

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE NUEVE PIPERÁCEAS (*Piper spp.*) EN *Drosophila melanogaster*

Óscar CARMONA-HERNÁNDEZ¹, María del Socorro FERNÁNDEZ², Beatriz PALMEROS-SÁNCHEZ² y José Armando LOZADA GARCÍA^{2*}

¹Licenciatura en Biología, Facultad de Biología Xalapa, Universidad Veracruzana, Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Col. Zona Universitaria C. P. 91000, Xalapa, Veracruz, México

²Laboratorio de Toxicología, Facultad de Biología Xalapa, Universidad Veracruzana, Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Col. Zona Universitaria C. P. 91000, Xalapa, Veracruz, México

*Autor de correspondencia: jalozadamx@yahoo.com.mx

(Recibido noviembre 2013; aceptado abril 2014)

Palabras clave: bioinsecticidas, toxicidad, CL₅₀, bioensayos

RESUMEN

Actualmente, el uso indiscriminado de los plaguicidas sintéticos ha generado problemas graves en el ambiente, por lo que es necesario investigar y desarrollar alternativas nuevas para el control de las plagas. Las plantas son una fuente importante de compuestos nuevos que por su actividad biológica puedan sustituir los plaguicidas de origen sintético. La toxicidad asociada a los extractos de varias especies del género *Piper* se ha relacionado con una actividad insecticida alta. La naturaleza química de los compuestos con actividad biológica presente en los extractos vegetales se determina mediante un análisis fitoquímico preliminar, el cual se complementa demostrando su efectividad en varios modelos biológicos. En este trabajo se evaluó la actividad insecticida de los extractos etanólicos foliares de 9 especies de *Piper* colectadas en la región central del estado de Veracruz. Las muestras de hojas se extrajeron en Soxhlet hasta agotamiento y los extractos obtenidos se concentraron en rotavapor a presión reducida. La concentración letal media (CL₅₀) se determinó en adultos de *Drosophila melanogaster* cepa Canton S mediante el ensayo de discos de contacto. El análisis fitoquímico preliminar determinó la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenos y/o esteroides en las nueve especies, mientras que las cumarinas solo se encontraron en *P. hispidum*, *P. umbellatum*, *P. nudum* y *P. psilorhachis*; no se detectó la presencia de saponinas en ninguna de las especies estudiadas. Todos los extractos tuvieron actividad insecticida contra *D. melanogaster*. *P. amalago* presentó la actividad más alta (CL₅₀ de 27.95 mg/mL) seguida de *P. umbellatum* (34.54), *P. aduncum* (54.20), *P. nudum* (176.77), *P. diandrum* (261.72), *P. psilorhachis* (625.6), *P. hispidum* (761.98) y *P. sanctum* (4704.93). Las especies con mayor potencial para utilizar sus extractos como bioinsecticidas son: *P. amalago*, *P. aduncum* y *P. umbellatum* ya que son tóxicas en concentraciones bajas.

Key words: bioinsecticides, toxicity, LC₅₀, bioassays

ABSTRACT

Currently, indiscriminate use of synthetic pesticides has caused serious problems in the environment, so it is necessary to research and develop new alternatives for the

