

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA

Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE LAS PARTES AÉREAS DE
Peperomia blanda PARA LA BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON POTENCIAL
APLICACIÓN FITOPESTICIDA

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química,
como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial

Jackson Israel Argüello Rivera

Tutores

Ph.D Ana Francis Carballo Arce

Dr. José Antonio Guerrero Analco

Asesor0

Ph.D Humberto Trimiño Vásquez

Heredia

2020

“Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial”

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

| | <u>NOMBRE</u> | <u>FIRMA</u> |
|----------------------------|---------------|--------------|
| Decana (o) | _____ | _____ |
| Director (a) de la escuela | _____ | _____ |
| Tutor (a) | _____ | _____ |
| Asesor | _____ | _____ |
| Asesor | _____ | _____ |
| Lector | _____ | _____ |
| Proponente | _____ | _____ |

Reconocimientos

Dedico mis reconocimientos al Departamento de Bienestar Estudiantil de la Universidad Nacional, ente que desde que fui nuevo ingreso hasta este momento me apoyó con diferentes becas como la Beca 10, Beca Omar Dengo, Beca Luis Felipe Gonzales, Beca por excelencia académica Yolanda Oreamuno, Beca de Estudiante Asistente, Beca de Estudiante Asistente Graduado. Así mismo por haber contado con el financiamiento del Programa Intercambio Estudiantil para una pasantía internacional en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Red de Estudios Moleculares Avanzados (REMAv) del Instituto de Ecología A.C. (INECOL), y en el Laboratorio de Ecología Evolutiva de la Facultad de Biología de la Universidad Veracruzana, Veracruz, -México.

Soy originario de una familia humilde que me he visto beneficiado por los programas de becas de la Universidad Nacional por lo que estaré enormemente agradecido por el resto de mi vida, porque no solo se trata del motivo económico sino del orgullo y la satisfacción que me ha producido el verme respaldado en los momentos difíciles. Gracias por confiar en mí y apoyarme en mi formación académica y profesional.

Dedicatoria

A mis Padres:

Jackson Argüello Solórzano

y

Leonor Rivera Solano

Agradecimientos

De las más de 22 000 palabras que conforman este trabajo, no es sino esta sección la que más me emociona escribir, porque no hay nada que me llene más que el agradecer a todas las personas involucradas en este proceso.

Gracias Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, familia gracias por apoyarme en todas mis decisiones, proyectos y creer en mí. El desarrollo de esta tesis no lo puedo describir como algo sencillo, pero disfruté cada etapa de este proceso, y no fue simplemente porque me dispuse a hacerlo, sino porque mis amigos y seres queridos estuvieron dándome ánimo, apoyo y consejos.

A la PhD. Ana Francis Carballo Arce por aceptarme como su estudiante para realizar esta investigación y hacer posible que realizara una estancia de investigación en el INECOL A.C. en Veracruz México.

Al Dr. José Antonio Guerrero Analco por abrirme las puertas para trabajar en la Red de Estudios Moleculares Avanzados (REMAV) específicamente en el laboratorio de Química de Productos Naturales (QPN) que él dirige, también por supervisar todo el desarrollo experimental de mi investigación y fungir como Co-Director de tesis.

A la M. en C Laura Stefany Licon Velázquez por ser incondicional y ayudarme en todo en cuanto pudo durante mi estancia en el INECOL A.C., desde capacitarme para realizar ensayos de evaluación de actividad insecticida hasta ayudarme a conseguir hospedaje en la ciudad.

Al M. en C Óscar Carmona Hernández por brindarme hospedaje en su casa mientras estuve en México, enseñarme a realizar ensayos de evaluación de la actividad nematocida, darme recorridos gratuitos por la ciudad y múltiples consejos, pero sobre todo por la grata amistad.

Al Dr. José Armando Lozada García, responsable del Laboratorio de Ecología Evolutiva de la Universidad Veracruzana por permitirme utilizar las instalaciones para realizar los ensayos sobre evaluación de la actividad nematocida.

Al Dr. Juan Luis Monribot Villanueva, técnico del área de QPN del INECOL por su apoyo y asesoría para la realización de los análisis de UPLC-MS-QToF y UPLC-MS-QqQ.

A la Dra. Ofelia Ferrera Rodríguez, técnica titular del área de Microbiología Ambiental por capacitarme y permitirme realizar los ensayos de evaluación de actividad fungicida en el laboratorio a su cuidado, con el visto bueno de los investigadores responsables del área.

A la C. Yeli Yessenia León Wilchez, la Q.F.B. Diana Lizzet Murrieta León y al C. Efraín Pucheta por la ayuda en la realización de los ensayos de evaluación de la actividad fungicida y amistad.

Al personal del Herbario XAL del INECOL: curador Dr. Sergio Avendaño Reyes y técnico Biól. Carlos Manuel Durán Espinosa por la determinación taxonómica de la planta estudiada en este trabajo de tesis.

Al Dr. Luis Arturo Ibarra, Investigador Cátedra CONACyT en INECOL, Titular responsable del área de Entomología Molecular por el asesoramiento y apoyo para la realización de los bioensayos de evaluación de la actividad insecticida.

A la Biol. Guadalupe Hernández Cervantes por el apoyo técnico y consejos para el trabajo en el Laboratorio de Entomología Molecular.

A los compañeros del Laboratorio de QPN por el apoyo, amistad y consejos brindados durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Mónica Ramírez Vázquez, investigadora asociada y coordinadora de la unidad de microscopía avanzada y a la Ing. Agrón. Olinda Elizabeth Velázquez López técnico titular de microscopía óptica avanzada del INECOL por su apoyo en los análisis microscópicos de las hifas de *F. kuroshium*.

Al Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (FORDECyT-México) #292399, por el financiamiento del proyecto titulado: "Generación de estrategias científico-tecnológico con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México", bajo el cual se desarrolló este proyecto de tesis.

A Marilyn Bogantes Sánchez por ser mi impulsor durante todo el proceso, la mujer que estuvo todos los días apoyándome y alentándome a seguir adelante y recordarme día a día que habrá obstáculos, lágrimas, errores, dudas, pero no límites; gracias por ser ese refugio en los momentos difíciles y compartir la satisfacción y felicidad de haberlo logrado.

Finalmente, a usted que llegó hasta aquí y leyó todos los agradecimientos, le agradezco por dedicar este tiempo ya que el mérito es de todas estas personas anteriormente mencionadas.

Lugar de realización, dirección y apoyos

El siguiente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y Química Bioanalítica, de la Red de Estudios Moleculares Avanzados del INECOL A.C., ubicado en el edificio B del Clúster Científico y Tecnológico BioMimic® en Xalapa, Veracruz, México y en el Laboratorio de Ecología Evolutiva de la Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. La dirección quedó a cargo del investigador titular del área, Dr. José Antonio Guerrero Analco y la Ph.D Ana Francis Carballo Arce, docente e investigadora de la Escuela de Química perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y naturales de la Universidad Nacional de Costa Rica.

Este proyecto se desarrolló con el apoyo del “Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (FORDECyT) #292399”, bajo el proyecto titulado: "Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México.

Índice General

| | |
|---|------|
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos | v |
| Lugar de realización, dirección y apoyos | vii |
| Índice de figuras | x |
| Índice de tablas | xi |
| Abreviaturas | xii |
| Resumen | xiii |
| CAPITULO I: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN. | 1 |
| 1.2 MARCO TEÓRICO. | 4 |
| 1.2.1 Bioprospección. | 4 |
| 1.2.1.1 Bosque tropical húmedo | 5 |
| 1.2.1.2 Relevancia del estudio de los compuestos fenólicos | 6 |
| 1.2.1.3 Análisis metabolómicos como herramienta en los estudios bioprospectivos. | 7 |
| 1.2.2 Organismos fitopatógenos. | 7 |
| 1.2.2.1 Nematodos | 8 |
| 1.2.2.2 Hongos fitopatógenos | 11 |
| 1.2.2.2.1 <i>Fusarium solani</i> | 12 |
| 1.2.3 Complejo ambrosial <i>Euwallacea kuroshio</i> - <i>Fusarium kuroshium</i> . | 13 |
| 1.2.3 Aspectos generales de la familia Piperaceae. | 15 |
| 1.2.4 Bioactividad de los géneros <i>Peperomia</i> y <i>Piper</i> . | 16 |
| 1.2.5 <i>Peperomia blanda</i> . | 19 |
| CAPITULO II: OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL | 21 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| CAPÍTULO III: METODOLOGÍA | 21 |
| 3.1 Recolección del material vegetal. | 21 |
| 3.2 Preparación del EC-PB. | 22 |
| 3.3 Fraccionamiento químico preliminar del EC-PB mediante cromatografía en columna abierta (CCA). | 22 |
| 3.3.1 Selección de la fase móvil. | 22 |
| 3.3.2 Preparación del EC-PB para realizar la separación por cromatografía de columna. | 23 |
| 3.3.3 Fraccionamiento por columna abierta (CCA). | 23 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Evaluación de la actividad insecticida del EC-PB. | 24 |
| 3.4.1 Material biológico. | 24 |
| 3.4.2 Método de toxicidad por contacto. | 24 |
| 3.5 Evaluación de la actividad antifúngica. | 25 |
| 3.5.1 Preparación de las muestras a evaluar. | 25 |
| 3.5.2 Preparación del inóculo. | 25 |
| 3.5.3 Ejecución del bioensayo. | 26 |
| 3.5.4 Análisis microscópico de las hifas de <i>Fusarium kuroshium</i> por microscopía confocal de barrido láser (MCBL). | 26 |
| 3.5.5 Análisis microscópico de las hifas de <i>Fusarium kuroshium</i> por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). | 27 |
| 3.6 Evaluación de la actividad nematocida del EC-PB. | 27 |
| 3.7 Metabolómica dirigida: Búsqueda de compuestos fenólicos | 28 |
| 3.8 Metabolómica no dirigida por UPLC - MS – QToF. | 30 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 32 |
| 4.1 Proceso de extracción y separación cromatográfica del EC-PB. | 32 |
| 4.2 Evaluación de la actividad insecticida del EC-PB. | 35 |
| 4.3 Evaluación de la actividad fungicida. | 36 |
| 4.3.1 Actividad fungicida del EC-PB contra <i>F.solani</i> y <i>F. kuroshium</i> . | 36 |
| 4.3.2 Actividad fungicida de las fracciones del EC-PB contra <i>F. solani</i> y <i>F. kuroshium</i> . | 38 |
| 4.4 Análisis microscópico del daño mecánico en las hifas de <i>Fusarium kuroshium</i> provocado por la fracción PB-H. | 41 |
| 4.4.1 Microscopía confocal de barrido láser (MCBL). | 41 |
| 4.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM). | 42 |
| 4.5 Evaluación de la actividad nematocida. | 43 |
| 4.5.1 Evaluación del EC-PB. | 43 |
| 4.5.2 Evaluación de las fracciones PB-G y PB-H. | 44 |
| 4.6 Metabolómica dirigida: búsqueda de compuestos fenólicos. | 45 |
| 4.6.1 Metabolómica dirigida en las fracciones PB-G y PB-H | 47 |
| 4.7 Perfilamiento químico por UPLC-MS-QToF | 49 |
| 4.7.1 Identificaciones tentativas. | 52 |
| 5 Conclusiones | 54 |
| 6 Perspectivas | 55 |
| 7 Referencias bibliográficas | 56 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Efecto de los nematodos sobre algunos cultivos..... | 8 |
| Figura 2. Morfología de nematodos fitoparásitos utilizando un objetivo de 40X..... | 9 |
| Figura 3. Microfotografía a 40X de <i>Panagrellus redivivus</i> en edad J4. | 11 |
| Figura 5. Amarilleamiento y marchitez de las hojas del tomate causado por <i>F. solani</i> . 12 | 12 |
| Figura 6. Hembras de <i>Euwallacea kuroshio</i> | 13 |
| Figura 7 Signos y síntomas causados por el complejo ambrosial <i>Euwallacea kuroshio</i> – <i>Fusarium kuroshium</i> | 14 |
| Figura 8. Distribución geográfica de la familia Piperaceae en el continente americano.16 | 16 |
| Figura 9. Estructura química del hidroxichavicol encontrado en las hojas de <i>P. betle</i> ... 18 | 18 |
| Figura 10.Estructura química de eupomatenoide-5 aislado de las hojas de <i>P. regnellii</i> .18 | 18 |
| Figura 11. Compuesto 7,8-trans-8,8'-trans-7', 8'-cis-7,7'-bis (5-metoxi-3,4-metilendioxfenilo) -8-acetoximetil -8'-hidroximetiltetrahidrofurano aislado de <i>P. pellucida</i> | 19 |
| Figura 12. <i>Peperomia blanda</i> | 19 |
| Figura 13. Estructuras de algunos compuestos aislados de <i>P. blanda</i> | 20 |
| Figura 14. Ubicación geográfica del Santuario del Bosque de Niebla. | 22 |
| Figura 15. Resultado de la separación por cromatografía de capa fina del extracto crudo de <i>P. blanda</i> , revelando con luz UV a 254 nm y 365 nm..... | 33 |
| Figura 16. A) Columna cromatográfica utilizada en la separación del extracto crudo de <i>P. blanda</i> , B) Resultados de TLC de los eluatos 31, 33, 35, 37, 39 y 41 utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo (80:20). | 34 |
| Figura 17. Resultados de la evaluación de la actividad antifúngica del extracto crudo de <i>P. blanda</i> contra <i>F. solani</i> por el método de inhibición del crecimiento micelial..... | 37 |
| Figura 18. Resultado de la evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones PB-G y PB-H a 2.0 mg/mL contra <i>F. solani</i> | 39 |
| Figura 19. Resultado de la evaluación de la actividad antifúngica de la fracción PB-H contra <i>F. kuroshium</i> | 40 |
| Figura 20. Microgrfías de las hifas de <i>F. kuroshium</i> | 41 |
| Figura 21. Microgrfías de las hifas de <i>F. kuroshium</i> | 42 |
| Figura 22. Principales compuestos fenólicos identificados. | 46 |
| Figura 23. Diagramas de componentes principales (PCA) de las fracciones PB-G, PB-H y PB-I A) Por ESI ⁺ . B) Por ESI ⁻ | 50 |
| Figura 24. Gráficos de volcán obtenidos con datos de ESI ⁺ . A) Fracción PB-G vs PB-H. B) Fracción PB-H vs PB-I. | 52 |
| Figura 25. Estructura química de la nilotocina. | 53 |
| Figura 26. Estructura química del dilapiol. | 54 |
| Figura 27. Cromatograma de la fracción PB-H. | 70 |
| Figura 28. Región del cromatograma de la fracción PB-H (9.0-15 min). A los 9.68 min se observa la señal correspondiente a la nilotocina. | 71 |
| Figura 29. Espectro de masas de la fracción PB-H obtenido por ESI ⁺ . Se aprecia la nilotocina con un [M+H] ⁺ de 457.3672 y los fragmentos 421.3470 y 439.3539. | 71 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Nematodos asociados con algunos cultivos en Costa Rica. | 10 |
| Tabla 2. Ejemplos de hospedadores del complejo ambrosial <i>E. kuroshio</i> - <i>F. kuroshium</i> presentes en Costa Rica. | 15 |
| Tabla 3. Actividad biológica de algunas especies de los géneros <i>Peperomia</i> y <i>Piper</i> ... 17 | 17 |
| Tabla 4. Composición (%) de las diferentes mezclas de solventes utilizadas para el perfilamiento químico preliminar del extracto metanólico de <i>P. blanda</i> por CCF. | 23 |
| Tabla 5. Condiciones operacionales para la metabolómica dirigida mediante UPLC-MS-QqQ. | 30 |
| Tabla 6. Condiciones operacionales para el análisis de metabolómica no dirigida mediante UPLC-MS-QToF. | 31 |
| Tabla 7. Niveles de confianza en la identificación de metabolitos. | 32 |
| Tabla 8. Resumen de los resultados de la combinación de eluatos producto del fraccionamiento por cromatografía en columna abierta (CCA). | 34 |
| Tabla 9. Resultados de la actividad insecticida del extracto metanólico contra <i>X. bispinatus</i> | 35 |
| Tabla 10. Resultados de la actividad antifúngica del extracto de las partes aéreas de <i>P. blanda</i> contra <i>F. solani</i> por el método de inhibición del crecimiento micelial. | 37 |
| Tabla 11. Resultados de la evaluación de la actividad fungicida de las fracciones obtenidas a 2.0 mg/mL contra <i>F. solani</i> por el método de inhibición del crecimiento micelial. | 38 |
| Tabla 12. Resultados de la evaluación de la actividad fungicida de dos fracciones a diferentes concentraciones contra <i>F. kuroshium</i> | 40 |
| Tabla 13. Evaluación de la actividad nematocida del extracto crudo de <i>P. blanda</i> contra <i>P. redivivus</i> | 44 |
| Tabla 14. Evaluación de la actividad nematocida de las fracciones PB-G y PB-H contra <i>P. redivivus</i> | 44 |
| Tabla 15. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto crudo por dMRM. | 47 |
| Tabla 16. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos en fracciones PB-G y PB-H por dMRM. | 48 |
| Tabla 17. Cantidad de relaciones masa carga detectadas por UPLC-MS-QToF. | 50 |

Abreviaturas

| | |
|---|--|
| %M: Porcentaje de mortalidad | MCBL: Microscopía confocal de barrido láser |
| °C: Grados celsius | MeOH: Metanol |
| μM: Concentración micromolar | mg/mL: Miligramo por mililitro |
| AcOEt: Acetato de etilo | mg: Miligramo |
| BN: Bosque de niebla | EC-PB: Extracto crudo de <i>P. blanda</i> |
| C ⁺ : Control positivo | PCA: Diagrama de componentes principales |
| CFW: Calcofluor White | PDA: Agar papa dextrosa |
| CC: Control de crecimiento | PTFE: Politetrafluoroetileno |
| CCA: Cromatografía en columna abierta | RF: Factor de retención |
| CCF: Cromatografía en capa fina | SEM: Microscopía electrónica de barrido |
| CL50: Concentración letal media | tR: Tiempo de retención |
| DE: Desviación estándar | UFC: Unidades formadoras de colonias |
| dMRM; Método de monitoreo dinámico de reacciones múltiples | UPLC-MS-QqQ: Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas de tipo triple cuadrupolo. |
| ESI: Ionización por electrospray en modo negativo | UPLC-MS-QToF: Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas de tipo cuadrupolo y tiempo de vuelo |
| ESI ⁺ : Ionización por electrospray en modo positivo | v/v: Relación volumen-volumen |
| g: Gramo | μL: microlitro |
| HEX: Hexano | μm: Micrómetro |
| INECOL A. C.: Instituto de Ecología Asociación Civil | |
| m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar | |
| m/-v: Relación masa-volumen | |
| m/z: relación masa/carga | |

Resumen

Cualquier cultivo puede verse afectado por la presencia de plagas, lo que tiene un impacto negativo en su productividad, estas plagas tienen diversa naturaleza, a. Hongos: por ejemplo, *Fusarium solani*, el cual es uno de los fitopatógenos que más especies vegetales ataca a nivel mundial, provocando en éstas marchitamiento y podredumbre, b. Complejos ambrosiales: los cuales se componen de un hongo y un insecto que interactúan mediante una relación simbiótica, uno de los más dañinos es el complejo ambrosial *Euwallacea kuroshio-Fusarium kuroshium* que provoca múltiples daños, entre ellos la muerte regresiva por *Fusarium* que afecta especies vegetales de interés agrícola y forestal, c. Nematodos fitopatógenos: los cuales son organismos diminutos en forma de gusano que habitan en el suelo, éstos ingresan por las raíces de los cultivos provocando agallas, clorosis, madurez adelantada entre otros daños, lo cual ocasiona una disminución considerable en la tasa de producción del cultivo infectado. Con la finalidad de contrarrestar el impacto de estas y otras plagas se recurre de forma frecuente al uso de agroquímicos de origen sintético; sin embargo, esta práctica representa un gran daño al medio ambiente debido a la contaminación de fuentes de agua, aire y suelos que estos ocasionan debido a su alta persistencia, además de ser una amenaza para la salud humana por la alta toxicidad demostrada de muchos pesticidas que también se asocian con el desarrollo de un gran número de enfermedades.

Costa Rica es el país de mayor consumo de plaguicidas por hectárea a nivel mundial lo que contrasta con la buena imagen del país en materia ambiental, es por esto que encontrar alternativas ambientalmente amigables para el manejo de plagas es fundamental. Bajo esta línea, la búsqueda de agentes bioactivos de origen botánico constituye una base fundamental para el desarrollo de biopesticidas eficaces, que tengan la capacidad de contrarrestar el impacto de plagas agrícolas y a su vez sean inofensivos para los humanos y la biodiversidad en general.

En el marco del proyecto de investigación titulado: "Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México", se identificó a la especie vegetal *Peperomia blanda* (Piperaceae) con potencial biocida contra algunos agentes fitopatógenos de interés agrícola y forestal. Sin embargo, los compuestos responsables de los efectos observados a la fecha no han sido descritos. Por lo que en esta investigación se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de las partes aéreas de *P. blanda* para encaminar esfuerzos al aislamiento e identificación de metabolitos secundarios activos en esta especie. Esta planta es una herbácea que se encuentra usualmente en los bosques fluviales distribuida en el continente americano desde el noreste de México hasta el sur de Brasil. En Costa Rica se puede encontrar en toda la meseta central cerca de las regiones montañosas.

La actividad biológica de *P. blanda* se evaluó contra los hongos *F. solani* y *F. kuroshium*, el insecto ambrosial *Xyleborus bispinatus* y el nematodo modelo *Panagrellus redivivus*. Para esto, se preparó un extracto crudo metanólico (EC-PB) de las partes aéreas de *P.*

blanda colectada en la reserva ecológica conocida como el "Santuario de Bosque de Niebla", ubicado en la Ciudad de Xalapa Enríquez, en el Estado de Veracruz, México. El EC-PB se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) de gel de sílice utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad ascendente de diferentes mezclas de solventes tales como hexano (HEX), hexano-acetato de etilo (HEX-AcOEt), acetato de etilo (AcOEt) y acetato de etilo-metanol (AcOEt-MeOH). Enseguida, los eluatos obtenidos se combinaron con base en las similitudes de sus perfiles cromatográficos mostrados en cromatografía de capa fina (CCF) hasta obtener un total de 26 fracciones primarias (PB-A a PB-Y).

El EC-PB no mostró actividad contra el escarabajo *X. bispinatus* y contra el nematodo *P. redivivus*, mientras que en ensayos de antagonismo contra el hongo *F. solani* se obtuvo una actividad moderada, observándose a 5.0 mg/mL un $38.11 \pm 0.24\%$ de inhibición del crecimiento micelial. Por otro lado, las fracciones primarias PB-G y PB-H resultaron ser las más activas obteniendo un 100% de mortalidad contra *P. redivivus*, y un 100% de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* y *F. kuroshium* a 0.4 mg/mL, 2.0 mg/mL y 2.0 mg/mL, respectivamente. En el caso particular de *F. kuroshium*, la fracción primaria PB-H mantuvo un 100% de inhibición del crecimiento micelial a la concentración de 1.0 mg/mL.

Adicionalmente, se realizó un análisis metabolómico dirigido para la búsqueda de compuestos fenólicos mediante UPLC-MS-QqQ encontrándose hasta 26 compuestos diferentes entre el EC-PB y fracciones primarias activas (Anexo 5). Particularmente destacan los compuestos ácido-3,4-dihidroxibenzóico, ácido-4-hidroxibenzóico, ácido vainillínico y luteolina. Estos compuestos tienen reportes previos de actividad biocida demostrada que se podría asociar con la actividad biológica observada en este estudio.

Una vez que se identificó la fracción PB-H como la más activa, se procedió a realizar un análisis comparativo por metabolómica no dirigida mediante UPLC-MS-QToF a las fracción activa PB-H y a las fracciones adyacentes PB-G y PB-I mediante diagramas de componentes principales y gráficos de volcán con la ayuda del software MetaboAnalyst e identificar tentativamente los componentes (m/z) distintivos presentes en PB-H. El primero en identificarse tentativamente fue niloticina, el cual se trata de un triterpeno considerado como citotóxico y que se ha probado *in vitro* contra el insecto vector del dengue *Aedes aegypti* L. También se identificó al compuesto dilapiol, el cual se trata de un fenilpropanoide comúnmente encontrado en diferentes especies del género *Peperomia* que posee actividad acaricida, repelente, insecticida, fungicida, entre otros. Niloticina y dilapiol son la primera vez que se describen en *P. blanda* y debido a sus propiedades citotóxicas se sugiere que estos compuestos sean responsables en parte de la actividad biológica obtenida en esta investigación.

Los hallazgos de esta investigación constituyen el primer reporte de bioactividad y fitoquímica de la especie como alternativa no convencional al uso de pesticidas sintéticos contra fitopatógenos de importancia nacional e internacional.

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.

A inicios del año 1870 aparecieron en el mercado mundial los primeros plaguicidas, inicialmente estos eran inorgánicos y de origen sintético, pasarían 75 años para que en 1945 se comenzaran a desarrollar y utilizarse plaguicidas de origen natural en conjunto con los ya existentes. A partir de los años sesenta, la demanda de estos productos comenzó a aumentar de forma exponencial debido al incremento de la población mundial y la necesidad de aumentar la productividad del sector agrícola para satisfacer los requerimientos de un mercado cada vez más competitivo y dinámico¹.

