. *Experimental Parasitology* 135: 1-8.
- Scott IM, Jensen HR, Philogène BJR, Arnason JT (2008) A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65-75.
- Shailesh (2015) Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of *Syzygium aromaticum*, *Elettaria cardamomum* and *Piper nigrum* extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4: 85-89.
- Singh SK, Khurma UR (2006) Assessing the potential of kava (*Piper methysticum* Forst) and wild kava (*Piper aduncum* L.) as organic amendments for managing root-knot nematodes. *South Pacific Journal of Natural Science* 26: 33-38.
- Soberon GV, Rojas C, Saavedra J, Kato MJ, Delgado GE (2006) Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatrea saccharalis* (Lepidóptera, Pyralidae). *Revista Peruana de Biología* 13: 107-112.

- Souto RNP, Harada AY, Andrade EHA, Maia JGS (2012) Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology* 41: 510-517.
- Suzuki T, Yamato S (2018) Mode of action of piperovatine, an insecticidal piperamide isolated from *Piper piscatorum* (Piperaceae), against voltage-gated sodium channels. *Neurotoxicology* 69: 288-295.
- Upadhyaya V, Pai S, Ankad G, Hegde H (2016) Pharmacognostic screening of *Piper trichostachyon* fruits and its comparative analysis with *Piper nigrum* using chromatographic techniques. *Pharmacognosy Magazine* 12: 152-158.
- Valencia OC (1995) *Fundamentos de fitoquímica*. Trillas. México. 235p.
- Varsha H, Sonali S (2016) Studies on qualitative phytochemical analysis of selected species of *Piper*. *International Journal of Life Sciences Special Issue A2*: 156-158.
- Villaseñor JL (2016) Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 559-902.
- Vinueza PSM, Crozzoli R, Perichi G (2006) Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de plantas para el control del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. *Fitopatología Venezolana* 19: 26-31.
- Wang K, Luo C, Liu H, Xu J, Sun W, Zhou L (2012) Nematicidal activity of the alkaloids from *Macleaya cordata* against certain nematodes. *African Journal of Agricultural Research* 7: 5925-5929.
- Wiratno TD, Van den Bergb H, Riksend JAG, Rietjensb IMCM, Djiwantia SR, Kammengad JE, Murk AJ (2009) Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *The open natural products journal* 2: 77-85.