control of pests. Plants, for its biological activity, are an important source of new compounds that can replace synthetic pesticides. The toxicity associated with extracts from various species of the genus *Piper* has been associated with a high insecticidal activity. The chemical nature of the compounds with biological activity present in the plant extracts is carried out through a preliminary phytochemical characterization, which complemented demonstrating their effectiveness in various biological models. In this work it's evaluated the insecticidal activity of the ethanol extracts leaf of 9 *Piper* species collected in the central region of the State of Veracruz. Leaf samples were extracted in Soxhlet until exhaustion and the obtained extracts were concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure. The medium lethal concentration (LC₅₀) was determined in adult *Drosophila melanogaster* Canton S strain by contact disks test. The phytochemical analysis determined the presence of alkaloids, flavonoids, terpenes and/or sterols in the nine species, while the coumarins only was found in *P. hispidum*, *P. umbellatum*, *P. nudum* and *P. psilorhachis*. It does not detect the presence of saponins in any of the studied species. All extracts were insecticidal activity against *D. melanogaster*; *P. amalago* presented the highest activity (LC₅₀ of 27.95 mg/mL) followed by *P. umbellatum* (34.54), *P. aduncum* (54.20), *P. nudum* (176.77), *P. diandrum* (261.72), *P. psilorhachis* (625.6), *P. hispidum* (761.98) and *P. sanctum* (4704.93). It is concluded that the species with the greatest potential to use its extracts as bioinsecticides are *P. amalago*, *P. umbellatum* and *P. aduncum* since shown to be toxic at lowest concentrations.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años con la finalidad de erradicar o contener plagas que afectan de manera directa las plantaciones de interés comercial y alimenticio se han utilizado en forma masiva agroquímicos, los cuales si bien es cierto han disminuido la pérdida de cosechas por insectos también han dañado el ambiente y la salud humana (Cobos-Gasca *et al.* 2011). En los últimos años se han buscado otras alternativas para disminuir el uso de los plaguicidas en la agricultura; investigaciones recientes han demostrado que las plantas producen una variedad amplia de compuestos con actividad insecticida (Scott *et al.* 2004, 2008, Sathish Kumar y Maneemegalai 2008, Vinayaka *et al.* 2009). La toxicidad contra insectos se debe principalmente a la presencia de metabolitos secundarios que son sintetizados por las plantas y que tienen un papel importante en su defensa contra herbivoría, entre otras funciones. Gracias a estas propiedades, muchas especies podrían ser usadas como agentes importantes en el control biológico (Sepúlveda-Jiménez *et al.* 2003).

La búsqueda de metabolitos secundarios con actividad insecticida resulta ser adecuada para sustituir el uso de plaguicidas convencionales y dañinos (Ramírez y Lacasaña 2001). Con el fin de encontrar alternativas potenciales para el control de plagas, se propone la exploración de nuevos compuestos orgánicos que sean ecológicamente aceptables, eficientes, biodegradables y que presenten seguridad

relativa para los organismos benéficos (Lizana-Rojas 2005). Las especies del género *Piper* son adecuadas ya que se ha observado que tienen efecto insecticida, bactericida, fungicida, genotóxico y mutagénico en organismos nocivos (Celis *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2008, 2009, Scott *et al.* 2008).

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar las propiedades insecticidas en *Drosophila melanogaster* de los extractos etanólicos de hojas de 9 especies del género *Piper* nativas de la región centro del estado de Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e identificación de especímenes de diferentes especies del género *Piper*

El material botánico fue colectado en municipios ubicados en la región centro del estado de Veracruz (**Fig. 1**), entre los meses de diciembre del 2011 y enero-febrero del 2012. Las especies de *Piper* fueron identificadas por comparación con ejemplares previamente identificados.

Preparación de extractos etanólicos

Aproximadamente, 1 kg de hojas de cada especie fueron secadas a 60 ± 5 °C en una estufa; posteriormente fueron molidas hasta obtener un polvo fino (Soberon *et al.* 2006), el cual se extrajo sucesivamente con etanol al 96 % (EtOH) en un equipo Soxhlet hasta agotar la muestra. El extracto obtenido

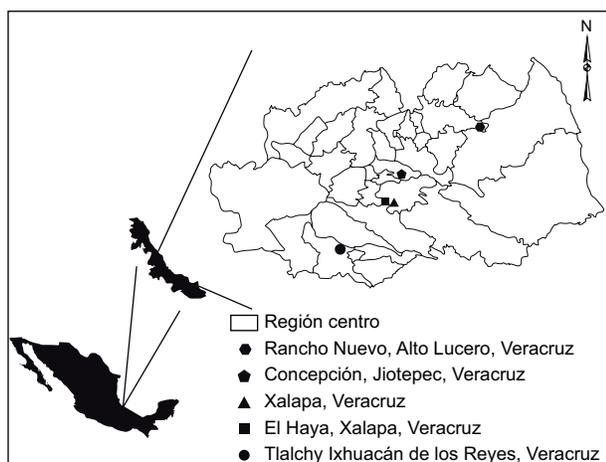


Fig. 1. Localización de los sitios de colecta de las nueve especies de *Piper* estudiadas en este trabajo (Imagen ArcView 3.2)

fue concentrado a presión reducida en rotavapor y a partir del peso seco se estimó el rendimiento bruto (Moreno *et al.* 2000, Gómez-López 2008).