En Costa Rica, el sector agropecuario representa una de las actividades económicas más importantes del país, se estima que el área dedicada a esta actividad ronda las 2,406,418.4 hectáreas y que los ingresos generados por este mercado equivalen a 5.2% del Producto Interno Bruto (PIB)². Entre los principales productos agrícolas se encuentran el café, banano, piña, cacao y caña de azúcar. Sin embargo, muchos de estos cultivos se ven afectados por enfermedades causadas por diversos organismos como hongos, nematodos e insectos fitopatógenos. Tradicionalmente, el manejo de estas enfermedades se basa en la aplicación de plaguicidas sintéticos en combinación con algunas prácticas culturales, como remoción mecánica del tejido enfermo (deshoje, poda sanitaria). No obstante, con frecuencia estas prácticas no logran un nivel satisfactorio de control, por lo que es común tener daños significativos después de la cosecha o detectar la aparición de cepas de hongos resistentes a los fungicidas de mayor uso, además de los problemas ambientales que causan los agroquímicos, tales como: contaminación de fuentes de agua y suelos que en muchos casos se encuentran asociados con el desarrollo de enfermedades crónicas en la población³. Por lo tanto, la búsqueda de métodos de control de plagas más amigables con el medio ambiente y con menor impacto en la salud humana es fundamental.

Cualquier cultivo puede sufrir una disminución considerable en su tasa de producción como consecuencia de diversas plagas, lo que se puede traducir en pérdidas económicas importantes para los productores agrícolas. Por ejemplo, los nematodos fitoparásitos inducen enfermedades en forma directa ocasionando agallas radicales, necrosis en raíces, deformaciones en tallos y bulbos, entre otros; e indirectamente, por las interacciones con

otros agentes fitopatógenos (hongos, bacterias y virus)⁴. Por otro lado, la alta humedad relativa y la temperatura de las regiones tropicales, favorece el crecimiento de hongos patógenos en plantas, los cuales pueden provocar la pérdida de hasta la mitad de la producción en algunos cultivos.

Fusarium solani es un hongo filamentoso patógeno de importancia agrícola, que afecta cerca de 111 especies de plantas de 87 géneros, este ataca principalmente a hortalizas provocándoles marchitamiento vascular y podredumbre en la zona de la base del tallo y raíz, generando marchitez y amarilleamiento de las hojas⁵. Otra plaga de importancia agrícola son los complejos ambrosiales, principalmente el conformado por el escarabajo escolitino *Euwallacea kuroshio* y el hongo fitopatógeno *Fusarium kuroshium*, quienes ocasionan la enfermedad conocida como "Muerte regresiva por Fusarium" en diversas especies de árboles de interés comercial, agrícola y ornamental. Una de las especies más perjudicadas por la plaga es el aguacate [*Persea americana* Mill (Lauraceae)], cultivo con alto valor económico para México al ser el mayor productor y exportador a nivel mundial. En la actualidad, esta plaga se encuentra distribuida principalmente en el sur del Estado de California en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) y al noroeste de México (Tijuana, Baja California), pero representa un riesgo potencial para todo el continente, ya que en la mayoría de territorios latinoamericanos existe presencia de hospederos naturales de la plaga y Costa Rica no es la excepción⁶.

En Costa Rica, el Ministerio de Agricultura y Ganadería lanzó a inicios del año 2020 el Plan Nacional de Aguacate, en el que se plantea como metas el incremento de área de cultivo de aguacate de altura y de bajura, ya que la producción de ambas se complementa, permitiendo contar con oferta nacional durante todo el año. En total se propone aumentar el área cultivada de 2,500 a 4,500⁷ hectáreas. La puesta en marcha de este plan es una razón más para buscar estrategias preventivas de control contra las plagas como los complejos ambrosiales que eventualmente pueden atacar el cultivo de aguacate costarricense.

Bajo esta línea, la búsqueda de agentes bioactivos de origen botánico constituye una base fundamental para el desarrollo de biopesticidas eficaces. En este contexto, Costa Rica es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo, cuenta con una gran cantidad de plantas que aún no han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico para determinar si cuentan con compuestos bioactivos con potencial para el desarrollo de productos con valor comercial en el sector farmacéutico o agroquímico⁸.

Dentro de esta variedad de plantas se encuentran las que pertenecen a los géneros *Peperomia* y *Piper*, siendo estos los más representativos de la familia Piperaceae, los cuales han mostrado tener efectos biocidas entre los que destacan actividad insecticida, antiprotozoaria, bactericida, larvicida, fungicida, entre otros; sobre diferentes organismos fitopatógenos, debido a la variedad de metabolitos secundarios bioactivos que biosintetizan, por ejemplo: alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenos, entre otros^{9,10}.

Una especie representativa de la familia Piperaceae es *Peperomia blanda*, de la cual un extracto crudo (MeOH) obtenido de sus partes aéreas se identificó con potencial antifúngico contra especies de hongos del género *Fusarium*¹¹. En esta investigación bioprospectiva realizada en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Ecología A.C., se evaluaron diferentes especies vegetales presentes en el ecosistema conocido como Bosque de Niebla (BN) o Bosque Mesófilo de Montaña como fuentes de productos naturales activos con potencial agroquímico. Sin embargo, los compuestos responsables de la actividad biológica descrita a nivel de extracto no fueron identificados en esta investigación. Cabe destacar que el BN es un ecosistema con gran presencia también en Costa Rica y que bajos los mismos criterios resulta de gran interés para la búsqueda de productos naturales con potencial biotecnológico.

P. blanda es una planta herbácea distribuida en la mayoría del territorio del continente americano, y en Costa Rica frecuentemente es encontrada en los bosques fluviales cercanos a la meseta central. En el sector de las Yungas meridionales (Argentina) es considerada como una planta comestible, principalmente utilizada como aromatizante para productos lácteos, además tradicionalmente se utiliza para tratar infecciones en la piel, lo cual ha motivado la realización de algunas investigaciones con esta planta^{12,13,14}. Sin embargo, en Costa Rica no se han realizado estudios fitoquímicos sobre *P. blanda*, y a nivel internacional se cuenta con algunos estudios de elucidación de cromenos, flavonoides y lignanos, y algunas evaluaciones de actividad antioxidante, entre otros¹⁰.

Por otro lado, en relación al uso de plaguicidas en la actividad agrícola, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO por sus siglas en inglés, señala que las plagas son la causa número uno a nivel mundial de la pérdida de productividad de los cultivos¹⁵, además Costa Rica es uno de los países con mayor utilización de plaguicidas por hectárea agrícola a nivel mundial. En el 2015, estudios estadísticos realizados por el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) muestran que Costa Rica es el mayor consumidor de ingrediente activo para el desarrollo

de plaguicidas en el mundo, con una cifra aproximada de consumo de 18.2 kg por hectárea cultivada, seguido por China con diecisiete kilogramos¹⁶. Es por esto que la presente investigación tiene por objetivo realizar el estudio químico biodirigido de las partes aéreas de *P. blanda* y determinar la actividad biocida de las fracciones obtenidas para la búsqueda de los compuestos activos responsables de los efectos observados y encaminar esfuerzos hacia la búsqueda de novedosos agentes pesticidas alternativos no convencionales al uso de agroquímicos sintéticos para proteger los cultivos de valor comercial y que estos puedan acceder a mercados más lucrativos como consecuencia de disminuir los riesgos a la salud humana y daño al medio ambiente.

1.2 MARCO TEÓRICO.

1.2.1 Bioprospección.

Desde tiempos inmemoriales, la humanidad ha necesitado de la naturaleza con la finalidad de suplir todas sus necesidades básicas, siendo la diversidad de plantas que existía en su entorno uno de los recursos que más llamó su atención. El interés preliminar del hombre por las plantas comenzó a partir de su necesidad de alimento, refugio y protección, luego buscó entre ellas curaciones para las lesiones y enfermedades, por lo que se puede decir que la medicina y la botánica siempre tuvieron una fuerte conexión, es por esta razón que un gran número de fármacos y medicamentos modernos provienen de fuentes vegetales. La revisión bibliográfica revela claramente que los recursos de las plantas ya sea en la forma de extractos, fracciones o compuestos puros se han utilizado en todo el mundo para tratar un gran número de enfermedades, que van desde trastornos de la piel, afecciones respiratorias, digestivas y urinarias, hasta diferentes tipos de tumores y cáncer¹⁷.

La etnobotánica se refiere al estudio de las interacciones de la sociedad con la naturaleza que puede ser abordado con diferentes herramientas y desde diferentes perspectivas, actualmente no se cuenta con una definición generalizada, ya que se han adoptado distintas posturas según autores, sitios de estudio y épocas¹⁸. Recientemente, se han incorporado herramientas tanto cualitativas como cuantitativas para recabar y analizar los datos que se obtienen en una investigación etnobotánica; una de las más importantes es la entrevista, esta permite establecer un contacto directo entre el investigador y el entrevistado, con la intención de que este último acceda a compartir sus conocimientos que ha adquirido con la experiencia y los transmitidos de generación en generación acerca

del uso de las plantas para obtener beneficios y mejorar la calidad de vida de su comunidad. Una práctica común es aplicar este tipo de herramientas en comunidades indígenas de diferentes grupos étnicos, los cuales por su estilo de vida tienen invaluable conocimientos en esta materia¹⁹.

Por otra parte, la etnofarmacología es una disciplina dedicada al estudio del complejo conjunto de relaciones entre plantas y animales con las sociedades humanas, cuyo objetivo es desarrollar estrategias enfocadas en la investigación sobre plantas con propiedades medicinales, con la finalidad de combinar la información obtenida y utilizarla para el desarrollo de productos farmacéuticos comercializables. Se estima que antes del avance de la química orgánica sintética y la era posgenómica, más del 80% de las sustancias farmacológicas se obtenían de productos naturales o se inspiraban en compuestos naturales y para el año 2018 se estimó que el 25% de los fármacos prescritos provienen de plantas^{20,21}. Sin embargo, solo una pequeña parte de la biodiversidad vegetal del mundo ha sido ampliamente estudiada para determinar su bioactividad, por esta razón la OMS hizo un llamado en el 2005 para fomentar la investigación de las fuentes vegetales y explotar el potencial medicinal con miras al desarrollo de productos farmacéuticos que ayuden a aumentar la calidad de vida de las poblaciones¹⁷.

La mayoría de los datos botánicos sobre el uso milenario de plantas hace referencia a la aplicación de estas en el campo de la medicina, sin embargo, otra aplicación importante es su utilización como pesticidas naturales como agentes controladores de plagas. En Cuba en la década de 1940 era común utilizar extractos acuosos de plantas pertenecientes a los géneros *Nicotiana*, *Tephrosia* y *Chrysanthemum* con los cuales se rociaban los cultivos para controlar los insectos fitopatógenos. *Ocimum basilicum*, *Tagetes erecta* y *Origanum vulgare* se plantaban alrededor de los cultivos de interés como cercas vivas, los agricultores creían fielmente que estas plantas actuaban como repelentes naturales que mantenían a las plagas alejadas de las plantaciones²².

1.2.1.1 Bosque tropical húmedo

El bosque tropical húmedo o bosque de niebla es un ecosistema que se encuentra principalmente en la región intertropical de Asia, América y África y abarca el 2.6% de la superficie terrestre que habitualmente se encuentran en zonas donde se condensa el aire húmedo del mar. Se caracteriza por la presencia de nubes y neblina a nivel del suelo, también por su alta humedad, alta precipitación y luminosidad parcial. En las montañas

continentales suele ocupar fajas altitudinales angostas que pueden ir de los 500 a los 3,000 m.s.n.m. Además, se presenta en fragmentos discontinuos con gran riqueza biológica, pero que varían mucho en composición debido a su origen histórico, ubicación geográfica y posición altitudinal entre zonas cálidas, templadas y húmedas²³.

La gran biodiversidad que albergan este tipo de bosques representa una potencial fuente de compuestos activos, es por ello que los estudios de bioprospección son de gran ayuda para estimar el valor ecológico de especies presentes en este tipo de ecosistema.

1.2.1.2 Relevancia del estudio de los compuestos fenólicos

El término "compuestos fenólicos" engloba a todas aquellas sustancias que poseen varios grupos funcionales fenol (nombre popular del hidroxibenceno) unidas a estructuras aromáticas o alifáticas²⁴.

Los fenoles son formados por síntesis *de novo* por las plantas. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (por ejemplo, los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo²⁴.

Adicionalmente, una de las características más llamativas de los compuestos fenólicos es que diversos estudios han reportado una gran cantidad de actividades biológicas de los compuestos puros o mediante sinergismos con otros. Por ejemplo, algunos flavonoides como antocianinas, flavonoles y flavanonas tienen actividad antioxidante, antimutagénico, fungiestático, insecticida entre otros, también los derivados del ácido benzoico tienen actividad estrógena, antiinflamatoria, fungicida, bactericida, acaricida, por citar algunas. Esto hace que el estudio de los compuestos fenólicos en plantas sea muy atractivo desde el punto de vista farmacéutico y agrícola, enfocado en la búsqueda no convencional de tratamientos alternativos para combatir enfermedades o ya bien, como fitopesticidas naturales^{25, 26}.

1.2.1.3 Análisis metabolómicos como herramienta en los estudios bioprospectivos.

El término metaboloma se puede definir como el repertorio de moléculas de un tejido, organismo o extracto, en un momento dado; por lo tanto, la metabolómica es el estudio de las moléculas biosintetizadas por un conjunto de células, lo que permite caracterizar el fenotipo de un organismo en una situación determinada y averiguar qué clase de metabolitos biosintetiza²⁷.

La metabolómica puede abordarse desde dos enfoques: metabolómica dirigida y no dirigida. La no dirigida tiene como objetivo medir simultáneamente la mayor cantidad de metabolitos posibles en una muestra, extrayéndolos de la matriz y siendo analizados por métodos espectroscópicos y/o espectrométricos, una vez obtenidos los datos, estos se procesan en softwares bioinformáticos para identificar las huellas espectrométricas características de cada muestra y realizar una búsqueda comparativa con huellas espectrométricas de moléculas ya reportadas en bases de datos espectrales para obtener de forma tentativa la identidad de cada metabolito. Por otro lado, con la metabolómica dirigida es posible identificar y cuantificar metabolitos mediante la co-elución con estándares de referencia bajo parámetros de detección específicos para cada compuesto²⁷.

Los estudios químicos biodirigidos en conjunto con los análisis metabolómicos permiten el aislamiento de metabolitos con actividad biológica al enfocarse en la investigación de fracciones bioactivas a través de las diferentes etapas de separación, en consecuencia, dependen de ensayos *in vivo* e *in vitro* para determinar la eficacia de compuestos puros, extractos y fracciones. Por lo que, los estudios biodirigidos complementados con análisis metabolómicos son una herramienta poderosa para el descubrimiento de nuevos metabolitos activos y aportar a la quimiotaxonomía de las especies investigadas²⁸.

1.2.2 Organismos fitopatógenos.

Se denomina fitopatógeno a un organismo, que ocasiona enfermedades en las plantas al generar disturbios en el metabolismo celular, al secretar enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento. Los fitopatógenos son una amenaza mundial para la agricultura, la biodiversidad vegetal, la salud alimentaria y la economía.

1.2.2.1 Nematodos

Los nematodos son los organismos multicelulares más numerosos presentes en los agroecosistemas, son animales diminutos en forma de gusano que habitan en el suelo, son translúcidos y no presentan segmentaciones internas. La mayoría de estos organismos no representan ninguna amenaza para la agricultura, ya que se alimentan de organismos más pequeños como hongos, bacterias y otros. Sin embargo, hay un grupo que sí representa un riesgo para los cultivos, se trata de los nematodos fitopatógenos, los cuales se alimentan de las raíces de las plantas, son microscópicos y miden entre 300 μm y 1000 μm de longitud y entre 15 μm y 35 μm de ancho. Estos organismos pueden ingresar al interior de la raíz de la planta o alimentarse fuera de la misma. Este tipo de nematodos cuentan con una estructura llamada estilete, la cual les permite penetrar las células vegetales y así extraer su contenido intracelular y alimentarse del mismo²⁹. Además, ya que viven debajo del suelo y son microscópicos se dificulta su detección a simple vista. Algunos de los efectos más significativos causados por el huésped son un crecimiento reducido, clorosis en hojas, madurez adelantada o retardada. Entre los cultivos más afectados por la acción patógena de los nematodos destacan el melón, frijol de soja, zanahoria, papa, lechuga, entre otras hortalizas^{30, 31}.



Figura 1. Efecto de los nematodos sobre algunos cultivos. A) *Meloidogyne sp.* en zanahoria B) *Solanum tuberosum L.* en raíces de papa^{32, 33}.

El problema con los nematodos se ha incrementado especialmente en el frijol de soja, principalmente por *Meloidogyne sp.* conocido como el nematodo de la agalla y *Heterodera glycines* conocido como el nematodo del quiste de la soja. En el caso de *H. glycines* provoca pérdidas de hasta un 80% en las plantaciones; además, se estima que el

área afectada por esta plaga en la principal región productora de soja de Argentina es de aproximadamente 1.5 millones de hectáreas³⁴. En la Figura 2 se puede apreciar la morfología de los nematodos *Pratylenchus filipjev* y *Meloidogyne sp.*



Figura 2. Morfología de nematodos fitoparásitos utilizando un objetivo de 40X. a) Aspecto filiforme de los nematodos fitoparásitos *Pratylenchus filipjev*; b) Formas globosas, hembras de *Meloidogyne sp.*³⁵.

En Costa Rica, uno de los cultivos más afectados por nematodos es el arroz que se cultiva principalmente en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica, debido a la presencia de nematodos de los géneros *Pratylenchus*, *Meloidogyne* y *Helicotylenchus*³⁶. También *Aphelenchoides besseyi* es otro nematodo causante de manchas necróticas en el cultivo de frijol nacional³⁷. Además, según un estudio realizado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en Costa Rica hay reportes de más de cien diferentes cultivos atacados por nematodos entre los que destacan el café, cebolla, chile dulce, maíz, papa, piña, plátano, tomate, banano, cacao, melón entre otros (Tabla 1)³⁸.

Tabla 1. Nematodos asociados con algunos cultivos en Costa Rica.

| Cultivo | Nematodo asociado |
|-------------|-------------------------------------|
| Café | <i>Helicotylenchus sp.</i> |
| | <i>Meloidogyne arabicida</i> |
| Cebolla | <i>Criconemella sp.</i> |
| | <i>Helicotylenchus sp.</i> |
| Chile dulce | <i>Criconemella sp.</i> |
| | <i>Meloidogyne incognita</i> |
| Maíz | <i>Criconemella sp.</i> |
| | <i>Meloidogyne incognita</i> |
| Papa | <i>Criconemella sp.</i> |
| | <i>Helicotylenchus sp.</i> |
| | <i>Paratylenchus sp.</i> |
| Tomate | <i>Criconemella sp.</i> |
| | <i>Meloidogyne javanica</i> |
| Banano | <i>Helicotylenchus multicinctus</i> |
| | <i>Meloidogyne incognita</i> |

Fuente: Ministerio de Agricultura y Ganadería³⁸.

El nematodo *Panagrellus redivivus* (Figura 3) es una especie dioica y ovovivípara, se pueden describir como micro-gusanos redondos de la tribu Nematoda, son muy pequeños (aproximadamente 1.0 mm de longitud) y ampliamente utilizados en el laboratorio como modelo biológico para la realización de bioensayos de letalidad como un primer acercamiento *in vitro* al efecto sobre nematodos fitopatógenos. Además, esta especie cuenta con la ventaja de ser fácilmente manipulable en el laboratorio. Otra ventaja al trabajar con este nematodo es que en promedio presenta un contenido mayor de colesterol en comparación con otros nematodos fitopatógenos, lo que los vuelve más resistentes a los compuestos biocidas, por lo que muy probablemente los compuestos capaces de ocasionarles la muerte, también lo harán con los considerados plagas agrícolas^{39,40}.

Su ciclo de vida inicia en el útero de las hembras y es denominado como J1, en el que se desarrolla la embriogénesis con una duración aproximada de 20 horas, transcurrido este lapso el estadio J1 da lugar a los juveniles o J2, que emergen del huevo y son expulsados por la vulva de la hembra como libres nadadores. Los recién nacidos (J2) continúan su crecimiento pasando por otros dos estadios juveniles, J3 y J4, hasta alcanzar el estado adulto a las 96 horas de su nacimiento³⁹.

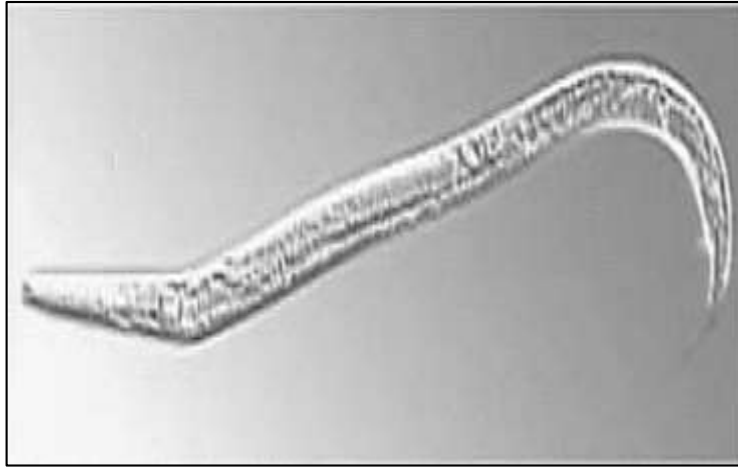


Figura 3. Microfotografía a 40X de *Panagrellus redivivus* en edad J4³⁹.

Actualmente, las principales medidas de control empleadas contra los nematodos fitopatógenos son los nematicidas químicos sintéticos, especialmente de contacto de amplio espectro, los cuales han sido muy eficaces. Sin embargo, estos han provocado en los agricultores dependencia, la cual se traduce en elevación de costos. Sólo en EUA se gastan US\$172 millones anuales en nematicidas de esta naturaleza. Además, los nematicidas son altamente tóxicos y son considerados como un riesgo que atenta contra la salud humana, inclusive muchos de ellos se han catalogado como carcinogénicos, adicionalmente ocasionan daños al medio ambiente, ya que los compuestos tóxicos que contienen persisten en el suelo durante algún tiempo, por lo que pueden infiltrarse en aguas subterráneas y contaminarlas⁴.

1.2.2.2 Hongos fitopatógenos

Los hongos son los agentes que más causan enfermedades en plantas, así lo indican las cuantiosas pérdidas que originan en las cosechas y el costo económico de los fungicidas necesarios para su control. El efecto nocivo de los hongos se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados y producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales. Por ejemplo, los hongos del género *Fusarium* son considerados como hongos fitopatógenos, ya que causan un sin número de enfermedades en cultivos. Sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables⁴¹.

1.2.2.2.1 *Fusarium solani*

Fusarium solani es un hongo filamentoso patógeno de importancia agrícola que afecta cerca de 111 especies de plantas distribuidas en 87 géneros diferentes, provocando pérdidas en floración estimadas entre 50% y 80%.⁵ Además, provoca marchitamiento vascular y podredumbre en los cultivos que infecta, principalmente la zona de la base del tallo y raíz, generando marchitez, amarilleamiento de las hojas, así como crecimiento retardado y necrosis en la raíz y corona, siendo las raíces principales y secundarias las más afectadas, provocando que la planta se vuelva quebradiza y débil. Entre los cultivos afectados por este fitopatógeno destacan tomate, melón, sandía, pepino, aguacate, cítricos, papa, pimientos, entre otros⁴². Esto genera grandes pérdidas para los agricultores, incrementando los costos de producción. *F. solani* es miembro del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) que alberga más de 45 especies filogenéticamente similares. Morfológicamente se caracteriza por la presencia de clamidiosporas, así como sus monofiálidos largos y macroconidias ligeramente curvados que varían de tamaño dependiendo de la región geográfica⁴³. En la Figura 5 se observa el daño que causa *F. solani* sobre el cultivo de tomate.



Figura 4. Amarilleamiento y marchitez de las hojas del tomate causado por *F. solani*⁴⁴.

Este fitoparásito habita en el suelo, en restos de cultivo y plantas vivas, entre otros y se desarrolla bajo condiciones de alta humedad y temperaturas de suelo de alrededor de 20°C. Además del uso de agroquímicos, la rotación de cultivos y tratamiento del suelo son medidas recomendables para tratar los efectos de la plaga; sin embargo, el mejor

modo de controlar enfermedades es el uso de variedades con resistencia genética contra esta especie de hongo⁴⁵.

1.2.3 Complejo ambrosial *Euwallacea kuroshio* - *Fusarium kuroshium*.

Un complejo ambrosial se constituye cuando una determinada especie de hongo fitopatógeno desarrolla una relación simbiótica con especies de escarabajos escolítinos barrenadores. En dicha relación los escarabajos transportan hasta los árboles a los hongos, constituyendo de esta manera un complejo vector-hospedero-patógeno respectivamente. Previo a la inoculación del hospedero, el hongo es temporalmente almacenado en unas estructuras bucales especializadas de los escarabajos denominadas micangios, dichos escarabajos crean galerías en el tronco del árbol (hospedero), lo que le permite al hongo atravesar la corteza y proliferar en su interior, a cambio de esto los escarabajos utilizan al hongo como fuente de alimento para adultos y sus larvas (Figura 6)⁴⁶.