Caracterización fitoquímica preliminar

La identificación de los metabolitos secundarios presentes en las piperáceas en estudio se realizó mediante pruebas cualitativas para alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas y triterpenos y/o esteroides (Domínguez 1979).

Cultivo de *Drosophila melanogaster*

La cepa Canton S de *D. melanogaster* utilizada en este estudio fue donada por el Drosophila Stock Center de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. El cultivo se mantuvo en la Facultad de Biología-Xalapa utilizando medio estándar: agar-agar 10 g, harina de maíz 105.5 g, azúcar no refinada 75 g, levadura de cerveza en polvo 66 g; disueltos en 1250 mL de agua. La mezcla es hervida por 15 minutos y posteriormente se le agregaron 4 mL de ácido propiónico y 4 mL de nipagin al 10 % en etanol ó 4 mL de ácido propiónico el 8.5 % en etanol, a 25 °C y con ciclos de luz oscuridad 12/12 (Moreno *et al.* 2000, Granados *et al.* 2002, Cazares-Hernández 2006, Stocker y Gallent 2008).

Bioensayos en *Drosophila melanogaster*

Para determinar la actividad insecticida de los extractos etanólicos foliares de cada especie se realizó el ensayo de discos de contacto (4 cm de diámetro) de acuerdo con método reportado por Cazares-Hernández (2006), Araque *et al.* (2007) y Bonilla-Ramírez *et al.* (2011). Para cada ensayo se tomaron 10 adultos de 2 a 5 días de vida sin sexar y

se colocaron en los frascos que contenían los discos impregnados con 200 mL del extracto etanólico foliar. Para cada especie se realizaron tres réplicas por ensayo de cinco concentraciones de su extracto: 20, 40, 60, 80 y 100 mg/mL para *P. umbellatum*; 30, 60, 90, 120 y 150 mg/mL para *P. amalago*; y 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL para *P. aduncum*, *P. auritum*, *P. nudum*, *P. diadrum*, *P. psilorhachis*, *P. hispidum* y *P. sanctum*.

Análisis estadísticos

El cálculo de la CL_{50} se estimó mediante el modelo de regresión lineal Probit, donde la concentración fue la variable independiente y la mortalidad en porcentaje la variable dependiente (Finney 1987, Jensen *et al.* 2005, 2006) utilizando el programa estadístico BioStat 2009. Los resultados se graficaron con el programa Statistica 8.

RESULTADOS

Rendimiento bruto de los extractos etanólicos de hojas de piperáceas (porcentaje)

Los rendimientos más altos, ligeramente arriba del 30 %, se obtuvieron en los extractos de *P. auritum* y *P. amalago*, mientras que *P. aduncum* presentó el rendimiento menor con 19.4 %. En el resto de los extractos los porcentajes de rendimiento estuvieron en el rango de 21 a 28 %.

Caracterización fitoquímica preliminar

La determinación de la presencia de metabolitos secundarios en las nueve especies estudiadas (**Cuadro I**), estableció que los flavonoides, alcaloides y triterpenos y/o esteroides, aunque en cantidades diferentes, se encuentran en las nueve especies, mientras que las cumarinas solo se detectaron en cuatro extractos. Las saponinas no se pudieron determinar en ningún de los extractos con las pruebas utilizadas.

Actividad insecticida

La actividad insecticida mayor se presentó en el extracto de *P. amalago* con una CL_{50} de 27.9 mg/mL, seguido de *P. umbellatum* con una CL_{50} de 32.54 mg/mL. El extracto de *P. aduncum* presentó una CL_{50} de 54.2 mg/mL seguida de *P. auritum* con CL_{50} de 174.2 mg/mL (**Cuadro II**). Las CL_{50} del resto de los extractos fueron: para *P. nudum* de 176.7 mg/mL, para *P. diadrum* y *P. psilorhachis* de 261.72 y 625.68 mg/mL, respectivamente. Los extractos de las especies con menor actividad fueron *P. hispidum*