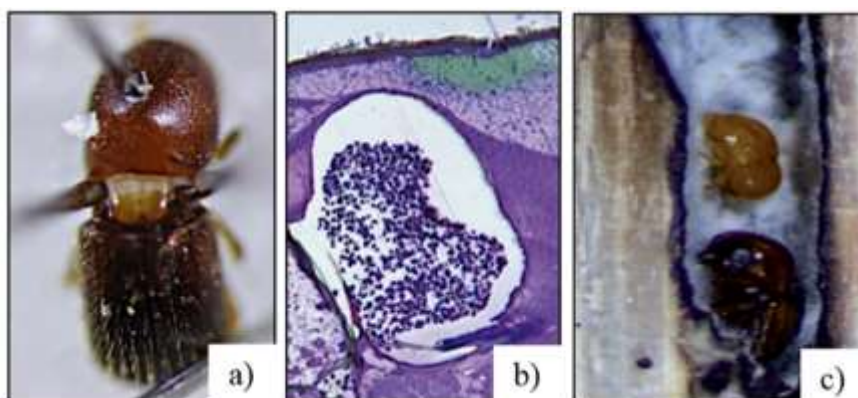


Figura 5. A) Las hembras de *Euwallacea kuroshio*. B) Micangios donde, transportan a su hongo simbiote C) Escarabajo deposita el hongo en el tronco formando el complejo ambrosial vector-patógeno-hospedero⁴⁷.

Euwallacea kuroshio (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae: Xyleborini) conocido como Escarabajo Barrenador Kuroshio (EBK) es vector del hongo *Fusarium kuroshium*, además es considerado como un escarabajo invasor y barrenador de madera que forma parte de un género de más de 40 especies dentro de la tribu Xyleborini, quien es la más grande de escarabajos con cerca de 1200 especies⁴⁸; mientras que *Fusarium kuroshium* es un hongo catalogado como necrótrofo, responsable de ocasionar la enfermedad fusariosis, conocida también como "Muerte regresiva por Fusarium". Inicialmente, los síntomas causados por esta enfermedad son poco notorios por lo que resulta difícil su diagnóstico temprano, ya que el daño ocurre en el tejido vascular del árbol, sin embargo con el paso del tiempo la infección del xilema y tejido vascular causada por el hongo

bloquea el paso del agua y nutrientes de la raíz al resto del árbol, causando de esta manera la aparición de manchas oscuras y húmedas en los orificios de entrada, gomosis, exudados blancos conocidos como volcanes de azúcar, decoloración de las hojas y de la corteza, y marchitez en ramas y/o corteza (producto de la necrosis del xilema y un fenómeno de tilosis); y en última instancia la muerte del árbol por el deterioro del tejido vegetal desde las partes ascendentes hacia el tronco y la raíz, respectivamente ⁶. En la Figura 7 es posible observar algunos efectos causados por el complejo ambrosial *Euwallacea kuroshio* – *Fusarium kuroshium*.



Figura 6 Signos causados por el complejo ambrosial *Euwallacea kuroshio* – *Fusarium kuroshium*. A) Orificios de entrada de la corteza. B) Exudados blancos y marchitez en el xilema. C) Galerías formadas por el escarabajo barrenador de madera. D) Gómosis.⁴⁹

Este complejo plaga ataca más de 300 especies vegetales tanto de importancia forestal como de importancia agrícola, tales como *Liquidambar styraciflua*, *Platanus sp.* y *Persea americana* (mejor conocido como aguacate) por mencionar algunos ejemplos de hospederos de este complejo. Esta plaga es nativa del sureste asiático y se observó por primera vez en el continente americano en el sur de California (EUA) a principios del 2012. Se cree que llegó al continente por el transporte de madera infectada, principalmente de material de embalaje en los puertos comerciales ⁶. No obstante, en los

últimos años se ha ido dispersando por el continente, México, Panamá y Costa Rica son ejemplos de países donde se ha reportado su avistamiento. La presencia de esta plaga en Costa Rica la reporta Cooperband y colaboradores en una revisión en el año 2016, sin embargo, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de nuestro país no tiene reportes de la existencia de la plaga, no obstante se deben de tomar todas las medidas de precaución correspondientes para evitar afectaciones mayores, ya que en países como México se le considera al complejo ambrosial *E. kuroshio* - *F. kuroshium* una plaga cuarentenaria⁵⁰.

Costa Rica es altamente vulnerable a la aparición de estas plagas debido a su enorme biodiversidad, por ejemplo en el país se reportan gran número de escarabajos escolítinos como *Xyleborus horridus*, *X. ferrugineus*, *X. affinis* y *X. volvulus* quienes son potenciales vectores secundarios o alternos de *F. kuroshium*, además muchas especies de árboles hospedadoras del complejo ambrosial se encuentran en territorio nacional (Tabla 2)⁵¹.

Tabla 2. Ejemplos de hospedadores del complejo ambrosial *E. kuroshio*- *F. kuroshium* presentes en Costa Rica.

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Liquidambar styraciflua</i> | <i>Quercus sp.</i> |
| <i>Ricinus communis</i> | <i>Ficus carica</i> |
| <i>Thevetia thevetioides</i> | <i>Liquidambar styraciflua</i> |
| <i>Macadamia integrifolia</i> | <i>Parkinsonia aculeata</i> |
| <i>Persea americana</i> | <i>Ricinus communis</i> |

Fuente: Tropicos.org⁵²

1.2.3 Aspectos generales de la familia Piperaceae.

Piperaceae es una familia de angiospermas tropicales que comprende un conjunto de plantas perennes, arbustivas o arbóreas, compuesta por más de 3,000 especies distribuidas en los trópicos húmedos y cálidos, la mayoría concentradas en el neotrópico del continente americano principalmente en Centroamérica y en el norte de Sudamérica^{53, 54}.



Figura 7. Distribución geográfica de la familia Piperaceae en el continente americano⁵⁴.

La familia de las Piperáceas se caracterizan por ser hierbas, arbustos, árboles, plantas trepadoras o epífitas que se desarrollan y crecen en el bosque de hoja perenne y pantanoso, usualmente en lugares oscuros y húmedos cercanos a la orilla del río; sus hojas son simples y alternas con gran variedad de tonalidades, siendo herbáceas o suculentas de diferentes formas y tamaños^{55, 53}. Estas plantas han sido utilizadas por varios grupos étnicos durante muchos años al atribuírseles propiedades medicinales debido a que usualmente poseen aroma al estrujarse porque contienen aceites volátiles y alcaloides⁵⁶.

Piper y *Peperomia* son los géneros más representativos de la familia con 2,000 y 1,700 especies, respectivamente⁵⁷. Las *Peperomias* son principalmente hierbas pequeñas, suculentas, a menudo epífitas; las especies del género *Piper* son de estructuras más diversas, incluidos arbustos (la gran mayoría), enredaderas y árboles pequeños^{58,59}.

1.2.4 Bioactividad de los géneros *Peperomia* y *Piper*.

Los géneros *Peperomia* y *Piper* presentan reportes de múltiples actividades biológicas comprobadas, esto se debe principalmente a la amplia gama de metabolitos secundarios identificados en diferentes especies, alcaloides, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, esteroides, proantocianidinas, flavonas y flavonoides son algunos ejemplos⁵⁸. El género *Piper* ha sido el más estudiado dentro de la familia, ya que cuenta con el mayor número de especies con diferentes actividades biológicas comprobadas, tales como antifúngica, antibacteriana, antiinflamatoria, anticarcinogénica, antihipertensiva, antioxidante, larvicida, repelente entre otras^{58,60}. En la Tabla 3 se muestran diferentes especies de plantas de los géneros *Peperomia* y *Piper*,

destacando aquellas con presencia en bosque de niebla con su respectiva actividad biológica demostrada.

Tabla 3. Actividad biológica de algunas especies de los géneros *Peperomia* y *Piper*.

| Especie | Actividad biológica | Referencia |
|----------------------------|---|---|
| <i>Piper rivinoides</i> | Fungicida contra <i>Candida tropicalis</i> | Linkoln <i>et al.</i> (2019) ⁶¹ |
| <i>Piper betle</i> | Anticancerígeno contra cáncer de páncreas | Guha <i>et al.</i> (2019) ⁶² |
| <i>Piper regnellii</i> | Antimicrobiana contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Scodro <i>et al.</i> (2013) ⁶³ |
| <i>Peperomia pellucida</i> | Analgésico | Su Xu <i>et al.</i> (2006) ⁶⁴ |
| <i>Peperomia japonica</i> | Nematicida contra <i>Caenorhabditis elegans</i> | Nagashima <i>et al</i> (2018) ⁶⁵ |

Piper rivinoides se ha utilizado para el tratamiento de infecciones debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, además se ha reportado que su aceite esencial contiene monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, aldehídos y compuestos cetónicos. En una investigación realizada por Linkoln y colaboradores (2019) se determinó que *P. rivinoides* tiene actividad contra *Candida albicans*, un hongo que se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina⁶¹.

Las hojas de *Piper betle* han sido ampliamente utilizadas en el continente asiático como refrescante bucal y para aliviar males estomacales; el hidroxichavicol (Figura 9) es un compuesto aromático presente en las hojas de *P. betle*, el cual tiene actividad contra cáncer de próstata, páncreas y leucemia mieloide crónico. Además, el compuesto ha demostrado no ser tóxico para roedores, lo que lo vuelve un prometedor compuesto con potencial para desarrollar un producto farmacéutico⁶².

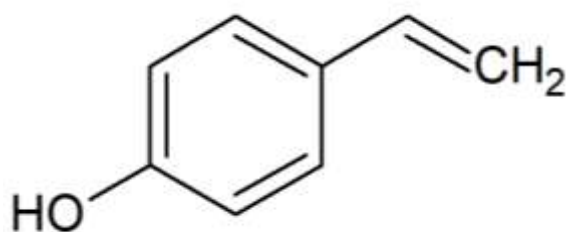


Figura 8. Estructura química del hidroxichavicol encontrado en las hojas de *P. betle*³⁵.

Tradicionalmente las infusiones de hojas y raíces de *Piper regnellii* han sido utilizados para tratar heridas e infecciones, debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que alberga; esteroides, alcaloides, lignanos y neolignanos son algunos ejemplos. En una investigación de Scodro y colaboradores (2003) se determinó que el extracto de las hojas de *P. regnellii* tiene actividad bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* (bacteria patógena responsable de ocasionar la enfermedad de tuberculosis), adicionalmente se elucidaron varios compuestos activos, dentro de los que destaca eupomatenoide-5 (Figura 10), un neolignano que se perfila como candidato para desarrollar un futuro producto farmacéutico⁶³.

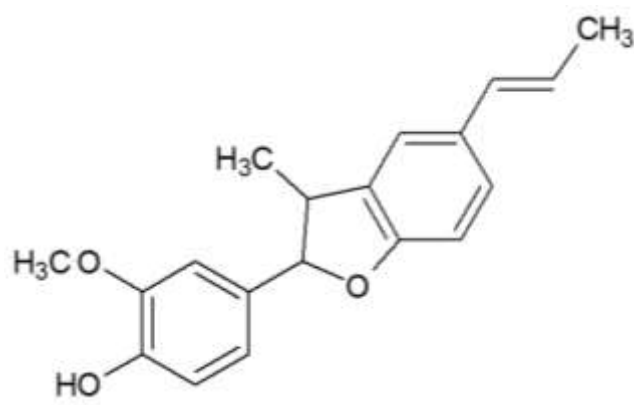


Figura 9. Estructura química de eupomatenoide-5 aislado de las hojas de *P. regnellii*³⁶.

Peperomia pellucida es ampliamente cultivada en territorios del sur de China, tradicionalmente esta planta ha sido utilizada para tratar heridas en la piel, traumatismos y sangrados múltiples debido a sus conocidas propiedades analgésicas. Estudios fitoquímicos han revelado que sus propiedades medicinales se deben a la presencia de flavonoides, fitoesteroles y apioles. Xu y colaboradores (2006) determinaron la presencia del compuesto 7,8-trans-8,8'-trans-7',8'-cis-7,7'-bis(5-metoxi-3,4-metilendioxfenilo)-8-acetoximetil-8'-hidroximetiltetrahidrofurano (Figura 11), el cual exhibe propiedades hormonales en humanos similares al estrógeno⁶⁴.

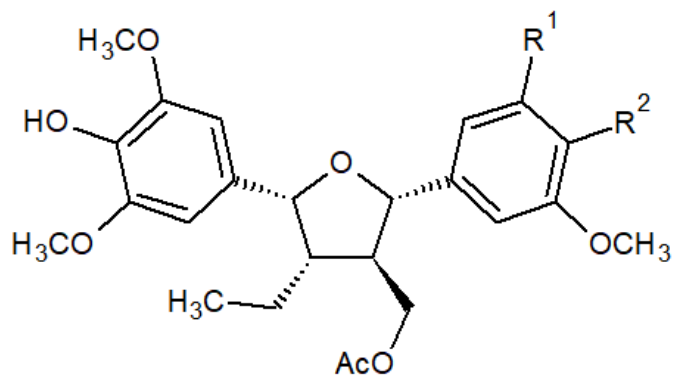


Figura 10. Compuesto 7,8-trans-8,8'-trans-7', 8'-cis-7,7'-bis (5-metoxi-3,4-metilendioxfenilo) -8-acetoximetil -8'-hidroximetiltetrahidrofurano aislado de *P. pellucida*³⁷.

1.2.5 *Peperomia blanda*.

Peperomia blanda (Figura 12) conocida popularmente como "verdolaguilla" es una planta herbácea que se encuentra usualmente en los bosques fluviales y barrancos, bosques tropicales de hoja perenne y en las zonas de niebla, por lo general en las rocas cubiertas de musgo en lugares húmedos y en la cercanía de la espuma de las cascadas, también entre la hojarasca en el suelo de los bosques y, en ocasiones como epífitas en los troncos de los árboles del género *Diospyros*⁶⁶. Esta especie se puede encontrar en el continente americano desde México hasta la mayor parte de Sudamérica en los bosques nubosos de altura; en Costa Rica se puede encontrar en toda la meseta central cerca de las regiones montañosas aproximadamente a 2,500 m.s.n.m.⁶⁷.



Figura 11. *Peperomia blanda*⁶⁸.

P. blanda se utiliza en varias culturas para tratar infecciones y heridas, esto ha motivado la realización de algunas investigaciones enfocadas en evaluar la actividad biológica de

extractos crudos de la especie. Por ejemplo, en una investigación de Wafa y colaboradores (2019) se determinó que los extractos crudos de *P. blanda* obtenidos en éter de petróleo, metanol y diclorometano mostraron actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* (microorganismo que puede causar *neumonía*, *endocarditis* en humanos)¹⁴. Adicionalmente, Dignani y colaboradores (2009) evaluaron la actividad antioxidante del extracto crudo de diclorometano de *P. blanda* (CI₅₀ de 7.47 µg/mL, 27.38 µg/mL y 77.34 µg/mL, respectivamente) para el radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), ácido hipocloroso y cloramina de taurina respectivamente⁶⁹.

Por otro lado, algunos investigadores han logrado aislar compuestos puros de *P. blanda*, tal es el caso de los lignanos (7R,8S,7'S,8'S)-4,5,4',5'-dimetilenodioxi-3,3'- dimetoxi-7,7'-epoxilignano y (7R,8S,7'S,8'S)-9-hidroxi-4',5'-metilenodioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7' -epoxilignano; también el flavonoide vicenina-2, así como también algunos cromenos como el 2S-(4-metil-3-pentenil)-6-formil-8-hidroxi-2,7- dimetil-2H-cromeno (Figura 13)^{57, 70 y 71}.

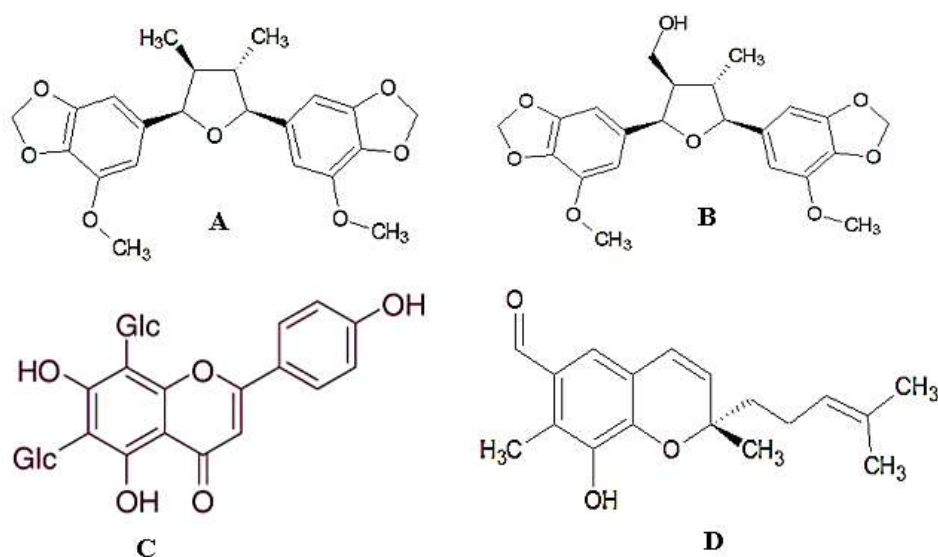


Figura 12. Estructuras de algunos compuestos aislados de *P. blanda*. A) (7R,8S,7'S,8'S)-4,5,4',5'-dimetilenodioxi-3,3'- dimetoxi-7,7'-epoxilignano. B) (7R,8S,7'S,8'S)-9-hidroxi-4',5'-metilenodioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7' -epoxilignano. C) Vicenin-2. D) 2S-(4-metil-3-pentenil)-6-formil-8-hidroxi-2,7- dimetil-2H-cromeno.

Sin embargo, a la fecha se desconoce el potencial biológico y químico de *P. blanda* contra organismos fitopatógenos tales como *F. solani* y *F. kuroshium*, u organismos modelos de plagas de interés como *P. redivivus* y escarabajos del género *Xyleborus* como *X. bispinatus*, utilizando como estrategia de investigación el estudio químico dirigido por ensayo u otra aproximación científica.

CAPITULO II: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la composición fitoquímica y la actividad biológica del extracto crudo y fracciones de las partes aéreas de *Peperomia blanda* colectadas en la reserva del Santuario Bosque de Niebla del INECOL A.C., para su potencial utilización como fitopesticida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el efecto antifúngico, nematocida e insecticida del extracto crudo de *P. blanda* sobre los organismos *Fusarium solani*, *Panagrellus redivivus* y *Xyleborus bispinatus* respectivamente.
- 2) Realizar el fraccionamiento preliminar del extracto crudo activo mediante métodos químicos y cromatográficos.
- 3) Determinar el potencial antifúngico y nematocida de las fracciones primarias obtenidas.
- 4) Realizar el aislamiento e identificación de los potenciales compuestos activos mediante métodos convencionales (cromatográficos y espectrométricos) y de vanguardia (metabolómica y derreplicación).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Recolección del material vegetal.

Aproximadamente 1.0 Kg de las partes aéreas (hojas y tallos) de *Peperomia blanda* se recolectaron en la reserva ecológica conocida como "Santuario de Bosque de Niebla" (SBN), ubicado en el municipio de Xalapa del Estado de Veracruz, México, dado por las coordenadas 19°30'51.0"N 96°56'48.3"O. El SBN comprende un área de 30 hectáreas de bosque mesófilo de montaña o bosque nublado en estado de restauración, el cual forma parte del Área Natural Protegida Estatal del Parque Francisco Javier Clavijero del INECOL A.C. La identificación taxonómica de la especie vegetal la realizó el Dr. Sergio Avendaño Reyes (Curador) y el Biol. Carlos Manuel Durán Espinosa, ambos personal técnico del Herbario XAL (Xalapa). Ejemplares herborizados se depositaron en el Herbario de Xalapa (XAL) del INECOL A.C. bajo el número de voucher XAL0148074.



Figura 13. Ubicación geográfica del Santuario del Bosque de Niebla⁷².

3.2 Preparación del EC-PB.

1.0 Kg de material fresco se secó en un horno de convección a 40 °C durante 48 horas, posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillas (marca FRITSCH, modelo Pulverisette 15). A continuación, 55.2 g del material vegetal seco y molido se extrajeron por maceración empleando como disolvente MeOH en una proporción 1:10 m/v con agitación constante y a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, los licores de la extracción se recuperaron por filtración al vacío y el material vegetal residual se sometió a una segunda extracción mediante el mismo procedimiento. Los licores de maceraciones se combinaron, filtraron y se concentraron mediante rotaevaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio (Marca Büchi, modelo RII) a una temperatura de 40 °C.

3.3 Fraccionamiento químico preliminar del EC-PB mediante cromatografía en columna abierta (CCA).

3.3.1 Selección de la fase móvil.

Previo al fraccionamiento por CCA, se realizó un análisis preliminar de la composición química del EC-PB mediante cromatografía de capa fina (CCF) en gel de sílice para determinar la fase móvil más adecuada para iniciar el proceso de separación, utilizando diferentes mezclas de disolventes (Tabla 4).

Tabla 4. Composición (%) de las diferentes mezclas de solventes (fase móvil) utilizadas para el perfilamiento químico preliminar EC-PB por CCF.

| | Fase móvil | HEX | AcOEt | MeOH |
|----------------------------|------------|-----|-------|------|
| Cantidad de disolvente (%) | A | 100 | 0 | 0 |
| | B | 90 | 10 | 0 |
| | C | 75 | 25 | 0 |
| | D | 50 | 50 | 0 |
| | E | 25 | 75 | 0 |
| | F | 0 | 100 | 0 |
| | G | 0 | 95 | 5 |
| | H | 0 | 80 | 20 |
| | I | 0 | 50 | 50 |
| | J | 0 | 25 | 75 |
| | K | 0 | 0 | 100 |

3.3.2 Preparación del EC-PB para realizar la separación por cromatografía de columna.

La aplicación de la muestra en la columna se realizó en forma seca. Para ello se tomaron 6.98 g del EC-PB, este se redisolvió en 50 mL de MeOH, posteriormente se añadieron 40 g de gel de sílice para la adsorción del extracto en el sorbente. Esta mezcla se homogenizó y se dejó en reposo durante 24 horas, transcurrido este tiempo se trituró hasta la obtención de un polvo fino, el cual se utilizó como parte del volumen muerto de la columna.

3.3.3 Fraccionamiento por columna abierta (CCA).

Para el fraccionamiento por CCA se utilizó una columna cromatográfica de vidrio (marca Chemglass), cuya longitud fue de 800 mm y el diámetro interno de 40 mm. La columna con un volumen muerto de 500 mL se empacó con 460 g de gel de sílice (Sigma, 1039596) en suspensión con 500 mL de HEX. Como fase móvil se utilizaron diferentes sistemas de disolventes en un gradiente de polaridad ascendente comenzando con HEX, HEX-AcOEt y AcOEt, iniciando con 100% HEX hasta 100 % AcOEt, en incrementos de 5% cada 500 mL. En seguida se utilizó como fase móvil AcOEt-MeOH iniciando con 100% AcOEt con un incremento de 10% en MeOH cada 500 mL, hasta finalizar en una proporción 50:50 AcOEt-MeOH. Por último, se realizó un lavado con 500 mL de MeOH

al 100%, el cual se almacenó y contabilizó como un eluato más. Por cada fase móvil de 500 mL se colectaron 12 eluatos de 40 mL cada uno aproximadamente.

Los eluatos resultantes se combinaron de acuerdo con la similitud de sus perfiles cromatográficos en CCF, y se concentraron por medio de un sistema de evaporación a presión reducida para así generar las correspondientes fracciones primarias.

3.4 Evaluación de la actividad insecticida del EC-PB.

3.4.1 Material biológico.

La actividad insecticida del EC-PB y fracciones primarias se evaluó mediante bioensayos con escolitinos criados en condiciones de laboratorio de la especie *Xyleborus bispinatus*. La colonia inicial de escarabajos fue proporcionada por el Dr. Luis Arturo Ibarra Juárez, Investigador Responsable del Laboratorio de Entomología Molecular de la REMAv, INECOL. Para reproducir la colonia se tomó una hembra (♀) madura y se sembró en un tubo de plástico para centrífuga graduado de 50 mL que contenía 30 mL de medio de cultivo a base de aserrín de *Platanus mexicana* (Anexo 1). Los tubos se cerraron permitiendo el paso del aire y se colocaron en una cámara bioclimática (PRENDON modelo CA-156;CA-294;CA-850) a una temperatura de 26 °C por 30 días, transcurrido este tiempo se procedió a realizar disecciones en los medios de cultivo para extraer a las hembras necesarias para los bioensayos y/o resembrar en nuevos medios de cultivo para incrementar el número de individuos.

3.4.2 Método de toxicidad por contacto.

La actividad insecticida del EC-PB se determinó por el método de toxicidad por contacto con *X. bispinatus* bajo la metodología reportada por Mostafa y colaboradores (2012)⁷³.

De una disolución en acetona de 2.0 mg/mL del EC-PB se tomó 1.0 mL que se distribuyó homogéneamente en la base de una caja Petri de vidrio de 80 mm x 15 mm (Sigma BR455732) y se colocaron en una superficie plana en una campana de extracción durante 24 h para eliminar las trazas de solvente. Las hembras se colocaron en las cajas impregnadas en grupos de 10 individuos/caja, seleccionadas de manera aleatoria y se mantuvieron a una temperatura de 23.0 ± 2.0 °C. Como control negativo se utilizó el vehículo en el que se disolvieron la muestras (acetona) y como control positivo aceite de esencial de neem al 100%. La lectura de mortalidad se registró a las 24 h y se descartaron los bioensayos con controles negativos superiores al 20% de mortalidad, considerando a

los individuos muertos como a toda hembra que no presentó movilidad ni respondió a un estímulo con pincel. Por cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones (ANEXO 2).