CUADRO I. RESULTADOS DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR REALIZADO A LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE LAS NUEVE ESPECIES DE PIPERACEAS ESTUDIADAS EN ESTE TRABAJO. SE MUESTRAN LOS COMPUESTOS DETERMINADOS Y LAS PRUEBAS UTILIZADAS

| Especie/Compuesto | Prueba | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----------|-----|-----------|-------------------------|--|
| | Alcaloides | | | Flavonoides | | | Saponinas | | Cumarinas | Terpenos y/o esteroides | |
| | M | D | W | A | C | S | E | L | F | LB | |
| <i>P. aduncum</i> | + | +++ | ++ | + | +++ | ++ | - | n/d | - | +++ | |
| <i>P. hispidum</i> | + | +++ | +++ | + | + | + | - | n/d | + | ++ | |
| <i>P. sanctum</i> | + | +++ | ++ | ++ | +++ | + | - | n/d | - | + | |
| <i>P. diandrum</i> | + | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | - | n/d | - | + | |
| <i>P. amalago</i> | + | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | - | n/d | - | +++ | |
| <i>P. nudum</i> | + | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | - | n/d | + | + | |
| <i>P. psilorhachis</i> | + | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ | - | n/d | + | ++ | |
| <i>P. auritum</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, F = FeCl₂, S = prueba de Shinoda.

Saponinas: E = Prueba de la espuma, L = Prueba de Lieberman.

Cumarinas: C = Prueba de Fluorescencia.

Triterpenos y/o Esteroides: LB = Prueba de Lieberman-Bouchard.

Intensidad: mayor +++, mediana++, baja +, nula - y n/d no determinada.

CUADRO II. CONCENTRACIONES LETALES MEDIAS (CL₅₀) DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE LAS NUEVE ESPECIES DE *Piper* OBTENIDAS EN *D. melanogaster*

| Especie | CL ₅₀ |
|------------------------|------------------|
| <i>P. aduncum</i> | 54.20 |
| <i>P. hispidum</i> | 761.98 |
| <i>P. amalago</i> | 27.95 |
| <i>P. nudum</i> | 176.77 |
| <i>P. psilorhachis</i> | 625.68 |
| <i>P. auritum</i> | 174.18 |
| <i>P. umbellatum</i> | 32.54 |
| <i>P. diandrum</i> | 261.72 |
| <i>P. sanctum</i> | 4704.93 |

con una CL₅₀ de 761.98 mg/mL y *P. sanctum* con 4704.93 mg/mL.

En la **figura 2** se observa la comparación de las medias de mortalidad de los extractos sobre *D. melanogaster* a las diferentes concentraciones, donde se puede observar que existen diferencias en cuanto al grado de toxicidad.

DISCUSIÓN

Los porcentajes de rendimiento bruto obtenidos en los extractos de las nueve especies estudiadas fueron superiores a los presentados por Gómez-López (2008), que reporta rendimientos máximos de 11.01 %

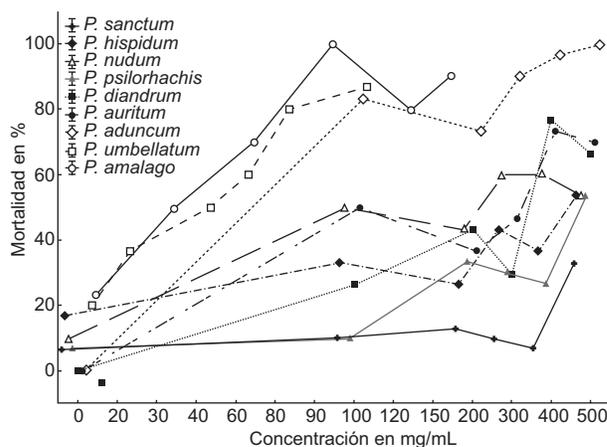


Fig. 2. Curvas de la actividad insecticida en *D. melanogaster* de los nueve extractos alcohólicos de piperáceas. Los datos de la mortalidad se obtuvieron 24 horas después de estar en presencia de los extractos crudos

en *P. jacquemontianum* y 9.11 % en *P. umbellatum*. Estos rendimientos se encuentran muy por debajo de los obtenidos con *P. auritum* y *P. amalago*, los cuales sobrepasaron el 30 %.