3.5 Evaluación de la actividad antifúngica.

La cepa utilizada de *Fusarium solani* fue proporcionada por el personal responsable del Laboratorio de Química de Productos Naturales del INECOL A.C. la cual fue amablemente donada por el Dr. Mauricio Luna (Profesor de tiempo completo de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana), mientras que la cepa de *Fusarium kuroshium* (HFEW-16-IV-019) fue proporcionada por personal técnico responsable del laboratorio de micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal del SENASICA, México. Ambas cepas se sembraron en agar papa dextrosa (PDA, Sigma-Aldrich) a 27 °C por 7 días para su reactivación previo a su uso.

3.5.1 Preparación de las muestras a evaluar.

Las muestras a evaluar (EC-PB y fracciones primarias) se disolvieron en un vehículo compuesto por H₂O-MeOH (85:15), posteriormente se mezclaron con PDA hasta obtener concentraciones de 5.0 mg/mL, 4.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 2.0 mg/mL y 1.0 mg/mL para el EC-PB y de 2.0 mg/mL para las fracciones primarias. Adicionalmente, las fracciones que resultaron más activas se evaluaron en el mismo ensayo a 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.2 mg/mL, respectivamente.

3.5.2 Preparación del inóculo.

Para la inoculación del medio de cultivo se preparó una suspensión de esporas a partir de la cepa de interés (*F. solani* o *F. kuroshium*) con 7 días de crecimiento previamente resembrada en una caja Petri (60 × 15 mm). Para esto, con un asa estéril se desprendió el micelio del hongo, este se sumergió en 10 mL de agua destilada estéril y a continuación, se agitó y filtró sobre papel filtro estéril. El sólido se descartó y el filtrado contenía las esporas (suspensión de esporas), posteriormente se determinó el número de esporas mediante microscopía usando un hemocitómetro (Cámara de Neubauer), se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de inóculo final de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL.

3.5.3 Ejecución del bioensayo.

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó utilizando el método de dilución en agar según el protocolo de Rizi y colaboradores (2015) con modificaciones⁷⁴. Brevemente, las muestras de interés (EC-PB y fracciones) se disolvieron en un vehículo de H₂O-MeOH (85:15) el cual se mezcló homogéneamente con medio de cultivo PDA, esta mezcla se vertió en una placa de 12 pozos con fondo plano a diferentes concentraciones con un volumen final de 1.0 mL. Como control positivo se utilizó tiabendazol (T5535-50G Sigma-Aldrich) disuelto en H₂O a una concentración de 1.0 mg/mL y como control negativo 0.5 mL del vehículo. Una vez solidificado el medio se colocaron en el centro de cada pozo 2.0 µL de una suspensión de esporas ajustada a una concentración 1 x 10⁶ UFC/mL. Las placas se incubaron a 27.0 ± 2.0 °C, se registraron los diámetros (mm) de crecimiento micelial de los tratamientos y el porcentaje de inhibición se reportó a las 48 h mediante la siguiente formula:

$$\text{Ecuación 1: Inhibición del crecimiento micelial (\%)} = \left(\frac{DC-DT}{DC} \right) \times 100$$

Donde DC es el diámetro promedio del micelio del control de crecimiento en milímetros y DT es el diámetro promedio del micelio del tratamiento en milímetros⁷⁵. En el caso de los ensayos con *F. solani* se realizaron 4 réplicas por muestra, mientras que para *F. kuroshium* se realizaron 3 réplicas por muestra.

3.5.4 Análisis microscópico de las hifas de *Fusarium kuroshium* por microscopía confocal de barrido láser (MCBL).

Los tratamientos que presentaron mayor actividad antifúngica contra *F. kuroshium* se les realizó un análisis microscópico para observar el daño estructural que el tratamiento generaba sobre las hifas del hongo. Para esto se realizaron cortes superficiales del micelio y se colocaron en crioviales de 2.0 mL. La cepa *F. kuroshium* se inactivó con *p*-formaldehído al 4% en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés).

Para realizar las observaciones microscópicas, las hifas del hongo *F. kuroshium* se marcaron con 50 µL de Calcofluor White (CFW) M2R (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1.0 g/L con 100 µL de solución PBS durante 15 min. Después, cada muestra se tomó con ayuda de unas pinzas y se colocó en el centro de una caja Petri con fondo de cristal y de 0.17 mm de grosor (MatTek Corporation, ashland, MA, USA) que

contenía 100 µL de la solución PBS. Con la finalidad de mantener las condiciones de humedad y evitar la deshidratación del material, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra. Las muestras teñidas con Calcofluor se registraron en el canal gris utilizando los objetivos Plan Apocromático de 40X (NA 1.25, seco) y 63X (NA 1.4, inmersión) a una longitud de onda de emisión entre 410 nm y 440 nm, y una longitud de onda de excitación de 405 nm. Este procedimiento también se realizó con el control de crecimiento (hifas de *F. kuroshium* sin tratamiento) y para el tratamiento con la fracción PB-H. El análisis se realizó en un microscopio confocal TCSSP8+STED (Leica Microsystems) con una versión de software 3.1.5.16308.

3.5.5 Análisis microscópico de las hifas de *Fusarium kuroshium* por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Las muestras analizadas por SEM se fijaron en solución de Karnovsky (Electron Microscopy Sciences, USA), posteriormente el material se lavó de 2-3 veces con PBS por cinco minutos de forma continua hasta retirar el exceso de fijador. Las muestras lavadas se deshidrataron en un gradiente de etanol (30-100%) durante 50 min para cada concentración, y posteriormente se secaron en un secador de punto crítico con CO₂ marca Quorum, modelo K850. Una vez secas las muestras, se colocaron en un porta-muestra cilíndrico de aluminio con cinta de carbón de doble cara y se cubrieron con oro-paladio en un pulverizador Quorum Q150.RS (Reino Unido) Las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido ambiental marca FEI Quanta modelo 250-FEG, a 5,000, 10,000 y 15,000X.

3.6 Evaluación de la actividad nematocida del EC-PB.

El ensayo se ejecutó utilizando la metodología descrita por Katiki y colaboradores (2011) con modificaciones⁷⁶. Se utilizaron cepas de *Panagrellus redivivus* preparadas por el Msc. Óscar Carmona Hernández quien es estudiante de Doctorado en el Laboratorio de Ecología Evolutiva de la Universidad Veracruzana, México. Dicha cepa se cultivó en un medio avena:agua (1:1). Los nematodos utilizados para los ensayos se encontraban en la etapa de desarrollo J4.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos, en cada pozo se depositaron 10 nematodos J4 extraídos en 50 µL de solución salina amortiguadora. Para llevar a cabo la extracción de los nematodos se tomaron 500 mg de medio de cultivo previamente inoculado por 10 días y se depositaron en 2.0 mL de solución salina amortiguadora, esta suspensión se sometió a centrifugación a 8000 rpm por 10 minutos, el sólido se descartó

y en el sobrenadante resultante se encontraron únicamente nematodos J4 y J5. Los J5 se diferenciaron de los J4 por su movilidad reducida.

La solución salina amortiguadora anteriormente mencionada y que se utilizó como medio para suspender los nematodos, se preparó disolviendo en un litro de agua 3.0 g KH_2PO_4 , 6.0 g Na_2HPO_4 , 5.0 g NaCl , 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

A continuación, se procedió a adicionar la cantidad necesaria de EC-PB y a realizar disoluciones seriadas hasta obtener concentraciones de 10 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.1 mg/mL y 0.01 mg/mL para un volumen final de 100 μL por pozo, mientras que las fracciones primarias con mayor potencial antifúngico se probaron a 2.0 mg/mL. Como control positivo se utilizó CuSO_4 a 5.0 mg/mL y como control negativo 100 μL de solución salina amortiguadora. La escogencia de los nematodos fue completamente al azar y el tiempo de exposición de 24 h a 22.0 ± 2.0 °C, transcurrido este tiempo se contabilizó el número de organismos muertos de manera visual utilizando para esto un microscopio marca Leica modelo DM750.

3.7 Metabolómica dirigida: Búsqueda de compuestos fenólicos

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC por sus siglas en inglés) modelo 1290 Infinity Agilent (Agilent Technologies), acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS-QqQ por sus siglas en inglés, 6460 Agilent Technologies).

Los compuestos fenólicos se identificaron y cuantificaron por co-elución con hasta 60 estándares de referencia bajo parámetros de ionización específicos para cada compuesto de acuerdo al método previamente reportado por Juárez-Trujillo y colaboradores (2018, Anexo 3)⁷⁷. Para la cuantificación de cada uno de los compuestos, se preparó una curva de calibración con un valor de linealidad de $R^2 \geq 0.99$, con un rango de concentración de 0.25 a 18 μM . Para la adquisición de las huellas espectrométricas se empleó el método de monitoreo dinámico de reacciones múltiples (dMRM, por sus siglas en inglés), la cuantificación de datos se llevó a cabo con el software MassHunter Workstation-Quantitative Analysis (versión B.06.00 SP01/Build 6.0.388.1) de Agilent Technologies. Las condiciones de operacionales del equipo se resumen en la Tabla 5.

Las muestras analizadas fueron el EC-PB y las fracciones PB-G y PB-H, las cuales se prepararon con 50 mg de muestra en 1.0 mL de MeOH con 0.1% de ácido fórmico, ambos grado MS (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se colocaron en un baño de ultrasonicación (Ultrasonic Bath Modelo 08895-91 Cole Parmer, México) durante 15 minutos para

facilitar su solubilidad, transcurrido este lapso se filtraron sobre acrodiscos de PTFE de 0.2 μm de tamaño de poro (Phenomenex) y el filtrado se recuperó para su posterior uso. Con el filtrado se realizaron diluciones seriadas en proporciones de 1:10, 1:100 y 1:1000.

Los resultados de cuantificación obtenidos con el EC-PB se expresaron como $\mu\text{g/g}$ de material vegetal seco, mientras que con las fracciones primarias se reportaron como μg de compuesto por fracción seca, para este se utilizó la concentración en μM reportada por el equipo y las ecuaciones 2 y 3 respectivamente.

$$\text{Ecuación 2: } \mu\text{g/g de material vegetal seco} = \frac{(\mu\text{M})(\text{FD})(\text{V})(\text{MM})(\text{mE})}{(\text{mm})(\text{mV})}$$

$$\text{Ecuación 3: } \mu\text{g de compuesto por fracción} = \frac{(\mu\text{M})(\text{FD})(\text{V})(\text{MM})(\text{mF})}{(\text{mm})}$$

Dónde:

μM = Concentración detectada por el equipo en μM

FD = Factor de dilución de la muestra

V = Volumen de solvente con el que se disolvió la muestra en litros

MM = Masa molecular del compuesto en g/mol

mE = masa del EC-PB total en gramos

mF = masa de la fracción en gramos

g = cantidad de analito en gramos

mV = gramos de material vegetal seco

mm = masa de la muestra en miligramos

Tabla 5. Condiciones operacionales para la metabolómica dirigida mediante UPLC-MS-QqQ.

| Separación cromatográfica | Tipo de inyección: | | ESI 1 μ L muestra | |
|-------------------------------------|---|--|-----------------------|--|
| | Columna: | ZORAX SB-C18 (1.8 μ m, 2.1 x 50 mm) | Flujo: 0.1 mL/min | |
| | | Temperatura de columna: 40 $^{\circ}$ C | | |
| | | Temperatura de muestra: 20 $^{\circ}$ C | | |
| Fase móvil: | A (Agua, AF 0.1%) y B (acetonitrilo, AF 0.1%), partiendo de 99% de A e incrementando linealmente la proporción de B | Gradiente | | |
| | | 0 min 1% B, 0.1-40 min 1-40% B, 40.1-42 min 40-90 B, 42.1-44 min 90% B, 44.1-46 min 90-1% B, 46.1-47 min 1% B. | | |
| Fuente de ionización: | Electrospray (ESI) | Modo Negativo y Positivo | | |
| Análisis de espectrometría de masas | Fuente: | 250 $^{\circ}$ C | | |
| | Temperatura de Desolvatación | 300 $^{\circ}$ C | | |
| | Flujo de gas | 5 L/min | | |
| | Presión del nebulizador | 45 psi | | |
| | Temperatura de gas | 250 $^{\circ}$ C | | |
| | Voltaje capilar | 3500 V | | |
| | Voltaje de nodo | 500 V | | |
| | Acelerador de voltaje | 7 V | | |
| Tiempo de exploración | 0.5 segundos | | | |

La cuantificación se realizó con base en una curva de calibración con 10 concentraciones (0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 μ M) de los estándares comerciales empleando una regresión cuadrática.

3.8 Metabolómica no dirigida por UPLC - MS – QToF.

Los perfiles metabólicos de las fracciones de *P. blanda* se obtuvieron siguiendo la metodología de Monribo-Villanueva y colaboradores (2019)⁷⁸, mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC, Acquity clase I, marca WatersTM) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución de tipo cuadrupolo y tiempo de vuelo (QToF, modelo HDMI Synapt G2-Si, marca WatersTM). Las condiciones de operación del equipo se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones operacionales para el análisis de metabolómica no dirigida mediante UPLC-MS-QToF.

| | | | |
|-------------------------------------|---|---|-------------------------------|
| Separación cromatográfica | Tipo de inyección: | ESI ⁺ (1.0 µL de muestra) | |
| | Tipo de columna: | Acquity BEH (1.7 mm, de 2.1 x 50 mm) Waters TM | Flujo: 0.1 mL/min |
| | | | Temperatura de columna: 40 °C |
| | | | Temperatura de muestra: 15 °C |
| Fase móvil: | Agua (FA 0.1%) y acetonitrilo (FA 0.1%), en un gradiente según la proporción de acetonitrilo. | Gradiente % de acetonitrilo: 0 min 1%, 0.1-10 min 1-40%, 10.1-12 min 40-95%, 12.1-13 min 95%, 13.1-14 min 95-5%, 14.1-15 min 5%. | |
| Análisis de espectrometría de masas | Fuente de ionización: | Electrospray (ESI) | Modo Positivo y negativo |
| | Temperatura: | Fuente: | 100 °C |
| | | Desolvatación: | 20 °C |
| | Especificaciones: | Flujo de gas de desolvatación: | 800 L/h |
| | | Presión del nebulizador: | 4 bares |
| | | Rango de masa: | 100 a 1200 m/z |
| Tiempo de exploración: | | 0.5 segundos. | |

Las fracciones analizadas fueron PB-G, PB-H y PB-I, a partir de estas se prepararon soluciones de 50 mg/mL en 0.1% de ácido fórmico en MeOH y se filtraron sobre acrodiscos de PTFE de 0.2 µm de tamaño de poro (Phenomenex).

Los datos de las relaciones masa-carga (m/z) y tiempo de retención (tR) obtenidos por el equipo se analizaron con los Softwares MassLynx y MarkerLynx, versión 4.1 de WatersTM, en el cuál, se realizó la búsqueda de las m/z de los iones moleculares en modo de ionización positivo. Con los datos cromatográficos y espectrométricos se realizaron análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y diagramas de dispersión (Volcano Plot) mediante el software MetaboAnalyst versión 4.0 (los parámetros matemáticos para la normalización se encuentran en el Anexo 4), esto con la finalidad de interpretar los datos metabolómicos mediante la comparación de los perfiles químicos entre las diferentes fracciones. Finalmente se identificaron de manera tentativa metabolitos de la fracción activa PB-H, esto se realizó por coincidencia de las huellas espectrométricas obtenidas experimentalmente en comparación con las reportadas en bases de datos públicas como Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) y The Human

Metabolome Database (<https://hmdb.ca>); cada identificación se clasificó de acuerdo a los niveles establecidos por Dunn y colaboradores (2013) como se resume en la Tabla 7⁷⁹.

Tabla 7. Niveles de confianza en la identificación de metabolitos.

| Nivel | Identificación | Evidencia |
|-------|--------------------------|--|
| 1 | Identificación validada | Requiere evidencia por RMN o comparación con estándar de referencia |
| 2 | Identificación tentativa | Coincidencia de datos de fragmentación con bibliotecas de metabolitos |
| 3 | Estructura tentativa | Coincidencia del ión precursor (m/z) con base de datos de metabolitos |
| 4 | Compuesto desconocido | Solo se conoce la masa exacta, tiempo de retención y formula molecular |

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Proceso de extracción y separación cromatográfica del EC-PB.

Se obtuvieron 9.3766 g de EC-PB a partir de la maceración de 55.2 g de material vegetal seco de las partes aéreas de *P. blanda* lo que representa un 16.99% de rendimiento respecto al peso de la droga cruda. Este rendimiento es similar al reportado por otras especies de la familia Piperaceae, por ejemplo, se obtuvo un rendimiento de 17.61% del extracto metanólico de *Piper sempervirens*, este rendimiento es relativamente similar y puede deberse a la gran diversidad y cantidad de metabolitos que biosintetizan las especies de la familia Piperaceae⁸⁰.

Al realizar el perfilamiento químico del EC-PB por CCF se determinó que su naturaleza era muy compleja debido a la gran cantidad de componentes presentes de diferentes polaridades, no obstante, el sistema que mostró mejor separación fue el conformado por HEX-AcOEt (25:75). Cuando se utilizó HEX-AcOEt (90:10) y AcOEt 100% (Figura 15), los componentes presentes eluyeron de manera diferencial por las distintas las fases móviles debido a su afinidad, logrando una separación parcial. Además, en todos los sistemas utilizados se observó la presencia de componentes en el punto de aplicación, que correspondieron a compuestos con mayor polaridad, los cuales presentaron gran afinidad con la fase estacionaria, motivo por el cual no se desplazaron del punto de aplicación.

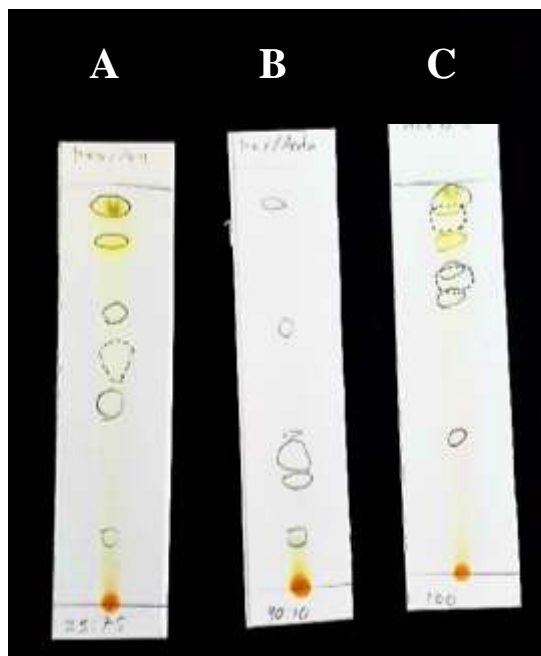


Figura 14. Resultado de la separación por cromatografía de capa fina del EC-PB, revelando con luz UV a 254 nm y 365 nm. A) HEX-AcOEt (25:75), B) HEX-AcOEt (90:10) y C) AcOEt 100%.

Luego de realizar el fraccionamiento del EC-PB se obtuvieron 205 eluatos más un eluato final que correspondió a la realización de un lavado de la columna con MeOH 100%, estos se sometieron a un análisis por cromatografía de capa fina para combinarse por similitud entre los factores de retención (RF) de los compuestos, finalizando este proceso se obtuvieron 26 fracciones primarias. En la Tabla 8 se detallan los eluatos combinados para formar las fracciones y el porcentaje de rendimiento de estos en función al peso de EC-PB adicionado a la columna.

En la Figura 16B se muestra un ejemplo sobre la combinación de eluatos para formar fracciones, se puede apreciar como el perfil cromatográfico de los eluatos 31 y 33 es muy similar, lo que quiere decir que su composición química no varía demasiado, por lo que se procedió a combinar dichos eluatos. De forma similar se combinaron 35 con 37 y 39 con 41 y así sucesivamente hasta obtener las 26 fracciones anteriormente mencionadas.

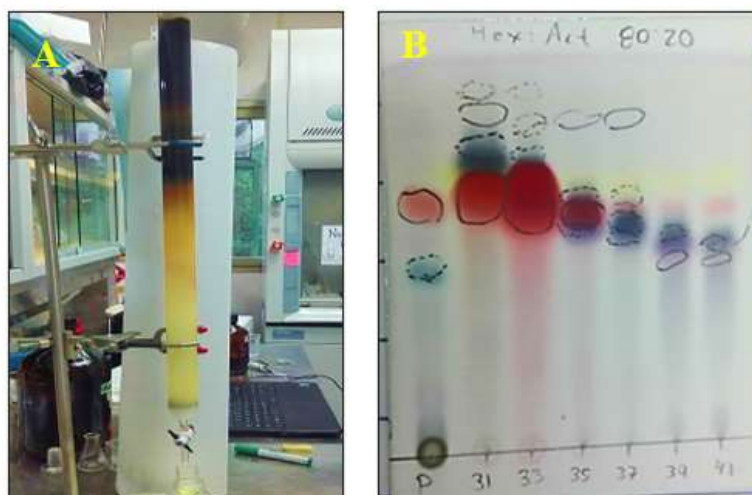


Figura 15. A) Columna cromatográfica utilizada en la separación del EC-PB, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y HEX-AcOEt (80:20) como fase móvil. B) Resultados de CCF de los eluatos 31, 33, 35, 37, 39 y 41 utilizando como fase móvil HEX-AcOEt (80:20).

Tabla 8. Resumen de los resultados de la combinación de eluatos producto del fraccionamiento por cromatografía en columna abierta (CCA).

| Eluatos combinados | Masa de la fracción (mg) | Porcentaje de rendimiento (%) | Clave de la fracción obtenida |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 6-24 | 4.80 | 0.0687 | PB-A |
| 25-28 | 293.40 | 4.1955 | PB-B |
| 29-30 | 11.70 | 0.1675 | PB-C |
| 31-34 | 186.70 | 2.6734 | PB-D |
| 35-37 | 44.10 | 0.6315 | PB-E |
| 38-42 | 129.50 | 1.7971 | PB-F |
| 43-49 | 262.60 | 3.7602 | PB-G |
| 50-71 | 213.80 | 3.0615 | PB-H |
| 72-80 | 61.60 | 0.8820 | PB-I |
| 81-86 | 65.70 | 0.9408 | PB-J |
| 87-94 | 72.60 | 1.0396 | PB-K |
| 95-99 | 68.60 | 0.9823 | PB-L |
| 100-104 | 55.90 | 0.8004 | PB-M |
| 105-107 | 53.10 | 0.7604 | PB-N |
| 108-110 | 66.70 | 0.9551 | PB-Ñ |
| 111-134 | 31.20 | 0.4468 | PB-O |
| 135-140 | 4.40 | 0.0630 | PB-P |
| 141-148 | 88.70 | 1.2701 | PB-Q |
| 149-150 | 46.60 | 0.6673 | PB-R |
| 151-153 | 27.00 | 0.3866 | PB-S |
| 154-158 | 43.70 | 0.6258 | PB-T |
| 159-162 | 44.10 | 0.6315 | PB-U |
| 163-169 | 223.20 | 3.1960 | PB-V |
| 170-192 | 1680.1 | 24.0247 | PB-W |
| 193-205 | 380.00 | 5.4413 | PB-X |
| 206* | 222.2 | 3.1774 | PB-Y |

*Eluato correspondiente al lavado final de la columna con 500 mL de MeOH 100%.

De los 6.9836 g de EC-PB aplicado en la columna solo se lograron recuperar 4.3820 g lo que equivale a un 62.75% de la composición original, esto quiere decir que el restante 37.25% de los componentes quedaron retenidos en la fase estacionaria de la columna, debido a la naturaleza altamente polar del gel de sílice los compuestos retenidos en él son de polaridad similar, ya que un disolvente de alta polaridad como el MeOH no logró la elución de estos de la columna.

4.2 Evaluación de la actividad insecticida del EC-PB.

A continuación, se muestran los resultados de la evaluación de la actividad insecticida del EC-PB mediante el método de toxicidad por contacto contra el coleóptero modelo *Xyleborus bispinatus*.

Tabla 9. Resultados de la actividad insecticida del EC-PB contra *X. bispinatus*.

| Muestra | Número de organismos muertos después de 24 horas de exposición | | | | | Mortalidad a las 24 horas (%) |
|------------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|
| | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 | Repetición 4 | Repetición 5 | |
| Control de crecimiento | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4.0 ± 0.55 |
| Control negativo | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2.0 ± 0.55 |
| Extracto a 2.0 mg/mL | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2.0 ± 0.55 |
| Aceite de neem | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 ± 0.00 |

Los resultados se expresan como el promedio del porcentaje de mortalidad de 5 réplicas ± DE.

Los resultados de la Tabla 9 demuestran que el EC-PB no tiene actividad insecticida contra *X. bispinatus* a la concentración utilizada, ya que la mortalidad obtenida por la muestra fue inclusive menor que la obtenida en el control de crecimiento. Por otro lado, *X. bispinatus* fue el organismo más resistente de todos los evaluados en esta investigación, por lo que no resulta insólito el resultado obtenido.

Actualmente, no se cuentan con reportes de plantas de Piperaceas con actividad contra insectos del género *Xyleborus* no obstante, existen numerosos reportes de especies dentro de la familia con actividad insecticida, tal es el caso de *Piper sarmentosum* cuyo extracto etanólico de las partes aéreas reportó un LD₅₀ de 0.14 a 25 µg/mL contra *A. aegypti*. Bajo esta línea se indica que en algunas especies la actividad insecticida se alcanza a concentraciones menores de extracto que las utilizadas en el experimento con *P. blanda*.⁸¹ Otro aspecto que es importante destacar es que el método de toxicidad por contacto si ha

sido utilizado para evaluar la actividad insecticida contra especies del género *Xyleborus*, como es el caso de la investigación realizada por Martínez (2020), donde obtuvo actividad contra *X. volvulus* utilizando fracciones de *Chamaedorea sp.* incluso a 1.0 mg/mL.⁸²

Pese a que el EC-PB de *P. blanda* no obtuvo actividad insecticida bajo las condiciones experimentales mencionadas, el EC-PB y fracciones si reportaron actividad contra fitopatógenos fúngicos y nematodos como se verá más adelante, esto quiere decir que el EC-PB posee actividad biocida selectiva, lo cual es bueno, ya que actualmente uno de los objetivos del estudio de los productos naturales es identificar alternativas no convencionales y con alto grado de selectividad al uso de plaguicidas sintéticos⁸³.

4.3 Evaluación de la actividad fungicida.

4.3.1 Actividad fungicida del EC-PB contra *F.solani* y *F. kuroshium*.

Los resultados de la Tabla 10 muestran como el EC-PB tiene efecto fungicida contra *F. solani*, dicho efecto es proporcional a la concentración de extracto utilizado en el bioensayo, lo cual era de esperarse, ya que una mayor cantidad de extracto significa una cantidad mayor de compuestos biocidas a los que se expone el microorganismo, consecuentemente este se traduce en un mayor efecto⁸⁴. Sin embargo, los resultados de porcentaje de inhibición obtenidos no son altos en comparación a los reportados por otras especies, por ejemplo Tornero-Conde, (2018) reportó $74.00 \pm 0.05\%$ de inhibición del extracto metanólico de las partes aéreas de *Piper sp.* a 2.0 mg/mL contra *F. solani*, resultado muy distante del 8.04% obtenido por *P. blanda* a ese valor de concentración, no obstante esto no quiere decir que *P. blanda* no tenga potencial como antifúngico, sino que los compuestos responsables de dicha actividad quizás se encuentran en muy baja concentración en el extracto crudo. Por lo tanto, se procedió a realizar el fraccionamiento químico biodirigido de PB-EC para reducir su complejidad y descartar aquellos compuestos inactivos o antagónicos y agrupar conjuntos de compuestos con mayor actividad⁸⁵. Adicionalmente, los resultados que se observan en la Figura 17 muestran poca disminución del diámetro de crecimiento micelial como se discutió anteriormente, no obstante, se puede observar como el diámetro de esporulación disminuyó considerablemente al aumentar la concentración de EC-PB, esto podría ser una señal de que el EC-PB tiene compuestos que afectan la capacidad de reproducción del hongo, sin embargo determinar el efecto en la esporulación del hongo luego de su exposición contra el EC-PB no formó parte de los objetivos de esta investigación.

Tabla 10. Resultados de la actividad antifúngica del EC-PB contra *F.solani* por el método de inhibición del crecimiento micelial.

| Muestra | Porcentaje de inhibición (%) |
|--------------------------------|------------------------------|
| MeOH -H ₂ O (85:15) | 0.35 ± 0.12 |
| EC-PB a 1.0 mg/mL | 5.94 ± 0.47 |
| EC-PB a 2.0 mg/mL | 8.04 ± 0.43 |
| EC-PB a 3.0 mg/mL | 10.14 ± 0.37 |
| EC-PB a 4.0 mg/mL | 15.73 ± 0.72 |
| EC-PB a 5.0 mg/mL | 38.11 ± 0.24 |
| Tiabendazol a 1.0 mg/mL (C+) | 100 ± 0.00 |

Los resultados mostrados son el promedio de cuatro réplicas realizadas reportadas como porcentaje ± desviación estándar

Otro aspecto por destacar de los resultados de la Tabla 10 es el porcentaje de inhibición de la mezcla MeOH-H₂O (85:15) utilizada para disolver las muestras de EC-PB, este resultado fue de 0.35%, lo que indica que los porcentajes de inhibición reportados corresponden casi en su totalidad a la muestra en evaluación, ya que el efecto del disolvente es despreciable. Adicionalmente cabe destacar que el control positivo tuvo 100% de porcentaje de inhibición, esto coincide con lo esperado teóricamente, ya que el tiabendazol es un compuesto químico con actividad fungicida preventiva y curativa por contacto de amplio campo de acción demostrada⁸⁶.

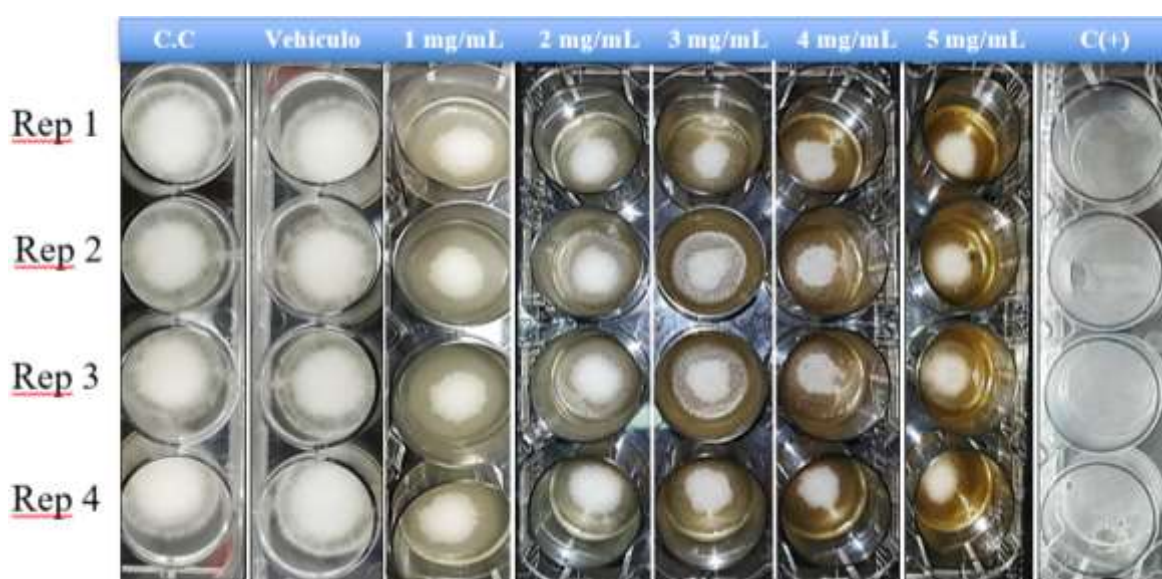


Figura 16. Resultados de la evaluación de la actividad antifúngica del EC-PB contra *F. solani* por el método de inhibición del crecimiento micelial.

4.3.2 Actividad fungicida de las fracciones del EC-PB contra *F. solani* y *F. kuroshium*.

Es necesario mencionar que las fracciones PB-A, PB-C y PB-P no se evaluaron debido a que el rendimiento obtenido no fue el suficiente para la realización del bioensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de la evaluación de la actividad fungicida de las fracciones obtenidas a 2.0 mg/mL contra *F. solani* por el método de inhibición del crecimiento micelial.

| Muestra | Porcentaje de inhibición (%) | Muestra | Porcentaje de inhibición (%) |
|---------|------------------------------|---------|------------------------------|
| PB-B | 38.1 ± 0.43 | PB-Ñ | 42.7 ± 0.54 |
| PB-D | 35.3 ± 0.31 | PB-O | 39.5 ± 0.55 |
| PB-E | 20.6 ± 0.43 | PB-Q | 8.4 ± 0.52 |
| PB-F | 35.3 ± 0.83 | PB-R | 24.5 ± 0.58 |
| PB-G | 100.0 ± 0.00 | PB-S | 20.6 ± 0.24 |
| PB-H | 100.0 ± 0.00 | PB-T | 16.4 ± 0.12 |
| PB-I | 27.6 ± 0.12 | PB-U | 25.5 ± 0.47 |
| PB-J | 22.4 ± 0.25 | PB-V | 3.5 ± 0.41 |
| PB-K | 43.4 ± 0.14 | PB-W | 22.7 ± 0.38 |
| PB-L | 48.6 ± 0.24 | PB-X | 25.9 ± 0.29 |
| PB-M | 38.8 ± 0.66 | PB-Y | 30.4 ± 0.43 |
| PB-N | 42.0 ± 0.25 | C (+)* | 100.0 ± 0.00 |

Los resultados mostrados son el promedio de cuatro réplicas realizadas reportadas como porcentaje ± desviación estándar

*C (+): Control positivo de tiabendazol a 1.0 mg/mL

Las fracciones con mayor actividad biológica fueron PB-G y PB-H (Figura 18), ambas fracciones consecutivas y alcanzaron un 100% de inhibición a una concentración de 2.0 mg/mL, estos resultados son considerados muy buenos para una fracción primaria, por ejemplo Tornero, (2018) mediante un fraccionamiento biodirigido de las partes aéreas de *Piper sp.* logró como máximo porcentaje de inhibición un 81.33% a 2.0 mg/mL contra *F. solani*⁸⁵, esto refuerza la idea discutida párrafos atrás, donde se planteó que la actividad biológica de un extracto crudo no es criterio suficiente para evaluar el potencial antifúngico de los componentes, ya que un extracto crudo bajo las mismas condiciones puede ser más activo que otro pero esto no implica que sus fracciones primarias también lo sean, debido a que en el extracto crudo se evalúa la concentración de componentes activos pero no su potencia⁸⁷.

PB-G es el resultado de la combinación de los eluatos que van desde el 43 hasta el 49, mientras que PB-H de los eluatos que van desde el 50 al 71 como se mostró en la Tabla 8, estas fracciones eluyeron de la columna en sistemas de fase móvil de HEX-AcOEt (60:40) y HEX-AcOEt (50:50), por lo que se podría inferir que los compuestos responsables de la mayor actividad antifúngica observada serían de una naturaleza con polaridad media, debido a la afinidad con su sistema de elución.

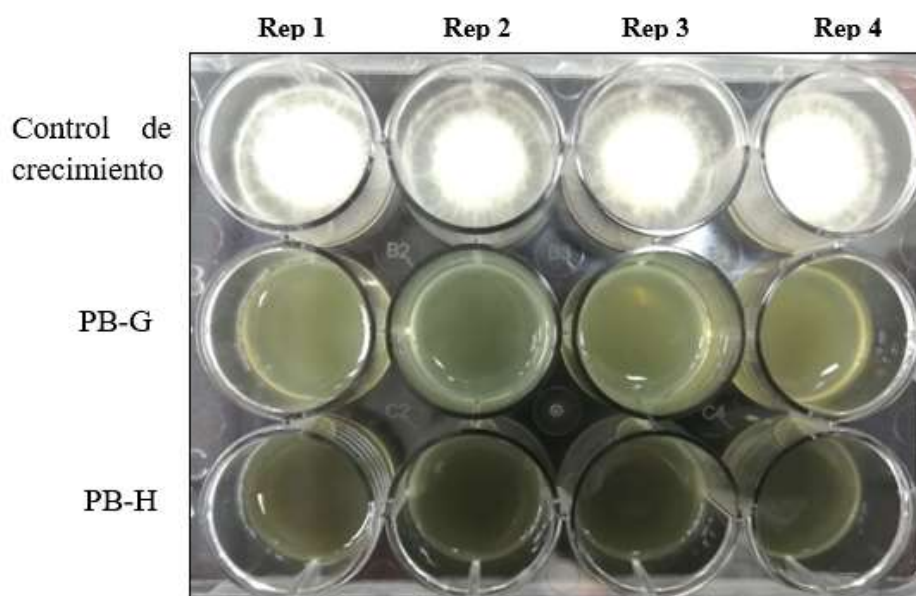


Figura 17. Resultado de la evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones PB-G y PB-H a 2.0 mg/mL contra *F.solani*

Los resultados de la evaluación de la actividad fungicida contra de *F. solani* se utilizaron como un primer acercamiento modelo para realizar bioensayos contra *F. kuroshium* debido a su cercana relación filogenética⁴². Una vez que se determinó cuáles eran las fracciones más activas contra *F. solani* se procedió a evaluarlas contra *Fusarium kuroshium* a distintas concentraciones, los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de la evaluación de la actividad fungicida de dos fracciones a diferentes concentraciones contra *F. kuroshium*.

| Muestra | Concentración (mg/mL) | Porcentaje de inhibición (%) |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| PB-G | 2.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 1.0 | 34.92 ± 0.58 |
| | 0.5 | 10.32 ± 0.29 |
| | 0.2 | 0.0 ± 0.0 |
| PB-H | 2.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 1.0 | 100.0 ± 0.0 |
| | 0.5 | 19.05 ± 0.50 |
| | 0.2 | 0.0 ± 0.0 |
| Vehículo | - | 0.0 ± 0.0 |
| Control positivo de tiabendazol | 0.2 | 100 ± 0.0 |

Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas realizadas reportados como porcentaje ± DE.

Los resultados de la Tabla 12 muestran que las fracciones PB-G y PB-H no solo tienen actividad fungicida frente a *F. solani*, sino que también contra *F. kuroshium*, sobre este último patógeno se determinó que la fracción PB-H es la más activa, ya que a una concentración de 1.0 mg/mL logró un porcentaje de inhibición de 100%, mientras que a esta misma concentración PB-G alcanzó porcentaje de inhibición del 34.92% (Figura 19). Además, se determinó que por debajo de 0.2 mg/mL ninguna de las fracciones evaluadas obtuvo efecto sobre el fitopatógeno.

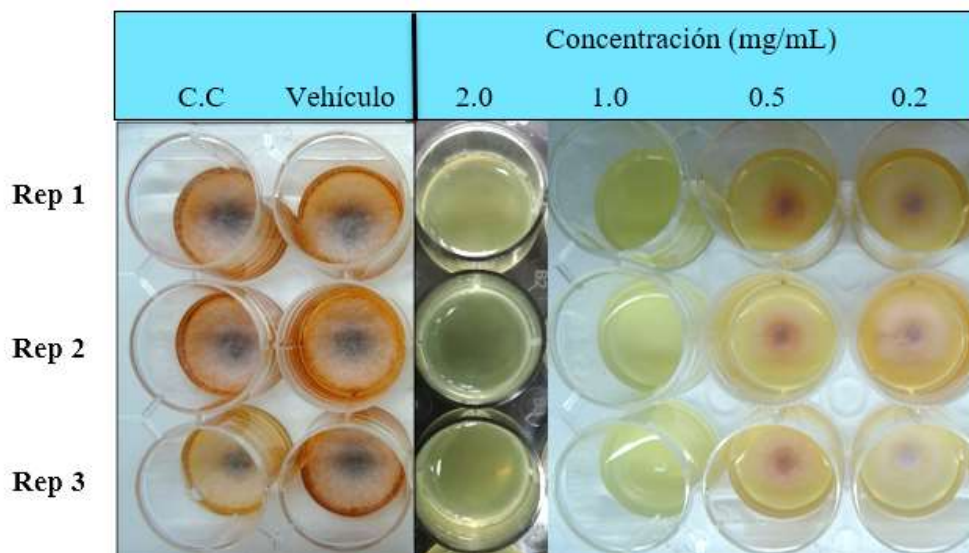


Figura 18. Resultado de la evaluación de la actividad antifúngica de la fracción PB-H contra *F. kuroshium*.

Debido a la problemática que representan las plagas de origen fúngico propias del continente, así como los emergentes complejos ambrosiales, cuya rápida distribución entre sus hospederos actualmente descritos, se teme que estas plagas se propaguen e incluso el número de hospederos de importancia económica, social y ornamental aumenten, de no encaminar esfuerzos de investigación pertinentes para hacer frente a la amenaza que representan. Es por esto que los resultados obtenidos sobre la actividad fungicida son muy alentadores, ya que representan una potencial alternativa no convencional al uso de agroquímicos sintéticos que tanto daño le ocasionan al medio ambiente y afectan la salud humana, además en el caso de *F. kuroshium* esta investigación es pionera, ya que la plaga emergente de los complejos ambrosiales es relativamente nueva en el continente y actualmente se cuentan con muy pocas investigaciones para combatirla mediante la utilización de productos naturales de origen botánico.

4.4 Análisis microscópico del daño mecánico en las hifas de *Fusarium kuroshium* provocado por la fracción PB-H.

4.4.1 Microscopía confocal de barrido láser (MCBL).

En la Figura 20 se presentan los resultados de los análisis de microscopía confocal de barrido láser (MCBL), donde se evidencia la acción de la fracción PB-H a 0.5 mg/mL que logró un $19.05 \pm 0.50\%$ de inhibición sobre el crecimiento de *F. kuroshium*.

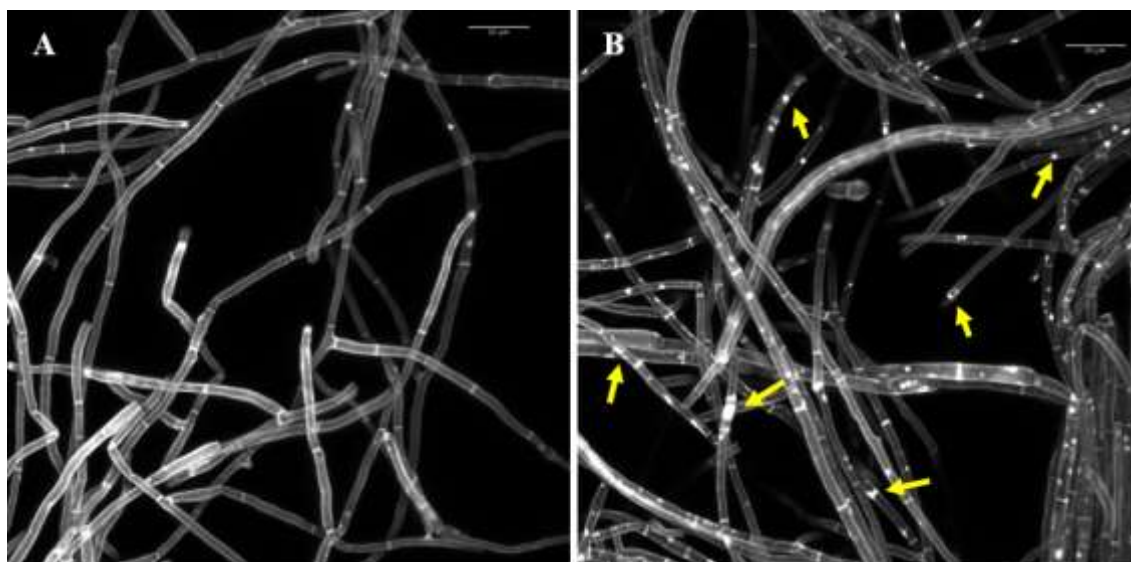


Figura 19. Micrografías de las hifas de *F. kuroshium*. A) Hifas sanas (control de crecimiento). B) Tratamiento con PB-H a 0.5 mg/mL. Todas las barras miden 20 μ m.

El CFW tiene alta afinidad por la quitina presente en las paredes celulares de hongos, permitiendo su detección y visualización mediante MCBL como manchas brillantes de

coloración blanquecina⁸⁸. En la figura 20 se puede apreciar como en el tratamiento con la fracción PB-H se visualiza una cantidad mucho mayor de quitina respecto al control de crecimiento (Figura 20B), lo cual es un indicativo de aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática provocado por un desequilibrio en la homeostásis celular. Este comportamiento ha sido reportado por García, (2019) en *Botrytis cinérea* y *Aspergillus niger* donde la intensidad de la fluorescencia en el interior de la pared celular refleja el daño provocado en el hongo⁸⁹. Adicionalmente, este mismo efecto ha sido reportado contra *F. kuroshium* en una investigación realizada por Murrieta, (2019) utilizando un extracto de *Cestrum nocturnum*¹¹.

4.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La Figura 21 muestra los daños presentes en la morfología de las hifas de *F. kuroshium* expuestas a la fracción PB-H que presentó mayor efecto inhibitorio.

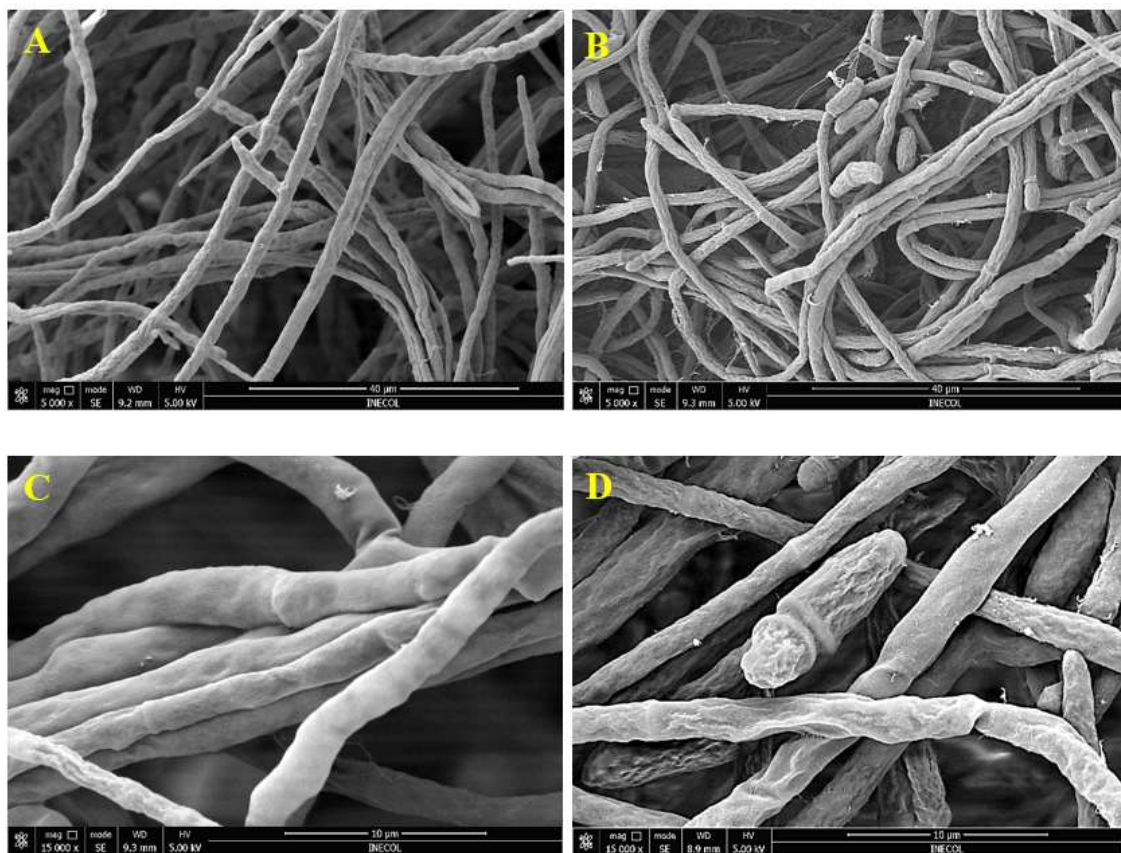


Figura 20. Micrografías de las hifas de *F. kuroshium*. A) Control de crecimiento a 40 μm. B) Tratamiento con PB-H a 0.5 mg/mL a 40 μm. C) Control de crecimiento a 10 μm. D) Tratamiento con PB-H a 0.5 mg/mL a 10 μm.

En la Figura 21B y 21D se observan alteraciones en la morfología hifal, deformación micelial severa, hifas marchitas, superficies porosas, agrietamientos en la superficie y una

disminución en el tamaño de las hifas de *F. kuroshium*, mientras que en el control (Figura 21A y 21C) se aprecia una estructura lisa, gruesa y alargada. Estos resultados fueron consistentes con la microscopía confocal de barrido láser, por lo que se plantea la hipótesis de que en la fracción PB-H hay componentes que generan daño en la pared celular de *F. kuroshium* causando desequilibrio iónico explicando de esta forma el mecanismo de acción de la actividad fungicida mostrada⁸⁹.

Los resultados de los análisis microscópicos obtenidos en esta investigación son similares a los encontrados por Soylyu y colaboradores (2010), en este estudio se encontraron agregados hifales reducidos, diámetros reducidos y la lisis de la pared hifal debido a la exposición de aceite esencial de orégano contra *Botrytis cinérea*, que también es un fitopatógeno⁹⁰. Adicionalmente en otro estudio realizado por Venegas y colaboradores (2005) se identificaron daños en las hifas de *F. solani* y *F. oxysporum* como micelios ligeramente más delgados y menos densos. Comparando estos resultados con los obtenidos por la fracción PB-H es posible sugerir que el efecto antagónico contra *F. kuroshium* se deba a una alteración de las hifas o bien la perforación de la pared celular⁹¹.

4.5 Evaluación de la actividad nematocida.

Los nematodos utilizados para este ensayo fueron de edad J4, ya que es en este periodo del ciclo de vida de dichos organismos donde penetran las raíces e infectan a los hospederos con mayor frecuencia y efectividad⁹².

4.5.1 Evaluación del EC-PB.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad nematocida del EC-PB contra *P. redivivus* se encuentran en la Tabla 13.

Tabla 13. Evaluación de la actividad nematocida del EC-PB contra *P. redivivus*.

| Muestra | Número de organismo muertos | Mortalidad a las 24 horas (%) |
|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| EC-PB a 10 mg/mL | 0 | 0.0 ± 0.0 |
| EC-PB a 1.0 mg/mL | 0 | 0.0 ± 0.0 |
| EC-PB a 0.1 mg/mL | 0 | 0.0 ± 0.0 |
| EC-PB a 0.01 mg/mL | 0 | 0.0 ± 0.0 |
| C.C | 0 | 0.0 ± 0.0 |
| CuSO ₄ 0.01 | 10 | 100 ± 0.0 |

Los resultados mostrados son el promedio de 5 réplicas realizadas ± DE

Los resultados de la Tabla 13 muestran que el EC-PB no tiene actividad nematocida contra *P. redivivus* a ninguna de las concentraciones probadas, ya que en todas ellas la mortalidad obtenida fue igual a cero, mientras que como era de esperarse el control positivo (CuSO₄) tuvo un 100% de mortalidad, debido a la actividad nematocida demostrada de este compuesto, quien es catalogado como tóxico agudo con DL₅₀ oral (rata) = 472.5 mg/kg⁹³.