La caracterización fitoquímica preliminar determinó la presencia de alcaloides, flavonoides y triterpenos y/o esteroides en todas las muestras, como ya se había reportado para otros extractos alcohólicos de *Piper* (Cruz *et al.* 2006, Gómez López 2008, Rivera-Sagastume 2008, Mosquera *et al.* 2009, Chakraborty y Shah, 2011). Las cumarinas sólo se encontraron en

los extractos de *P. hispidum*, *P. nudum*, *P. psilorhachis* y *P. umbellatum*, esta diferencia puede estar influenciada por factores ecológicos (Granados-Sánchez *et al.* 2008), aunque se requiere hacer más ensayos para entender a que se deben estas; además, hay que tener en cuenta que las pruebas utilizadas son cualitativas, no cuantitativas. La presencia de las saponinas no se pudo determinar en ningún extracto, sin embargo, no se descarta su presencia ya que se han encontrado en *P. donell Smith* y *P. obliquom* (Cruz *et al.* 2006, Rivera-Sagastume 2008).

Las nueve especies estudiadas presentaron actividad insecticida; los nueve extractos etanólicos tienen efecto letal sobre *D. melanogaster* en mayor o menor grado. *P. amalago* fue la especie más tóxica, lo cual resulta interesante ya que se han reportado alrededor de treinta alcaloides diferentes en esta especie, las cuales son los compuestos con mayor actividad biológica para este género (Parmar *et al.* 1997, do Nascimento *et al.* 2012). *P. umbellatum* y *P. auritum*, consideradas hermanas (Jaramillo *et al.* 2008), también presentan amidas, compuestos con efecto citotóxico e inhibitorio de varias enzimas. Estas amidas están presentes en otras especies, como es el caso de *P. sanctum*; sin embargo, en este estudio, esta especie fue la que tuvo menor actividad, lo que quizá se deba a la cantidad en la que se encuentran.

Ya se ha reportado que los metabolitos secundarios pueden variar de una especie a otra, aunque estén genéticamente relacionadas. Un caso ya estudiado es el de *P. nigrum* que ha mostrado toxicidad en *D. melanogaster* y en otros organismos gracias a una amida conocida como piperina, la cual es muy tóxica (Scott *et al.* 2004, 2005c, 2008, Jensen *et al.* 2005, 2006). *P. guineense*, una especie relacionada, también produce este compuesto y aunque no tiene la misma actividad, en cambio tiene actividad repelente (Asawalan, 2006, Jaramillo *et al.* 2008).

P. aduncum, la especie cuya toxicidad la coloca en tercer lugar de las más tóxicas, también se sabe que tiene efecto insecticida en organismos plaga como *Diatraea saccharalis* (gusano del maíz), *Musca domestica* (mosca común) y *Solenopsis sp.* (hormigas de fuego), tanto cuando se usa su aceite esencial como con extractos (Barillas y Guerra 2002, Misni *et al.* 2008).

Los resultados obtenidos muestran que las especies estudiadas tienen toxicidad diferente, pero las tres especies más tóxicas puedan ser usadas en el control de plagas. Un caso bien estudiado es el de *P. nigrum*, el cual se usa como bioinsecticida para el control de plagas en algunas partes de Canadá y en Europa, donde se ha observado que su uso es factible

dado que no representa riesgos ambientales ni a la salud humana (Scott *et al.* 2004, 2005a,b,c, 2008).

CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos foliares con rendimientos elevados fueron los de *Piper auritum* con 31.4 % y *P. amalago* con 30.9 %. El extracto de *P. aduncum* fue el que tuvo el rendimiento más bajo con 19.4 %; el resto estuvo entre estos rangos.

En los extractos de las nueve especies estudiadas se demostró la presencia de alcaloides, flavonoides, triterpenos y/o esteroides. Las cumarinas solo se encontraron en cuatro especies: *P. hispidum*, *P. umbellatum*, *P. nudum* y *P. psilorhachis*. En ninguna especie se detectó la presencia de saponinas.

Los extractos de *P. amalago*, *P. umbellatum* y *P. aduncum* fueron los que presentaron mayor toxicidad con CL_{50} de 27.95, 32.54 y 54.20 mg/mL, respectivamente. En contraste, el extracto de *P. sanctum* fue el menos tóxico con una CL_{50} de 4704.9 mg/mL (4.7 g/mL).