4.5.2 Evaluación de las fracciones PB-G y PB-H.

Tabla 14. Evaluación de la actividad nematocida de las fracciones PB-G y PB-H contra *P. redivivus*.

| Muestra | Número de organismo muertos | Mortalidad a las 24 horas (%) |
|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| PB-G a 0.4 mg/mL | 10 | 100.0 ± 0.0 |
| PB-H a 0.4 mg/mL | 10 | 100.0 ± 0.0 |
| Control de crecimiento | 0 | 0.0 ± 0.0 |
| CuSO ₄ 0.01 | 10 | 100 ± 0.0 |

Los resultados mostrados son el promedio de 5 réplicas realizadas ± DE

Los resultados de la Tabla 14 muestran que las fracciones PB-G y PB-H son altamente activas contra *P. redivivus* al obtener un 100% de mortalidad incluso a una concentración relativamente baja como lo son 0.4 mg/mL. Por ejemplo, Cunha y colaboradores (2003) al evaluar la actividad nematocida de diferentes extractos de plantas, el valor de mortalidad máximo que reportaron contra *P. redivivus* fue de 93.26%, el cual se obtuvo para el extracto en AcOEt de *Leucaena leucocephala* a una concentración de 200 mg/mL. La concentración utilizada por Cunha, y colaboradores (2003) fue 500 veces mayor que la utilizada en esta investigación y que además obtuvo mejores resultados⁴⁰.

Estos resultados son muy alentadores y representan un potencial alternativa al uso de nematocidas sintéticos, además se reafirma que las fracciones PB-G y PB-H son activas contra *F. solani*, *F.kuroshium* y *P. redivivus*.

Los pasos siguientes para futuras investigaciones bajo esta línea serían determinar el LD₅₀ y CL₅₀ de dichas fracciones y realizar ensayos *in vivo* que permitan determinar si la actividad se mantiene en estos sistemas biológicos.

4.6 Metabolómica dirigida: búsqueda de compuestos fenólicos.

Mediante el método de monitoreo dinámico de reacciones múltiples (dMRM) se lograron identificar y cuantificar hasta 24 compuestos fenólicos diferentes presentes en el EC-PB (Tabla 15), de los cuales luteolina, luteolina-7-*O*-glucósido y ácido-3,4-dihidroxibenzóico son los más abundantes (Figura 22A, 22B y 22C) con 71.36, 23.57 y 21.21 µg/g de material vegetal seco respectivamente. Luteolina (21) y luteolina-7-*O*-glucósido (18) son compuestos pertenecientes a la familia de los flavonoides, y su biosíntesis sigue la vía metabólica de los fenilpropanoides, siendo sus anillos se derivados de las vías del acetato-malonato y del ácido shikímico. La unidad iniciadora es la *p*-cumaril-CoA, posteriormente se incorporan tres unidades de maolinil-CoA dando lugar a la estructura de la chalcona, que sufre posteriormente varias reducciones e hidroxilaciones, las plantas son capaces de formar los flavonoides⁹⁴. De los flavonoides se han reportado múltiples actividades biológicas como antibacteriana, antialérgica, antifúngica, sin embargo, la más importante es la antioxidante que resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de iones como Fe²⁺ y secuestradoras de radicales libres. En una investigación realizado por Pérez (2003) se reportó que la luteolina suprimió la reacción de Fenton (proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo) interfiriendo la onda catalítica

voltamétrica, característica del complejo Fe-ATP/H₂O₂, en un ensayo de espectroscopia de absorción⁹⁵. La presencia de estos flavonoides en altas concentraciones en el EC-PB puede asociarse a la alta actividad antioxidante mencionada por Wafa y colaboradores (2018) quien con su equipo de trabajo reportó $36.81 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ de IC₅₀ contra el radical DPPH, lo que se traduce en una alta capacidad antioxidante⁹⁶.

Adicionalmente 13 de los compuestos fenólicos identificados han mostrado actividad antifúngica contra especies del género *Fusarium* como *F. oxysporum*, dichos compuestos son: ácido gálico (2), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3), ácido-4-hidroxibenzoico (4), ácido gentísico (5), ácido vainillínico (7), ácido cafeico (10), ácido-4-cumárico (12), ácido ferúlico (13), ácido-3-cumárico (14), ácido sinápico (15), quercetina (20), luteolina (21) y apigenina (22). Esto sugiere que la actividad biológica del EC-PB descrita en el apartado 4.3 puede deberse en parte a la presencia de estos compuestos, principalmente a los que se encuentran en mayor concentración como luteolina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido-4-hidroxibenzoico²⁵. En el anexo 5 se encuentran todas las estructuras químicas de los compuestos fenólicos identificados.

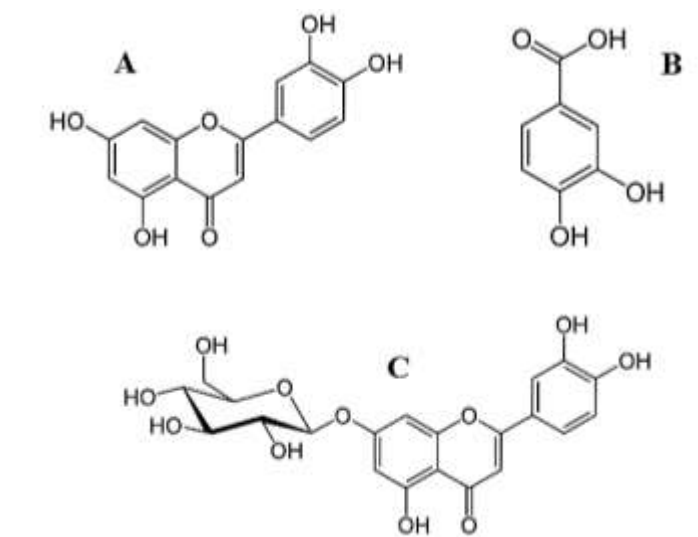


Figura 21. Principales compuestos fenólicos identificados. A) Luteolina. B) Ácido-3,4-dihidroxibenzoico. C) Luteolina-7-O-glucósido.

Tabla 15. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos en el EC-PB por dMRM.

| Categoría química | Compuesto | Concentración ($\mu\text{g/g}$) |
|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Fenoles simples | Vainillina (1) | 0.63 ± 0.01 |
| Ácidos fenólicos y fenil acéticos | Ácido gálico (2) | 0.25 ± 0.01 |
| | Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3) | 21.21 ± 0.40 |
| | Ácido-4-hidroxibenzoico (4) | 15.61 ± 0.16 |
| | Ácido gentísico (5) | 14.47 ± 0.16 |
| | Ácido-4-hidroxifenilacético (6) | 12.87 ± 0.62 |
| | Ácido vainillínico (7) | 6.12 ± 0.12 |
| | Ácido salicílico (8) | 16.45 ± 0.15 |
| Ácidos cinámicos | Ácido anísico (9) | 0.19 ± 0.01 |
| | Ácido cafeíco (10) | 0.32 ± 0.00 |
| | Ácido clorogénico (11) | 1.10 ± 0.04 |
| | Ácido-4-cumárico (12) | 3.39 ± 0.02 |
| | Ácido ferúlico (13) | 2.79 ± 0.04 |
| | Ácido-3-cumárico (14) | 0.79 ± 0.01 |
| | Ácido sinápico (15) | $0.19 \pm 0.00^*$ |
| Ácido rosmarínico (16) | 0.34 ± 0.05 | |
| Flavonoides | Ácido trans cinámico (17) | $0.10 \pm 0.01^*$ |
| | Luteolina-7-O-glucósido (18) | 23.57 ± 0.34 |
| | Naringina (19) | 0.73 ± 0.11 |
| | Quercetina (20) | 0.51 ± 0.02 |
| | Luteolina (21) | 71.36 ± 1.06 |
| Aminoácidos | Apigenina (22) | 4.50 ± 0.02 |
| Lignanos | Fenilalanina (23) | 0.21 ± 0.00 |
| | Secoisolariciresinol (24) | 2.42 ± 0.03 |

Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas y se reportan como $\mu\text{g/g}$ de droga cruda \pm desviación estándar

*Concentración por debajo del límite de cuantificación.

4.6.1 Metabolómica dirigida en las fracciones PB-G y PB-H

Las concentraciones de los compuestos fenólicos encontrados en las fracciones PB-G y PB-H se encuentran en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos en fracciones PB-G y PB-H por dMRM.

| Compuesto fenólico | Cantidad de compuesto encontrado por fracción (µg) | |
|-------------------------------|--|-------------|
| | Fracción H | Fracción G |
| Ácido- 3,4- dihidroxibenzoico | 1.53 ± 0.08 | 0 |
| Ácido-4- hidroxibenzoico | 2.85 ± 0.03 | 0.4 ± 0.003 |
| Ácido vainillínico | 0.47 ± 0.01 | 0 |
| Vainillina | 6.10 ± 0.04 | 0 |
| Ácido-trans-cinámico | 0.28 ± 0.01 | 0 |
| Luteolina | 0.81 ± 0.01 | 0 |
| Naringina | 3.38 ± 0.03 | 0 |
| Citroptena (25) | 0.66 ± 0.08 | 0 |
| Emodina (26) | 0.36 ± 0.002 | 0 |

Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas y se reportan como µg de droga cruda por fracción ± desviación estándar

La cantidad de compuestos fenólicos diferentes encontrados en las fracciones PB-G y PB-H fue de 9, resultado mucho menor a los 24 compuestos encontrados en el EC-PB, este resultado era de esperarse debido a que el grado de complejidad del EC-PB es mucho mayor que en las fracciones, debido a la separación de componentes realizados por cromatografía de columna. No obstante, en la fracción PB-H se encontraron 2 compuestos fenólicos que no fueron detectados en el EC-PB, debido a que sus concentraciones estaban por debajo del límite de cuantificación inferior utilizado, estos son citroptena (5,7-dimetoxicumarina, 25) y emodina (26). Citroptena es clasificado como una cumarina comúnmente encontrada en el aceite esencial de los cítricos como la bergamota y el limón que mayoritariamente se utiliza para el desarrollo de productos cosméticos⁹⁷. Por su parte emodina es una antroquinona que ha mostrado actividad contra *Staphylococcus aureus* cuyo valor de citotoxicidad es de 42.5 µM⁹⁸. Adicionalmente tanto citroptena como emodina son la primera vez que se reportan para *Peperomia blanda*, lo que representa un aporte quimiotaxonómico valioso para esta especie.

Otro aspecto destacable de los resultados de la Tabla 14 es que la fracción PB-H es mucho más rica en compuestos fenólicos que su análoga PB-G, ya que el ácido-4-hidroxibenzoico es el único que comparten. El compuesto fenólico mayoritario en PB-H es vainillina, este es el componente principal del extracto de vainilla ampliamente

utilizado en la industria alimenticia por sus propiedades aromatizantes y saborizantes; adicionalmente este compuesto tiene actividad antidrepanocítica* demostrada por lo que se han realizado investigaciones para utilizarla como tratamiento contra la anemia drepanocítica, ya que se evidenció que este compuesto puede atravesar la membrana eritrocitaria desde el plasma, concentrarse en el citosol e interactuar con la hemoglobina mutada (HbS), inhibiendo su polimerización. De esta manera, la vainillina mejora la funcionalidad del eritrocito debido a que incrementa el número de moléculas de HbS en estado soluble⁹⁹. Sin embargo, su presencia en la fracción PB-H no justifica la actividad biológica contra nematodos y hongos mostrada en esta investigación, por lo que dicha actividad debe ser responsable de otros compuestos.

El segundo compuesto fenólico encontrado en la fracción PB-H más abundante fue naringina, este es un flavonoide glicosilado de naringenina comúnmente presente en los cítricos. Este compuesto posee diversas propiedades farmacológicas y biológicas tales como actividad antioxidante, disminución de los lípidos en la sangre, actividad anticancerígena e inhibición de enzimas del citocromo P450 seleccionadas, incluidas CYP3A4 y CYP1A2¹⁰⁰. El hallazgo del alto contenido de naringina encontrado en la fracción PB-H motiva la posibilidad de que se realicen futuras investigaciones para evaluar su actividad biológica y utilizar a *P. blanda* como una fuente alternativa de este compuesto.

Por otra lado, el ácido-3,4-dihidroxibenzoico, ácido-4-hidroxibenzoico, ácido vainillínico y luteolina también fueron encontrados en la fracción PB-H, dichos compuestos han reportado actividad fungicida por lo que resulta muy interesante pensar que la actividad antifúngica exhibida por esta fracción contra *F. fusarium* y *F. kuroshium* puede deberse en parte o en su totalidad a la presencia de estos compuestos. En caso de ser así, el ácido-4-hidroxibenzoico sería el principal responsable debido a su alta concentración relativa respecto a los otros²⁵.

4.7 Perfilamiento químico por UPLC-MS-QToF

Una vez que se determinó que la fracción PB-H resultó ser la más activa se realizó un perfilamiento químico por UPLC-MS-QToF de esta y de las fracciones adyacentes en orden elución de la columna, tanto superior como inferior (PB-G y PB-I respectivamente). El perfilamiento se realizó al traducir los datos analíticos de las relaciones masa/carga y tiempos de retención generados por el equipo en información para realizar una búsqueda

*Actividad antidrepanocítica: es un trastorno de la sangre heredado que se caracteriza por la generación de hemoglobina defectuosa. 49

de posibles metabolitos responsables de la actividad biológica obtenida, y realizar análisis metabolómicos comparativos.

En las fracciones PB-G, PB-H y PB-I se detectaron un total de 958 y 6835 m/z distintas, tanto en modo positivo y negativo de ionización respectivamente. Estos números no corresponden a la cantidad de compuestos diferentes detectados, ya que también pueden corresponder a fragmentos, sin embargo, esta elevada cantidad representa la existencia de una gran diversidad de moléculas en dichas fracciones (Tabla 17).

Tabla 17. Cantidad de relaciones masa carga detectadas por UPLC-MS-QToF

| Fracción | Cantidad de relaciones masa cargas detectadas | |
|----------|---|---------------|
| | Modo positivo | Modo negativo |
| PB-G | 291 | 2326 |
| PB-H | 298 | 2333 |
| PB-I | 369 | 2176 |
| Total | 958 | 6835 |

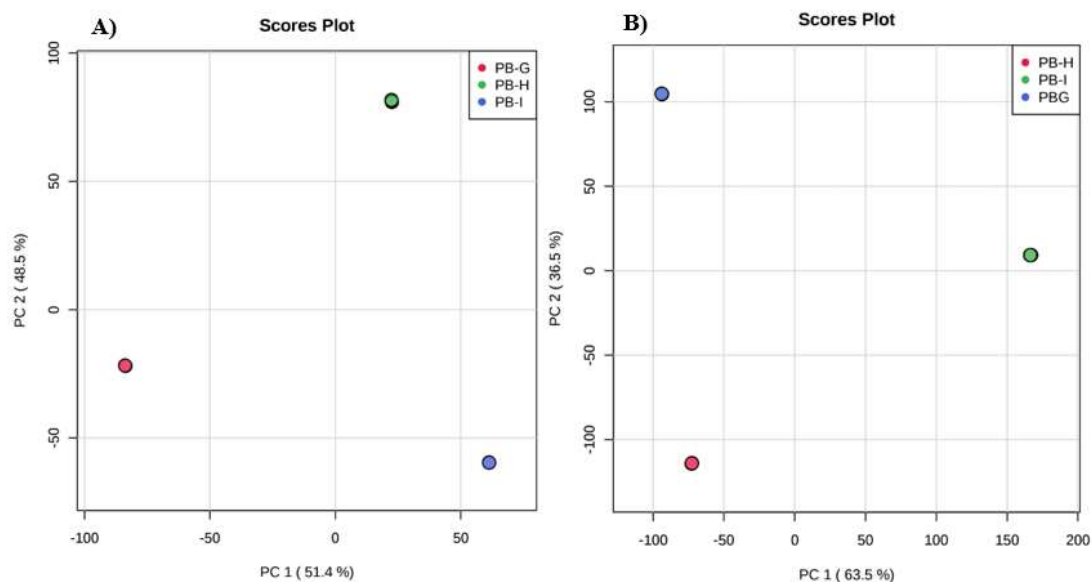
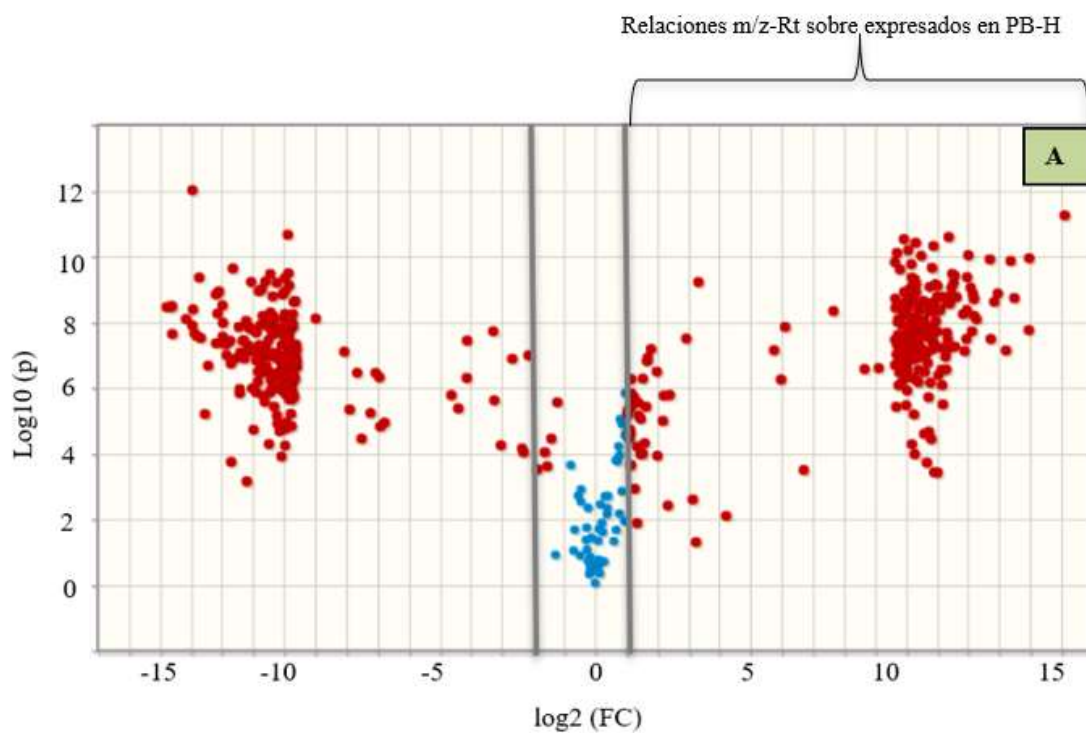


Figura 22. Diagramas de componentes principales (PCA) de las fracciones PB-G, PB-H y PB-I A) Por ESI⁺. B) Por ESI⁻.

En la Figura 23 se observan los análisis de componentes principales realizados en conjunto a las fracciones PB-G, PB-H y PB-I, en modo positivo se puede notar que los puntos correspondientes a cada fracción están distantes entre sí, esto significa que a pesar

de ser fracciones consecutivas en orden de elución, tienen gran varianza entre sus tiempos de retención, intensidad de las señales y m/z, lo que demuestra que las tres fracciones presentan diferencias significativas en su composición química. En modo negativo se mantiene la tendencia observada en modo positivo, al observarse lejanía entre los puntos de las muestras en el PCA, lo que se traduce en una diferencia en la composición química de las fracciones. Esto demuestra preliminarmente que la conformación de fracciones mediante la combinación de eluatos por similitud de bandas por CCF hecha inicialmente fue bastante efectiva, no obstante, se realizaron diagramas de volcán para proporcionar un acercamiento más preciso respecto a las diferencias distintivas entre las muestras (Figura 24).



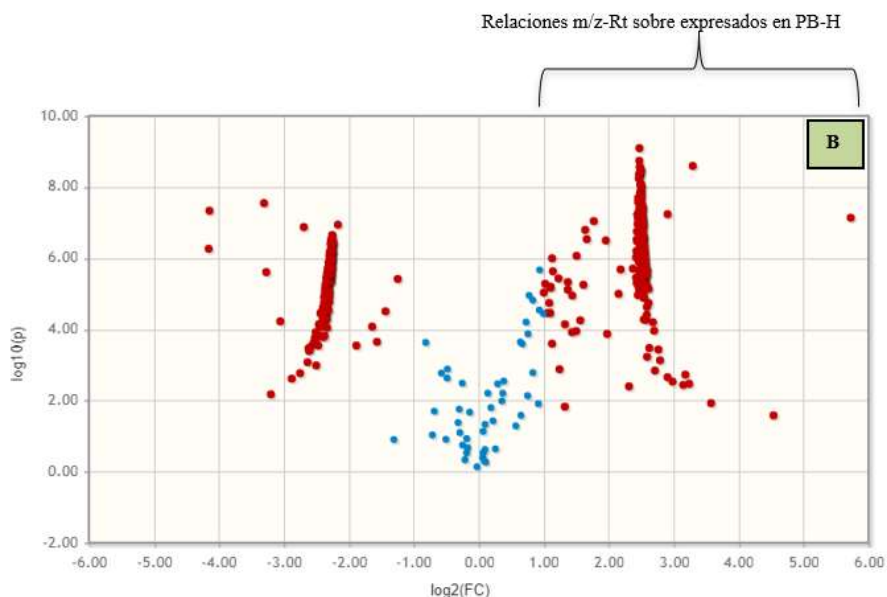


Figura 23. Gráficos de volcán obtenidos con datos de ESI⁺. A) Fracción PB-H vs PB-H. G) Fracción PB-H vs PB-I.

En los gráficos de volcán se puede apreciar como las fracciones PB-G y PB-I tienen niveles poco similares respecto a la fracción PB-H. La información proporcionada por estos gráficos se utilizó para enfocar las identificaciones tentativas únicamente en las zonas con los niveles más altos en componentes presentes en PB-H, ya que se sugieren que sean las moléculas biológicamente más activas¹⁰¹.

4.7.1 Identificaciones tentativas.

Al realizar la búsqueda de metabolitos en bases de datos se identificaron tentativamente algunos compuestos que se describen a continuación.

- Niloticina

La niloticina (C₃₀H₄₈O₃, Figura 25), se identificó tentativaente con un nivel de confianza 2, según la clasificación de Dunn y colaboradores (2013), esto con un ión molecular [M+H]⁺ de 457.3672 a un tiempo de retención de 9.38 min, con una coincidencia de los fragmentos 217.164, 421.3470 y 439.3539 de acuerdo con la base de datos Metlin (Anexo 6. Figura 28 y 29). Se trata de un triterpeno considerado como citotóxico que se ha probado in vitro contra *Aedes aegypti* L, quien es el vector primario de la transmisión de arbovirus responsable de ocasionar enfermedades importantes como el dengue, el dengue hemorrágico y la fiebre chikungunya¹⁰². Reegan y colaboradores (2014), aislaron la niloticina de *Limonia acidissima* L y evaluaron su actividad ovicida y larvicida contra *Aedes aegypti* L, el compuesto presentó 83,2% de actividad ovicida a una concentración

de 2.0 ppm a las 120 horas de exposición, mientras que a 2.0 ppm se obtuvo un 100% de actividad larvicida a las 24 horas de exposición y se obtuvo un valor de LC₅₀ de 0.44 ppm¹⁰².

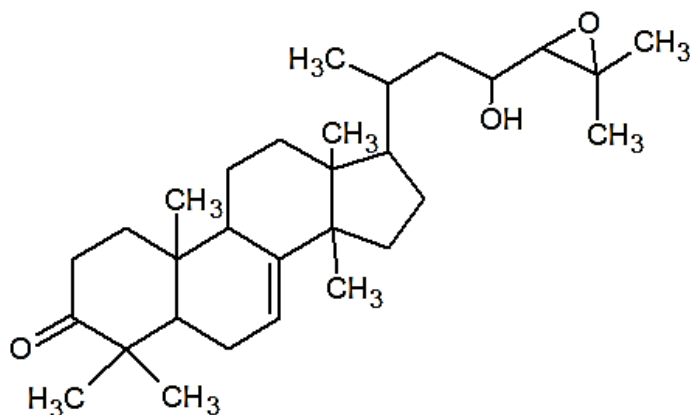


Figura 24. Estructura química de la nilotocina.

Es la primera vez que la nilatocina se describe en *P. blanda*, no se tienen reportes de la actividad biológica de este compuesto contra las plagas analizadas en esta investigación. Sin embargo, dado su historial como molécula citotóxica es probable que su presencia en *P. blanda* esté relacionada con la actividad biológica mostrada de sus fracciones contra *F. solani*, *F. kuroshium* y *P. redivivus*, aunque para validar esta suposición se necesitaría realizar bioensayos para determinar la actividad biológica de la nilotocina contra los organismos mencionados y confirmar su identidad con estándares químicos.

- Dilapiol

El dilapiol (C₁₂H₁₄O₄, Figura 26), se identificó tentativamente con un nivel de confianza 2, según la clasificación de Dunn y colaboradores (2013), esto con un ión molecular [M+H]⁺ de 223.1388 a un tiempo de retención de 0.92 min, con una coincidencia de los fragmentos 135.1174, 163.1121 y 179.0394, de acuerdo con la base de datos The Human Metabolome Database. Se trata de un fenilpropanoide comúnmente encontrado en diferentes especies de la familia piperácea como *Piper aduncum*, *Piper banksii*, *Piper guineense*, *Piper novae hollandiae*, *Piper marginatum* entre otras, también se ha encontrado especies del género como *Peperomia pellucida*. Estudios han revelado que el dilapiol posee actividad antiinflamatoria, acaricida, repelente, insecticida, fungicida entre otros^{103,104}.

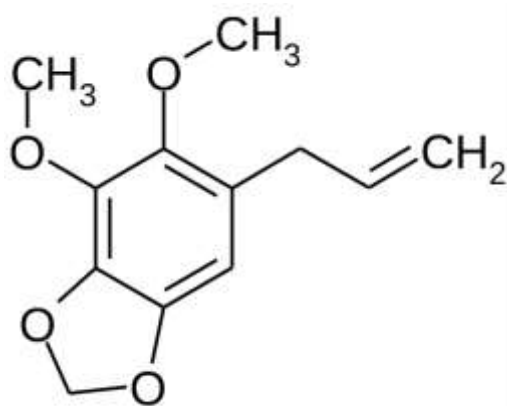


Figura 25. Estructura química del dilapiol.

Dilapiol ha mostrado actividad fungicida ante diferentes especies como *R. stolonifera* y *Fusarium moniliforme*, este último, es el principal hongo patógeno que afecta la productividad del maíz en el mundo, penetra a la planta por distintas rutas e infecta raíces, tallo y mazorca. Además, produce varias toxinas en el tejido y en los granos del maíz, lo cual disminuye su calidad¹⁰⁵. Los efectos reportados contra *Fusarium moniliforme* resultan particularmente interesantes, debido a que en esta investigación se evaluó la actividad fungicida sobre especies del género *Fusarium*, lo que podría indicar que parte de la actividad fungicida observada contra *F. solani* y *F. kuroshium* de las fracciones activas de *P. blanda* pueda deberse a la presencia de este compuesto. Adicionalmente debido a la presencia de dilapiol es probable que *P. blanda* también tenga actividad contra *Fusarium moniliforme* y pueda eventualmente utilizarse como tratamiento no convencional¹⁰⁴.

5 Conclusiones

El EC-PB no mostró actividad biocida contra *Xyleborus bispinatus* y *Panagrellus redivivus* pero mostró moderada actividad fungicida contra el fitopatógeno *Fusarium solani*, posteriormente, el estudio químico biodirigido permitió disminuir la complejidad de este y concentrar la actividad biológica.

Las fracciones primarias PB-G y PB-H fueron las más activas contra *Panagrellus redivivus*, *Fusarium solani* y *Fusarium kuroshium*.

La fracción PB-H contiene compuestos que provocan alteraciones en la morfología hifal, como lo son deformación micelial severa, hifas marchitas, superficies porosas, agrietamientos en la superficie y una disminución en el tamaño de las hifas; lo que causa

daño en la pared celular de *F. kuroshium* generando desequilibrio en la homeostásis celular.

La elevada concentración y diversidad de compuestos fenólicos con actividad biocida demostrada como ácido-3,4-dihidroxibenzóico, ácido-4-hidroxibenzóico, ácido vainillínico y luteolina en la fracción PB-H pueden estar asociados a la actividad biológica obtenida por dicha fracción.

Los compuestos dilapiol y niloticina identificados tentativamente en la fracción PB-H pueden contribuir con la actividad biológica exhibida por esta fracción.

Esta investigación contribuye con el conocimiento quimiotaxonómico y actividad biológica de *P. blanda* al determinar la existencia de varios compuestos por primera vez en la especie, pero previamente reportados a nivel de familia botánica.

Los hallazgos de esta investigación constituyen el primer reporte de bioactividad y fitoquímica de la especie como alternativa no convencional al uso de pesticidas sintéticos contra fitopatógenos de importancia nacional e internacional.

6 Perspectivas

Replicar la experimentación hecha en esta investigación utilizando *P. blanda* recolectada en el bosque tropical húmedo costarricense.

Determinar las concentraciones fungicidas y nematicidas mínimas de los extractos, fracciones y compuestos puros activos.

Corroborar la actividad biológica del PB-EC y PB-H mediante otras metodologías y modelos biológicos similares a los utilizados en esta investigación para estimar su potencial como agentes de control biológico.

Describir el mecanismo mediante el cual los compuestos activos provocan alteraciones en la morfología hifal de la pared celular de *F. kuroshium*.

Identificar los compuestos niloticina y dilapiol con un nivel de confianza igual a 1.

7 Referencias bibliográficas

- (1) Zhang, W.; Jiang, F.; Ou, J. Global Pesticide Consumption and Pollution: With China as a Focus. *Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* **2011**, *1* (2), 125–144.
- (2) INED. Costa Rica En Cifras. Instituto Nacional de Estadística y Censos: San José Costa Rica 2018, pp 3–27.
- (3) Li, Z. A Health-Based Regulatory Chain Framework to Evaluate International Pesticide Groundwater Regulations Integrating Soil and Drinking Water Standards. *Environ. Int.* **2018**, *121*, 1253–1278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.047>.
- (4) Widmer, T.; Abawi, G. Impact of Soil Health Management Practices on Soilborne Pathogens, Nematodes and Root Diseases of Vegetable Crops. *Appl. Soil Ecol.* **2000**, *15* (1), 37–47. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00070-6).
- (5) Bogale, M.; Steenkamp, E.; Wingfield, M.; Wingfield, B. Diverse Fusarium Solani Isolates Colonise Agricultural Environments in Ethiopia. *Eur. J. Plant Pathol.* **2009**, *124*, 369–378. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9422-y>.
- (6) Lynch, S.; Twizeyimana, M.; Mayorquin, J.; Wang Ho, D.; Na, F.; Kayim, M.; Thu, P. Identification, Pathogenicity and Abundance of Paracremonium Pembeum Sp. Nov. and Graphium Euwallaceae Sp. Nov — Two Newly Discovered Mycangial Associates of the Polyphagous Shot Hole Borer (Euwallac ea Sp.) in California. *Mycologia* **2016**, *108* (2), 313–329. <https://doi.org/10.3852/15-063>.
- (7) elmundocr.com. Presentan plan para incrementar producción de aguacate <https://www.elmundo.cr/costa-rica/presentan-plan-para-incrementar-produccion-de-aguacate/> (accessed Feb 29, 2020).
- (8) Sittenfeld, A.; Villers, R. Exploring and Preserving Biodiversity in the Tropics : The Costa Rican Case. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, 280–285.
- (9) Carmona, O.; Lozada, J.; Fernández, M.; Luna, M.; Martínez, M.; Guerrero, J. Efecto Nematicida y Fungicida de Extractos Hidroalcohólicos de Piper Lapathifolium y P. Melastomoides Nematicidal and Fungicidal Effect of Hydroalcoholic Extracts of Piper Lapathifolium and P. Melastomoides. *Biólogo Agropecu.* **2018**, *6* (2), 2074–2081.
- (10) Brú, J.; Guzman, J. Folk Medicine , Phytochemistry and Pharmacological Application of Piper Marginatum. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2016**, *26* (6), 767–779. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.014>.
- (11) Murrieta, D. Búsqueda de Potenciales Agentes Antifúngicos de Especies Vegetales Presentes En El Bosque Mesófilo de Montaña Veracruzano, Universidad Veracruzana, 2019.
- (12) Global Biodiversity Information Facility. Peperomia blanda Kunth <https://www.gbif.org/species/4184947> (accessed Feb 22, 2020).
- (13) Hilgert, N. I. Las Plantas Comestibles En Un Sector de Las Yungas Meridionales (Argentina). *Cons. Nac. Investig. científicas y Técnicas* **1999**, *57* (1), 118–138.
- (14) Wafa, M.; Hashim, N.; Awadh, N.; Taha, H.; Alhadi, A.; Abdullah, A.; Sharhan,

- O.; Othman, R. Bioassay-Guided Isolation and in Silico Study of Antibacterial Compounds From Petroleum Ether Extract of *Peperomia Blanda* (Jacq .) Kunth. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 1858–1872. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00969>.
- (15) Organización de las Naciones para la Agricultura y la Alimentación. El Estado Mundial de La Agricultura y Alimentación. FAO: Roma 2001, pp 227–250.
 - (16) Araya, J. Costa Rica es el consumidor más voraz de plaguicidas en el mundo <https://semanariouniversidad.com/pais/costa-rica-es-el-consumidor-mas-voraz-de-plaguicidas-en-el-mundo> (accessed Oct 13, 2019).
 - (17) Organización Mundial de la Salud. Estrategia de La OMS Sobre Medicina Tradicional. OMS: Ginebra 2013.
 - (18) Amjad, M. S.; Arshad, M. Ethnobotanical Inventory and Medicinal Uses of Some Important Woody Plant Species of Kotli, Azad Kashmir, Pakistan. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4* (12), 952–958. <https://doi.org/10.12980/apjtb.4.201414b381>.
 - (19) Andrade, J. M.; Lucero Mosquera, H.; Armijos, C. Ethnobotany of Indigenous Saraguros: Medicinal Plants Used by Community Healers “Hampiyachakkuna” in the San Lucas Parish, Southern Ecuador. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2017/9343724>.
 - (20) Mukherjee, P.; Venkatesh, P.; Ponnusankar, S. Ethnopharmacology and Integrative Medicine - Let the History Tell the Future. *J. Ayurveda Integr. Med.* **2010**, *1* (2), 100. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.65077>.
 - (21) Tribess, B.; Pintarelli, G. M.; Bini, L. A.; Camargo, A.; Funez, A.; Gasper, A. L. De. Author ' s Accepted Manuscript. *J. Ethnopharmacol.* **2015**. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.005>.
 - (22) Pino, O.; Sánchez, Y.; Rojas, M. M. Plant Secondary Metabolites as Alternatives in Pest Management . II : An Overview of Their Potential in Cuba. *Rev. Protección Veg.* **2013**, *28* (2), 95–108.
 - (23) Cayuela, L.; De la Cerda, G. Biodiversidad y Conservación de Bosques Neotropicales. *Ecosistemas* **2012**, *21*, 1–5.
 - (24) Creus, E. G. Compuestos Fenólicos: Un Análisis de Sus Beneficios Para La Salud. *Elsevier* **2004**, *23* (6), 80–84.
 - (25) Lattanzio, V.; De Cicco, V.; Venere, D.; Lima, G.; Salerno, M. Antifungal Activity of Phenolics against Fungi Commonly Encountered during Storage. *Ital. J. Food Sci.* **1994**, *6* (1), 23–30.
 - (26) Martínez, N.; Camacho, M.; Martínez, J. Los Compuestos Bioactivos de Las Frutas y Sus Efectos En La Salud. *Act. Dietética* **2008**, *12* (2), 64–68. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2).
 - (27) Patti, G.; Yanes, O.; Siuzdak, G. Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13* (4), 263–269.
 - (28) Ledesma Escobar, C. Metabolómica Global y Orientada de Cítricos Mediante Técnicas Cromatográficas-Espectrometría de Masas, Universidad de Córdoba,

- 2018.
- (29) Rivera, G. *Conceptos Introductorios a La Fitopatología*, Primera ed.; EUNED: San José Costa Rica, 2007.
 - (30) Montiel-rozas, M. M.; Hurtado-navarro, M.; Díez-rojo, M. Á.; Pascual, A.; Ros, M. Sustainable Alternatives to 1,3-Dichloropropene for Controlling Root-Knot Nematodes and Fungal Pathogens in Melon Crops in Mediterranean Soils: Efficacy and Effects on Soil Quality. *Environ. Pollut.* **2019**, *247*, 1046–1054. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.042>.
 - (31) Widmer, T.; Abawi, G. Impact of Soil Health Management Practices on Soilborne Pathogens, Nematodes and Root Diseases of Vegetable Crops. *Appl. Soil Ecol.* **2000**, *15* (1), 37–47. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00070-6](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00070-6).
 - (32) AgroSíntesis.com. Nemátodos y su importancia en la agricultura <https://www.agrosintesis.com/nematodos-y-su-importancia-en-la-agricultura/> (accessed Mar 8, 2020).
 - (33) Uribe, F. Controla el Nemátodo dorado de la papa <https://www.hortalizas.com/proteccion-de-cultivos/controla-el-nematodo-dorado-de-la-papa/> (accessed Mar 8, 2020).
 - (34) Lezaul, J. Nematodos fitoparásitos: una plaga mundial <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/nematodos-fitoparasitos> (accessed Oct 14, 2019).
 - (35) Talabera, M. Gestión de nematodos fitoparásitos <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/133376-Gestion-de-nematodos-fitoparasitos.html> (accessed Oct 14, 2019).
 - (36) Guzmán, T.; Hernández, S.; Valera, I.; Mora, J.; Carmona, W. Nematodos Fitoparásitos Asociados Al Arroz En Las Regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica de Costa Rica. *Agron. Mesoam.* **2011**, *2* (1), 21–28.
 - (37) Salas, L.; Vargas, E. El Nematodo Foliar Aphelenchoides Besseyi Christie Como Causante de La Mancha Angular Del Frijol En Costa Rica. *Agron. costarricense* **1984**, *8* (1), 65–68.
 - (38) Fernández, O.; Quesada, A. *Nematodos Asociados a Los Cultivos de Costa Rica*; Costa Rica, 2013.
 - (39) Pica, Y. *Ensayo de Toxicidad Con El Nemátodo Panagrellus Redivivus*; 2001.
 - (40) Cunha, F.; Oliveira, D.; Campos, V. Extratos Vegetais Com Propriedades Nematicidas e Purificação Do Princípio Ativo Do Extrato de Leucaena Leucocephala. *Fitopatol. Bras.* **2003**, *28*, 438–441.
 - (41) Villa, M.; Ramona Pérez, A.; Morales, H.; Basurto, S.; Soto-Parra, M.; Martínez, J. Situación Actual En El Control de Fusarium Spp. y Evaluación de La Actividad Antifúngica de Extractos Vegetales. **2014**, 195’205. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>.
 - (42) Peréz, M. Agentes Antifúngicos de Bacillus Sp. Activos Contra Los Fitopatógenos Fusarium Solani y Fusarium Sp., Symbionte Del Escarabajo Barrenador Kuroshio, Universidad Veracruzana, 2019.

- (43) Coleman, J. .; Rounsley, S. .; Rodriguez, M.; Kuo, Alan; Wasmann, C.C; Grimwood, J Schmutz, J.; Taga, M.; White, G. .; Zhou, S.; Schwartz, D.; Freitag, M.; Ma, L. .; et al. The Genome of *Nectria Haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. *PLoS Genet.* **2009**, 5 (8), 1–14.
- (44) Seminis.mx. Qué es y cómo ataca el Fusarium <https://www.seminis.mx/blog-que-es-y-como-ataca-el-fusarium/> (accessed Mar 8, 2020).
- (45) Naseri, B.; Ansari Hamadani, S. Characteristic Agro-Ecological Features of Soil Populations of Bean Root Rot Pathogens. *Rhizosphere* **2017**, 3, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.005>.
- (46) Henriques, J.; Inácio, M. D. L.; Sousa, E. Ambrosia Fungi in the Insect-Fungi Symbiosis in Relation to Cork Oak Decline. *Rev. Iberoam. Micol.* **2006**, 23 (3), 185–188. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70041-9](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70041-9).
- (47) Ranger, C.; Reding, M.; Schultz, P.; Oliver, J.; Frank, S.; Adesso, K.; Chong, J.; Sampson, B.; Werle, C.; Gill, S.; et al. Biology, Ecology, and Management of Nonnative Ambrosia Beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Ornamental Plant Nurseries. *J. Integr. Pest Manag.* **2016**, 7 (1), 1–23. <https://doi.org/doi.org/10.1093/jipm/pmw005>.
- (48) Hulcr, J.; Atkinson, T. H.; Cognato, A. I.; Jordal, B. H.; Mckenna, D. D. *Morphology, Taxonomy, and Phylogenetics of Bark Beetles*; Elsevier Inc., 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417156-5.00002-2>.
- (49) University of California. Identifying polyphagous and Kuroshio shot-hole borer in California <https://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8590.pdf> (accessed Dec 16, 2019).
- (50) Cooperband, M. F.; Stouthamer, R.; Carrillo, D.; Eskalen, A.; Thibault, T.; Cossé, A. A.; Castrillo, L. A.; Vandenberg, J. D.; Rugman-jones, P. F. Biology of Two Members of the *Euwallacea Fornicatus* Species Complex (Coleoptera : Curculionidae : Scolytinae), Recently Invasive in the U . S . A . , Reared on an Ambrosia Beetle Artificial Diet. *Agric. For. Entomol.* **2016**, 18 (3), 223–227. <https://doi.org/10.1111/afe.12155>.
- (51) Rabaglia, R. J.; Dole, S. A.; Cognato, A. I. Review of American Xyleborina (Coleoptera : Curculionidae : Scolytinae) Occurring North of Mexico , with an Illustrated Key. *USDA Forest Serv. For. Heal. Prot.* **2006**, 99 (6), 1034–1055.
- (52) Tropicos.org. Base de datos TROPICOS <https://www.tropicos.org/home.aspx?langid=66> (accessed Dec 20, 2019).
- (53) Vázquez, J. Piperaceae: características, distribución y hábitat, ejemplos https://www.lifeder.com/piperaceae/#Distribucion_y_habitat (accessed Oct 21, 2019).
- (54) Wanke, S.; Samain, M.-S.; Vanderschaeve, L.; Mathieu, G.; Goetghebeur, P.; Neinhuis, C. Phylogeny of the Genus *Peperomia* (Piperaceae) Inferred from the TrnK/MatK Region (CpDNA). *Plant Biol.* **2006**, 8 (1), 93–102. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873060>.
- (55) Yi, C.; Kiong, S.; Mat, R.; Fei, C.; Abu, Z.; Siong, A.; Ho, H.; Hwang, S.; Boon, H.; Ayer, M.; et al. Systematic Analysis of in Vitro Photo-Cytotoxic Activity in Extracts from Terrestrial Plants in Peninsula Malaysia for Photodynamic Therapy.

- J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, *96* (3), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.06.009>.
- (56) Nathan, S.; Scott, M.; Andrew, Henderson, Dennis, W.; Scott, V. *Flowering Plants of the Neotropics*, Princeton.; Estados Unidos, 2004.
- (57) Felipe, L. G.; Baldoqui, D. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. da S.; Guimaraes, E. F.; Cicarelli, R. M.; Furlan, M. Trypanocidal Tetrahydrofuran Lignans from *Peperomia Blanda*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 145–150.
- (58) Lee A. Dyer; Aparna D. N. Palmer. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*, Primera.; Kluwer Academic: New York, 2004.
- (59) Samain, A. M.; Mathieu, G.; Vanderschaeve, L.; Wanke, S.; Neinhuis, C.; Goetghebeur, P.; Piperaceae, P.; Mathieu, G.; Neinhuis, C.; Goetghebeur, P.; et al. Nomenclature and Typification of Subdivisional Names in the Genus. *Int. Assoc. Plant Taxon.* **2014**, *56* (1), 229–236. <https://doi.org/10.2307/25065756>.
- (60) 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.; et al. Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry* **1997**, *46* (4), 597–673. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2).
- (61) Linkoln, A.; Borges, A.; Judson, A.; Machado, T.; Fonseca, C.; Everson, L.; Portes, A.; Helena, B.; Noronha, L. De; Maia, S.; et al. Chemical Identification and Antimicrobial Potential of Essential Oil of *Piper Rivinoides* Kunth (BETIS-WHITE). *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *131* (June), 110559. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.06.006>.
- (62) Guha, A.; Subramanian, M. Hydroxychavicol from *Piper Betle* Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *166* (2), 274–291. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.05.025>.
- (63) Scodro, R. B. L.; Pires, C. T. A.; Carrara, V. S.; Lemos, C. O. T.; Cardozo-filho, L.; Souza, V. A.; Corrêa, A. G.; Siqueira, V. L. D.; Lonardon, M. V. C.; Cardoso, R. F.; et al. Phytomedicine Anti-Tuberculosis Neolignans from *Piper Regnellii*. *Eur. J. Integr. Med.* **2013**, *20* (7), 600–604. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.01.005>.
- (64) Su Xu; Li, N.; Ning, M.; Zhou, C.; Yang, Q.; Ming-Wei Wang. Bioactive Compounds from *Peperomia Pellicuda*. *J. Nat. Pro* **2006**, *69* (2), 247–250. <https://doi.org/10.1021/np050457s>.
- (65) Nagashima, K.; Yamano, Y.; Sugimoto, S.; Ishiwata, K.; Kanuka, H. Phytochemistry Letters Nematicidal Compounds of *Peperomia Japonica*. *Phytochem. Lett.* **2018**, *27* (May), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.06.015>.
- (66) Naturalista.mx. Verdolaguilla (*Peperomia blanda*) <https://www.naturalista.mx/taxa/285854-Peperomia-blanda> (accessed Oct 30, 2019).
- (67) Missouri Botanical Garden. *Peperomia blanda* Kunth Collected in Costa Rica

- <https://www.gbif.org/occurrence/1261398071> (accessed Dec 20, 2019).
- (68) Naturalista.mx. *Peperomia blanda* Kunth
<https://www.gbif.org/occurrence/2005357811> (accessed Dec 20, 2019).
- (69) Dignani, D. F. *Peperomia Blanda* (Piperacea): Avaliação Das Atividades Antibacteriana e Antioxidante, Universidade Estadual Paulista, 2009.
- (70) Velozo, L.; Ferreira, M.; Santos, M.; Moreira, D.; Guimarães, E.; Emerenciano, V.; Kaplan, M. A. C-Glycosyl Flavones from *Peperomia Blanda*. *Fitoterapia* **2009**, *80*, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.11.005>.
- (71) Velozo, L. S.; Ferreira, M. J.; Santos, M. I.; Moreira, D. L.; Emerenciano, V. P.; Kaplan, M. A. Unusual Chromenes from *Peperomia Blanda*. *Phytochemistry* **2006**, *67* (5), 492–496. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.12.012>.
- (72) Google.com/maps. Ubicación Santuario del Bosque de Niebla
<https://www.google.com/maps/place/Santuario+Del+Bosque+De+Niebla/@19.4504452,-96.7420347,103856m/data=!3m1!1e3!4m8!1m2!2m1!1sbosque+de+niebla+xalap!3m4!1s0x85db2dc209e04bd1:0x24d2ea6dc893d53!8m2!3d19.5129446!4d-96.9467136> (accessed Feb 23, 2020).
- (73) Mostafa, M.; Hossain, H.; Hossain, A.; Kanti biswas, P.; Zahurul Haque, M. Insecticidal Activity of Plant Extracts against *Tribolium Castaneum* Herbst. *Sciencage*, **2012**, *3* (3), 80–84.
- (74) Rizi, K.; Murdan, S.; Danquah, C. A.; Faull, J.; Bhakta, S. Development of a Rapid , Reliable and Quantitative Method — “ SPOTi ” for Testing Antifungal Efficacy. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *117* (August), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.07.005>.
- (75) Badawy, M. E.; Abdelgaleil, S. A. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from Egyptian Plants against Plant Pathogenic Bacteria and Fungi. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *52*, 776–782. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>.
- (76) Katiki, L. M.; Ferreira, J. F. S.; Zajac, A. M.; Masler, C.; Lindsay, D. S.; Chagas, A. C.; Amarante, A. F. *Caenorhabditis Elegans* as a Model to Screen Plant Extracts and Compounds as Natural Anthelmintics for Veterinary Use. *Vet. Parasitol.* **2011**, 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.020>.
- (77) Juarez-Trujillo, N.; Monribot-Villanueva, J. L.; Jiménez-Fernández, V. M.; Suárez-Montaño, R.; Aguilar-Colorado, Á. S.; Guerrero-Analco, J. A.; Jiménez, M. Phytochemical Characterization of Izote (*Yucca Elephantipes*) Flowers. *Appl. Bot. Food Qual.* **2018**, *91*, 202–210. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2018.091.027>.
- (78) Monribot, J. L.; Elizalde, J.; Aluja, M.; Segura, A.; Birke, A.; Guerrero, J. A.; Ruiz, E. Endorsing and Extending the Repertory of Nutraceutical and Antioxidant Sources in Mangoes during Postharvest Shelf Life. *Food Chem.* **2019**, *285*, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.136>.
- (79) Dunn, W. B.; Erban, A.; Weber, R. J. M.; Creek, D. J.; Neumann, S.; Kopka, J.;