Al menos tres especies de las nueve estudiadas, *P. amalago*, *P. umbellatum* y *P. aduncum*, podrían ser usadas como bioinsecticidas ya que sus extractos mostraron ser más tóxicos a concentraciones bajas; además, los rendimientos obtenidos están por arriba de los porcentajes reportados. Por ejemplo, para *P. amalago* la CL_{50} es de 27.95 mg/mL y dio un rendimiento de 30.9 %

AGRADECIMIENTOS

Al *Drosophila* Stock Center de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Dra. Patricia Ramos Morales por la donación de la cepa Cantos S para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Araque P., Casanova H., Ortiz C., Henao B. y Peláez C. (2007). Insecticidal activity of caffeine aqueous solutions and caffeine oleate emulsions against *Drosophila melanogaster* and *Hypothenemus hampei*. J. Agric. Food Chem. 55, 6918-6922.
- Asawalan E.F. (2006). Insecticidal and repellent properties of *Piper guineense* seed oil extract for the control of maize weevil, *Sitophilus zeamais*. EJEAFCh. 5, 1389-1394.

- Barillas Morataya J.G. y Guerra Morán P.G. (2002). Evaluación de propiedades insecticidas de *Piper aduncum* L. en *Diatraea saccharalis* (Fabricius) bajo condiciones de laboratorio. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Earth, 41 p.
- Bonilla-Ramírez L., Jiménez-Del Río M. y Vélez-Pardo C. (2011). Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. *Biometals* 24, 1045-1057.
- Cazares-Hernández J. (2006). Actividad en *Drosophila melanogaster* y *Sitophilus zeamais* (Insecta) de aceites esenciales de plantas usadas para combatir insectos en Hidalgo. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma de Hidalgo.
- Celis A., Mendoza C., Pachón M., Cardona J., Delgado W. y Cuca L.E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26, 97-106.
- Chakraborty D. y Shah B. (2011). Antimicrobial, anti-oxidative and anti-hemolytic activity of *Piper betel* leaf extracts. *I. J Pharm. Pharmaceu. Sci*, 3, 192-199.
- Cobos-Gasca V.M., Barrientos-Medina R. y Chi Novelo C. (2011). Los plaguicidas y su impacto sobre la fauna silvestre de la Península de Yucatán. *Biociencias* 2, 4-9.
- Cruz S., Gómez A., García V., Álvarez L., Cáceres A., Morales J., Cobar O., Samoyo C., Orozco R. y Gaitan I. (2006). Caracterización de aceites esenciales y extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB). Universidad de San Carlos de Guatemala. Informe de Investigaciones, 53 p.
- do Nascimento J.C., de Paula V.F., David J.M. y David J.P. (2012). Occurrence, biological activities and ¹³C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). *Quim. Nova* 35, 2288-2311.
- Domínguez A.X. (1979). Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México, D.F.
- Finney D.J. (1987). Cap. 18: Assay based on quantal responses. En: *Statistical Methods in Biological Assay*. 3rd ed. Griffin and Company. 469-490 p.
- Gómez-López A.L. (2008). Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hojas de tres especies de Piperaceas (*P. Jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*). Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 73 p.
- Granados H.N., Sáez J., Robles C., Vázquez L.F., Moreno M.E., Acevedo J.M., Peláez C.A. y Callejas R. (2002). Evaluación de la actividad insecticida de extractos de *Piper grande* Vahl (Piperaceae) en el modelo biológico: *Drosophila melanogaster*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medilín*. 55, 1601-1613.
- Granados-Sánchez D., Ruíz-Puga P. y Barrera-Escorcia H. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14, 51-63.
- Jaramillo M.A., Callejas R., Davidson C., Smith J.F., Stevens A.C. y Tepe E.J. (2008). A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. *Systematic Botany* 33, 647-660.
- Jensen H.R., Scott I.M., Sims S., Trudeau V.L. y Arnason J.T. (2005). Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of *Piper nigrum*. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1289-1295.
- Jensen, H.R. Scott I.M., Sims S.R., Trudeau V.L. y Arnason J.T. (2006). The effect of a synergistic concentration of a *Piper nigrum* extract used in conjunction with pyrethrum upon gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 15, 329-339.
- Lizana-Rojas D.R. (2005). Elaboración y Evaluación de extractos del fruto de *Melia azedarach* L. como insecticida natural. Memoria para optar por el Título Profesional de Ingeniero Forestal. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. 57 p.
- Misni N., Salaiman S. y Othman H. (2008). The repellent activity of *Piper aduncum* Linn (Family: Piperaceae) essential oil against *Aedes aegypti* using human volunteers. *J. Trop. Med. Parasitol.* 31, 63-69.
- Moreno M.E., González S., Acevedo L., Morales G., Betancur M., López J.J. y Peláez C.A. (2000). *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida (neem-*Azadirachta indica*) un caso particular. *Rev. Colombiana de Entomología* 26, 51-55.
- Mosquera O.M., Lagos A.M. y Niño J. (2009). Evaluación de la actividad insecticida *in vitro* de extractos vegetales contra la broca del café. *Recursos Naturales y Ambiente* 58, 45-50.
- Parmar V.S., Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E. y Boll P.M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46, 591-673.
- Pereira Bezerra D., Jaqueline Moura D., Moreira Rosa R., Carvalho de Vasconcellos M., Romano e Silva A.C., Odorico de Moraes M., Rocha Silvera E., Sousa Lima M.A., Pegas Heriques J.A., Veras Costa-Lotufo L. y Saffi J. (2008). Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkalamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutat. Res.* 652, 164-174.
- Pereira Bezerra D., Vasconcellos M.C., Machado M.S., Villela I.V., Rosa R.M., Moura D.J., Pessoa C., Moraes

- M.O., Silveira E.R., Lima M.A.S., Aquino N.C., Henriques J.A.P., Saffi J. y Costa-Lotufo L.V. (2009). Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. *Mutat. Res.* 677, 8-13.
- Ramírez J.A. y Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor.* 4, 67-75.
- Rivera Sagastume D.D. (2008). Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género *Piper* y evaluación de la actividad citotóxica. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala. 58 p.
- Sathish Kumar M. y Maneemegalai S. (2008). Evaluation of larvicidal effect of *Lantana camara* Linn against mosquito species *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Advances Biol. Res.* 2, 39-43.
- Scott I.M., Jensen H., Nicol R., Lesage L., Bradbury R., Sánchez-Vindas P., Poveda L., Arnason J.T. y Philogène B.J.R. (2004). Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. *J. Econ. Entomol.* 97, 1390-1403.
- Scott I.M., Gagnon N., Lesage L., Philogène B.J.R. y Arnason J.T. (2005a). Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Economic Entomol.* 98, 845-855.
- Scott I.M., Helson B.V., Strunz G.M., Finlay H., Sánchez-Vindas P.E., Poveda L., Philogène B.J.R. y Arnason J.T. (2005b). Efficacy of *Piper nigrum* (Piperaceae) extract for control of insect defoliators of forest and ornamental trees. *Can. Entomol.* 139, 513-522.
- Scott I.M., Puniani E., Jensen H., Livesay J.F., Poveda L., Sánchez-Vindas P., Durst T. y Arnason J.T. (2005c). Analysis of *Piperaceae* germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts. *J. Agri. Food Chem.* 53, 1907-1913.
- Scott I.M., Jesen H.R., Philogène B.J.R. y Arnason J.T. (2008). A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem. Rev.* 7, 65-75.
- Sepúlveda-Jiménez G., Porta-Ducoing H. y Rocha-Sosa M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mexicana de Fitopatología* 21, 355-363.
- Soberón G.V., Rojas C., Saavedra J., Kato M.J. y Delgado G.E. (2006). Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *Rev. Peruana Biol.* 13, 107-112.
- Stocker H. y Gallant P. (2008). Getting started: an overview on raising and handling *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* 420, 27-44.
- Vinayaka K.S., Swarnalatha S.P., Preethi H.R., Surabhi K.S., Prashith Kekuda T.R. y Sudharshan S.J. (2009). Studies on *In vitro* antioxidant, antibacterial and insecticidal activity of methanolic extract of *Abrus pulchellus* Wall (Fabaceae). *African J. Basic App. Sci.* 1, 110-116.