- Viant, M. R. Mass Appeal: Metabolite Identification in Mass Spectrometry-Focused Untargeted Metabolomics. *Metabolomics* **2012**, *9*, 44–66. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>.
- (80) Cruz, S.; Gómez, A.; García, V.; Álvarez, L.; Cáceres, A.; Morales, J.; Cobar, O.; Carmen Samayoa, R. O.; Gaitan, I. 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, Universidad de San Carlos de Guatemala, 206AD.
- (81) Xiaolei, S.; Wenhua, C.; Wei, D.; Hailiang, X.; Khalid, R.; Yan, W.; Zhang, J.; Zhang, S.; Xu, L.; Han, T. Piper Sarmentosum Roxb.: A Review on Its Botany, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Ethnopharmacology* **2020**.
- (82) Martínez, J. Estudio Químico Biodirigido de Chamaedorea Sp. Para La Búsqueda de Agentes Insecticidas Activos Contra El Escarabajo Ambrosial Xyleborus Volvulus (Curculionidae: Scolytinae)", Universidad Veracruzana, 2020.
- (83) Agriculturers.com. Biopesticidasobtenidos de plantas para el control de plagas <http://agriculturers.com/biopesticidas-obtenidos-de-plantas-para-el-control-de-plagas/> (accessed Feb 20, 2019).
- (84) Claramunt, R.; Farrán, M.; Pérez, M.; Gutierrez, D. *Química Biorgánica y Los Productos Naturales*, 1st ed.; Universidad Nacional de Educación a Distancia: Madrid, 2013.
- (85) Tornero, F. Evaluación Del Potencial Antifúngico de Piper Sp. En Búsqueda de Compuestos Bioactivos Contra F. Solani, F. Oxysporum y F. Verticillioides., Universidad Veracruzana, 2018.
- (86) Gutierrez, J.; Gutierrez, O.; Nieto, D.; Téliz, D.; Zabaleta, E.; Delgadillo, F.; Vaquera, H. Resistencia a Benomil y Tiabendazol En Aislamientos de Colletotrichum Gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. Obtenidos de Mango (Mangifera Indica L.) En Cinco Regiones de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2003**, *21* (3), 260–266.
- (87) Ganado Olmedo, P. Estudio de Diferentes Fracciones y Extractos de Allium Sativum Sobre La Reactividad Vascular, Niveles de Colesterol y Cultivos Celulares, Universidad Complutense de Madrid, 2001.
- (88) Muñoz, A. Caracterización de Distintos Péptidos Antimicrobianos Con Actividad Frente a Hongos Fitopatógenos de Interés Agroalimentario, Universidad Politécnica de Valencia, 2008.
- (89) Gacrcía, L. Extracción de Bioactivos de La Semilla de Cedro (Cupressus Lusitanica) Con Actividad Antifúngica y Su Incorporación En Emulsiones, Universidad Autónoma del Estado de México, 20199.
- (90) Soyly, E.; Kurt, S.; Soyly, S. In Vitro and in Vivo Antifungal Activities of the Essential Oils of Various Plants against Tomato Grey Mould Disease Agent Botrytis Cinerea. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143*, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>.
- (91) Vengas, E.; Ciampi, L.; Collado, L.; Costa, M.; Fuentes, R.; Nissen, J.; Schobitz,

- R.; Schoebitz, M. Aislamiento e Identificación de Bacterias Nativas Del Género *Bacillus* Cohn Antagonistas de Cepas Patógenas de *Fusarium* Link. En *Cala. Agro Sur* **2005**, *33* (2), 1–12.
- (92) Badilla, F. Identificación de Nematodos Fitoparásitos Asociados Al Cultivo de Chile Dulce En Las Principales Zonas Agrícolas de Costa Rica, Universidadde Costa Rica, 2018.
- (93) Materias Primas e Insumos Químicos para la Industria GTM. *Sulfato de Cobre Ficha de Datos de Seguridad*; 2017.
- (94) Puebla, P.; Guerrero, M.; Correa, S. Flavonoides Del Género *Croton*. *Rev. Colomb. Ciencias Químico Farm.* **2004**, *33* (1), 77–85.
- (95) Pérez, G. Los Flavonoides : Antioxidantes o Prooxidantes. *Rev. Cuba. Invest Biomed* **2003**, *22* (1), 48–57.
- (96) Al-Madhagi, W.; Mohd, N.; Awad, N.; Alhad, A.; Nadiah, S.; Othman, R. Chemical Profiling and Biological Activity of *Peperomia Blanda* (Jacq.) Kunth. *Plant Biol.* **2018**, *1*, 1–19. <https://doi.org/10.7717/peerj.4839>.
- (97) Bettero, A.; Benassi, C. Determination of Bergapten and Citropten in Perfumes and Suntan Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence. *J. Chromatogr. A* **1983**, *280*, 167–171. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91554-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91554-1).
- (98) Chalothorn, T.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Pannara, S. Synthesis and Antibacterial Activity of Emodin and Its Derivatives against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (35), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151004>.
- (99) Trapero, Y. Farmacocinética y Toxicología Del 4-Hidroxi-3-Metoxibenzaldehído (Vainillina) En Modelos in Vivo., Universidad de Oriente, 2013.
- (100) The Metabolomics Innovation Center. Showing metabocard for Naringin <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0002927> (accessed Jan 30, 2020).
- (101) Kamal, N.; Viegelmann, C.; Clements, C.; Edrada-Ebel, R. Metabolomics-Guided Isolation of Anti-Trypanosomal Metabolites from the Endophytic Fungus *Lasiodiplodia Theobromae*. *Nac. Libr. Med.* **2017**, *83* (6), 565–573. <https://doi.org/10.1055/s-0042-118601>.
- (102) Daniel, A.; Rajiv, M.; Paulraj, M.; Balakrishna, K.; Ignacimuthu, S. Effect of Niloticin, a Protolimonoid Isolated from *Limonia Acidissima* L. (Rutaceae) on the Immature Stages of Dengue Vector *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* **2014**, *139*, 67–76. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.002>.
- (103) Kleber, A.; Luiz, P.; Fernanda, K.; Pasqualoto, M.; Alexandre, R.; Aparecida, D.; Santos, A.; Rogério, C.; Leonardo, A.; Hiromi, M.; et al. Cytotoxic Effects of Dillapiole on MDA-MB-231 Cells Involve the Induction of Apoptosis through the Mitochondrial Pathway by Inducing an Oxidative Stress While Altering the Cytoskeleton Network. *Biochimie* **2014**, *99*, 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.008>.
- (104) Alves, N.; Setzer, W.; Silva, K. The Chemistry and Biological Activities of

Peperomia Pellucida (Piperaceae): A Critical Review. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, 235, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.021>.

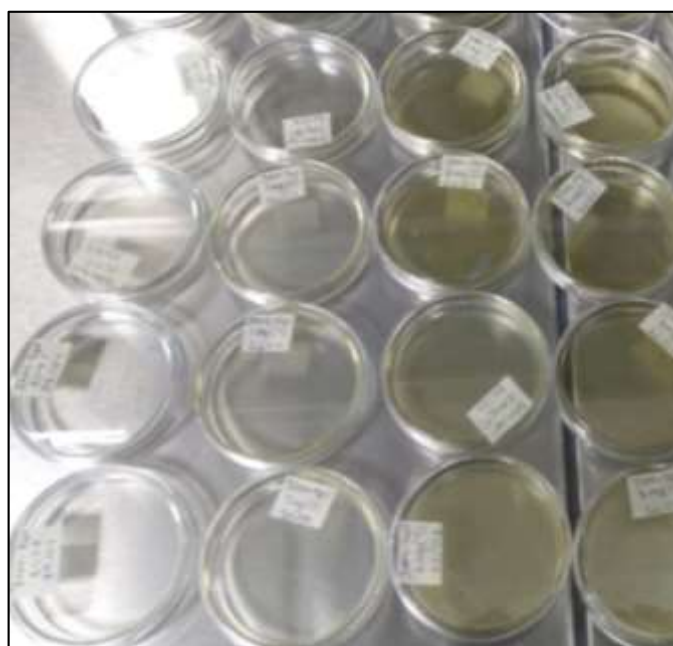
- (105) Hernandez, E.; Sánchez, D.; Sánchez, E.; De la Parra, J. Fumonisin – Síntesis y Función En La Interacción Fusarium Verticillioides-Maíz. *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **2014**, 17 (1), 77–91.

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo para reproducción de escarabajos escolitinos.

| Ingrediente | Cantidad por tubo |
|--|-------------------|
| Aserrín (<i>Platanus mexicana</i>) | 45 g |
| Agar (Difco agar, Granulated 500gr) | 12 g |
| Sucrosa (Sigma, for molecular biology 500 gr) | 6.0 g |
| Caseína | 3.0 g |
| Almidón (Sigma Aldrich) | 3.0 g |
| Levadura (MP) | 3.0 g |
| Sales de Wesson (MP) | 0.6 g |
| Aceite de germen de trigo (Sigma Aldrich) | 1.5 mL |
| Etanol al 96% | 3.0 mL |
| Estreptomicina (Sal sulfatada, Sigma Aldrich 100 gr) | 0.21 g |

Anexo 2. Diseño del experimento para la evaluación de la actividad insecticida.



Anexo 3. Condiciones empleadas para la detección y cuantificación de compuestos fenólicos mediante el análisis por UPLC-MS-QqQ.

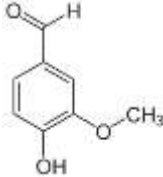
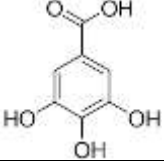
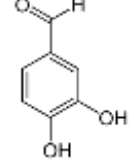
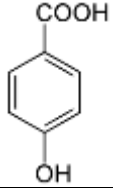
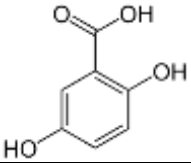
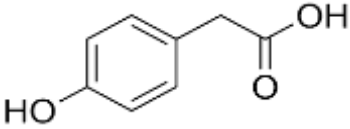
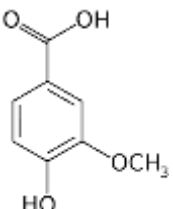
| Compuesto | Ion precursor | Ion generado | Tiempo de retención (m) | Tiempo de búsqueda (m) | Voltaje de fragmentación (V) | Energía de colisión (V) | Polaridad |
|----------------------------------|---------------|--------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------|
| Ácido shikímico | 173.1 | 111.1 | 1.7 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| Ácido gálico | 169 | 125.2 | 3.8 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| Ácido-3,4-dihidroxibenzoico | 153 | 109.1 | 6.4 | 0.25 | 100 | 10 | Negativa |
| Ácido 4-hidroxibenzoico | 137.1 | 92.8 | 9.11 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| Ácido gentísico | 153 | 109 | 9.2 | 0.25 | 100 | 10 | Negativa |
| (-)-Epigallocatequina | 305.1 | 125 | 10.44 | 0.5 | 140 | 20 | Negativa |
| Ácido 4-hidroxifenilacetico | 107.1 | 77 | 10.52 | 0.5 | 140 | 20 | Negativa |
| (+)-Catequina | 291 | 138.9 | 11.2 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Ácido vanílico | 169 | 93.03 | 11.81 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Escopolin | 355.1 | 193 | 11.87 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| Ácido clorogenico | 355.1 | 163.03 | 12.12 | 0.3 | 100 | 10 | Positiva |
| Ácido cafeico | 181.04 | 163.03 | 12.24 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Procianidina B2 | 577.1 | 425.1 | 13.69 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| Kuromanin | 449 | 286.9 | 14.24 | 0.5 | 140 | 30 | Positiva |
| (-)-Epicatequina | 291 | 138.8 | 14.48 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Vainilina | 153 | 124.9 | 14.99 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Mangiferina | 423 | 302.8 | 15.18 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Keracyanin | 595.2 | 287.1 | 15.2 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| Ácido 4-cumárico | 165.05 | 147.04 | 16.22 | 0.25 | 100 | 10 | Positiva |
| (-)-Galato de galocatequina | 107 | 139 | 16.57 | 0.5 | 80 | 20 | Positiva |
| Umbeliferona | 163 | 107 | 17.1 | 0.5 | 100 | 30 | Positiva |
| Quercetina-3,4-di-O-glucósido | 627 | 302.9 | 17.87 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Escopoletina | 193 | 133 | 18.44 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Ácido 3-cumarico | 165.05 | 147.04 | 18.7 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Ácido ferúlico | 195.1 | 145.02 | 19.18 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| Ácido sináptico | 225.1 | 207.1 | 19.57 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Galato de epicatequina | 443.1 | 123 | 19.91 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Mircitina | 465 | 318.9 | 20.25 | 0.5 | 100 | 10 | positivo |
| Ácido elágico | 301 | 145 | 20.36 | 0.5 | 100 | 40 | Negativa |
| Quecetina-3-D-galactoside | 465 | 302.9 | 20.6 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| Rutina | 611 | 302.9 | 20.65 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Quercetina-3-glucósido | 465 | 303 | 21.19 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Luteolina-7-O-glucosido | 449 | 287 | 21.4 | 0.6 | 100 | 10 | Positiva |
| Ácido 4-anísico | 153.1 | 109 | 22.21 | 0.5 | 120 | 5 | Positiva |
| Penta-O-galloil-beta-D-glucósido | 771.1 | 153 | 22.27 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |

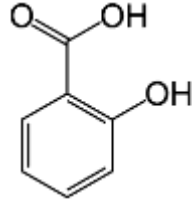
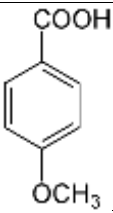
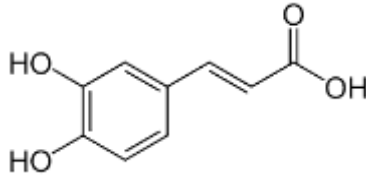
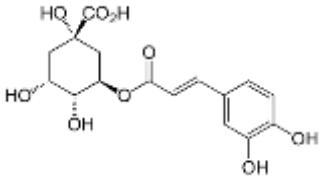
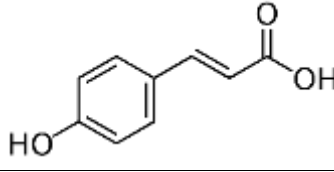
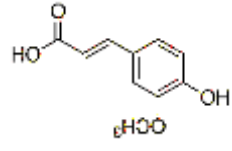
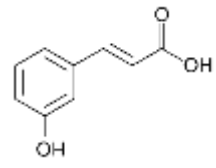
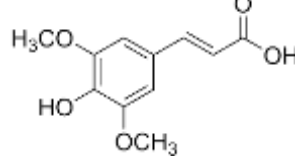
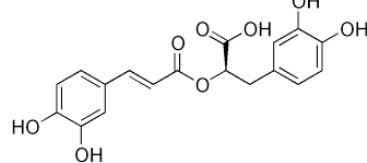
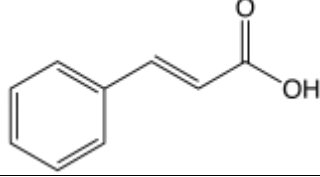
| | | | | | | | |
|------------------------------------|--------|--------|-------|-----|-----|----|----------|
| Ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico | 197 | 179 | 23.43 | 0.5 | 80 | 5 | Positiva |
| Kaempferol-3-O-glucósido | 449 | 286.9 | 23.64 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Naringina | 273 | 153 | 23.64 | 0.5 | 120 | 10 | Positiva |
| Quercetina | 449.1 | 303.1 | 23.71 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Hesperidina | 609.1 | 301.1 | 24.55 | 0.5 | 100 | 20 | Negativa |
| Miricetina | 317 | 179 | 24.64 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| Ácido rosmarinico | 361.1 | 163 | 24.85 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Floricina | 435 | 272.9 | 25.21 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| <i>Trans</i> resveratrol | 229.1 | 135 | 25.86 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Ácido <i>trans</i> -cinámico | 149.1 | 131 | 28.5 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Cirsimarina | 477 | 314.9 | 29.4 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Quercetina | 302.9 | 153.1 | 29.7 | 0.5 | 100 | 35 | Positiva |
| Luteolina | 287.1 | 153 | 30.09 | 0.3 | 100 | 30 | Positiva |
| Psoraleno | 187 | 131.1 | 31.4 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| Angelicina | 187 | 131.1 | 32.74 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| Naringenina | 271 | 151 | 32.83 | 0.5 | 100 | 10 | Negativa |
| Apigenina | 271 | 153 | 34.1 | 0.5 | 100 | 30 | Positiva |
| Kaempferol | 287.1 | 153 | 34.79 | 0.5 | 100 | 30 | Positiva |
| Hesperitina | 303.1 | 177.1 | 34.8 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| 5,7-dimetoxi- 2H -cromen-2-ona | 207.06 | 192.04 | 36.11 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| Ácido nordihidroguareético | 303 | 193.1 | 42.36 | 0.5 | 100 | 10 | Positiva |
| Crisina | 255.1 | 153 | 43.13 | 0.5 | 100 | 40 | Positiva |
| Kaempferide | 301 | 258.2 | 43.5 | 0.5 | 100 | 20 | Positiva |
| Emodina | 269 | 225 | 44.2 | 0.5 | 150 | 20 | Negativa |
| Crisofanol | 255.1 | 153 | 45.3 | 0.5 | 100 | 40 | Positiva |

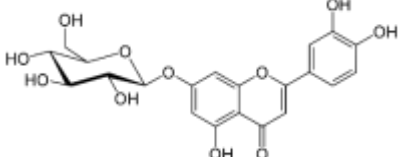
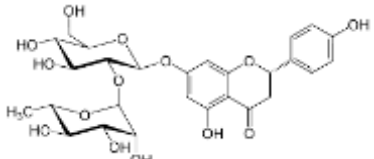
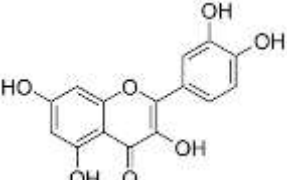
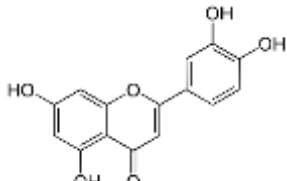
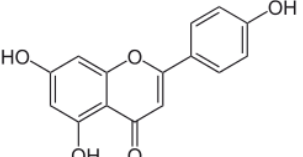
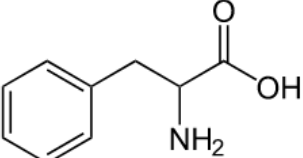
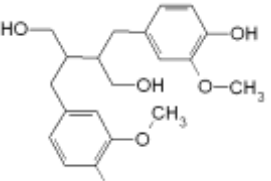
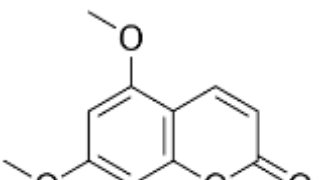
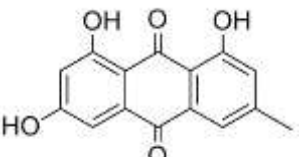
Anexo 4. Parámetros matemáticos utilizados para la normalización de los datos metabolómicos de UPL-MS-QToF con la herramienta MetaboAnalyst.

| Conjunto de muestras | Tipo de ionización | Normalización simple | Transformación de datos | Escalamiento |
|----------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|----------------|
| PB-G, PB-H, y PB-I | Positiva | Ninguna | Logarítmica | Tipo Pareto |
| PB-G, PB-H, y PB-I | Negativa | Por suma | Logarítmica | Tipo Pareto |
| PB-H y PB-I | Positiva | Por suma | De raíz cúbica | Centrado medio |
| PB-Hy PB-G | Positiva | Por suma | De raíz cúbica | Centrado medio |

Anexo 5. Estructuras de compuestos fenólicos identificados en el EC-PB y fracciones de *Peperomia blanda*.

| Compuesto fenólico | Estructura |
|---------------------------------|--|
| | |
| Vainillina (1) |  |
| Ácido gálico (2) |  |
| Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3) |  |
| Ácido-4-hidroxibenzoico (4) |  |
| Ácido gentísico (5) |  |
| Ácido-4-hidroxifenilacético (6) |  |
| Ácido vainillínico (7) |  |

| | |
|--|--|
| <p>Ácido salicílico (8)</p> |  |
| <p>Ácido anísico (9)</p> |  |
| <p>Ácido cafeíco (10)</p> |  |
| <p>Ácido clorogénico (11)</p> |  |
| <p>Ácido-4-cumárico (12)</p> |  |
| <p>Ácido ferúlico (13)</p> |  |
| <p>Ácido-3-cumárico (14)</p> |  |
| <p>Ácido sinápico (15)</p> |  |
| <p>Ácido rosmarínico (16)</p> |  |
| <p>Ácido <i>trans</i> cinámico (17)</p> |  |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Luteolina-7-O-glucósido (18) |  |
| Naringina (19) |  |
| Quercetina (20) |  |
| Luteolina (21) |  |
| Apigenina (22) |  |
| Fenilalanina (23) |  |
| Secoisolariciresinol (24) |  |
| Citropten (25) |  |
| Emodina (26) |  |

Anexo 6. Perfilamiento químico por UPLC-MS-QToF.

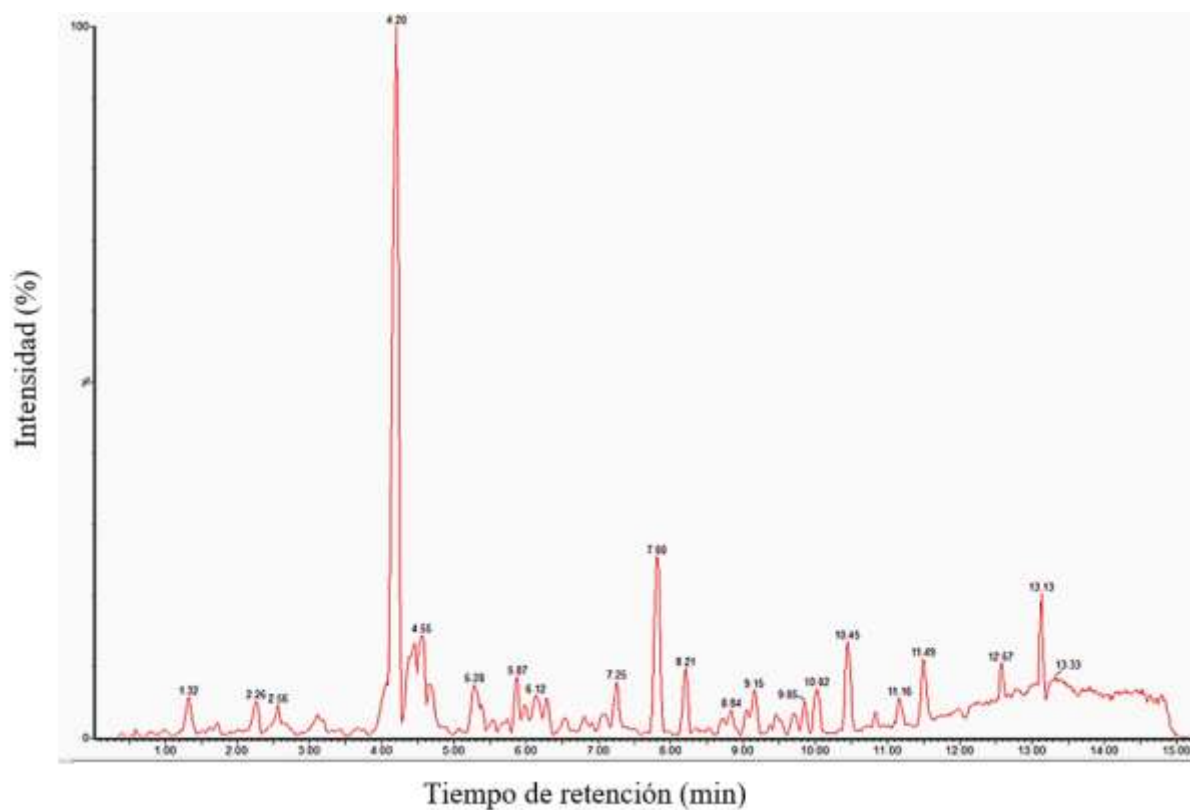


Figura 26. Cromatograma de la fracción PB-H.

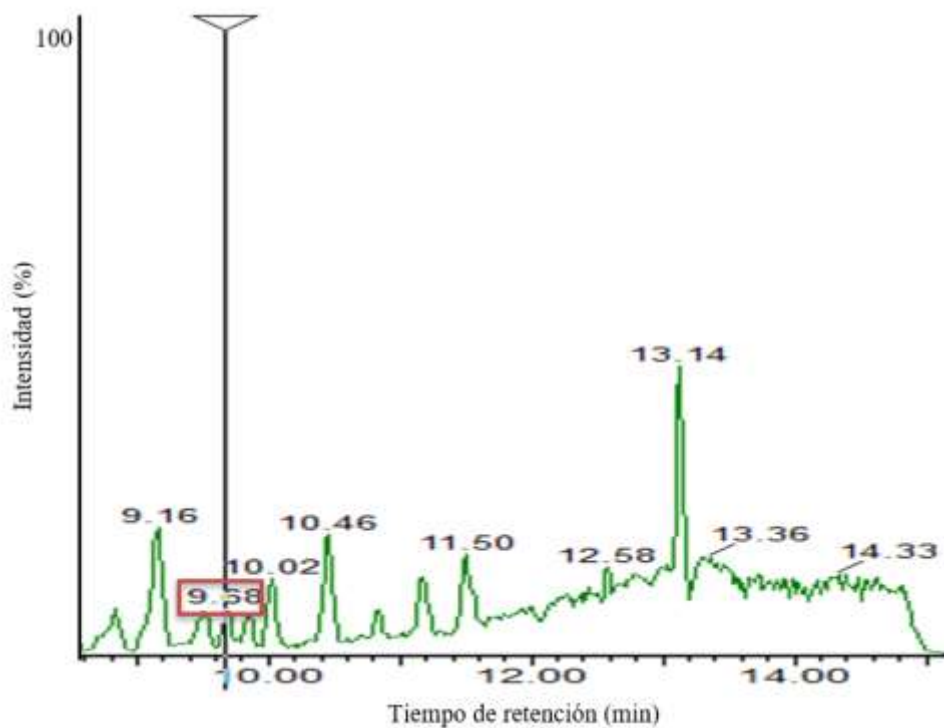


Figura 27. Región del cromatograma de la fracción PB-H (9.0-15 min). A los 9.68 min se observa la señal correspondiente a la niloticina.

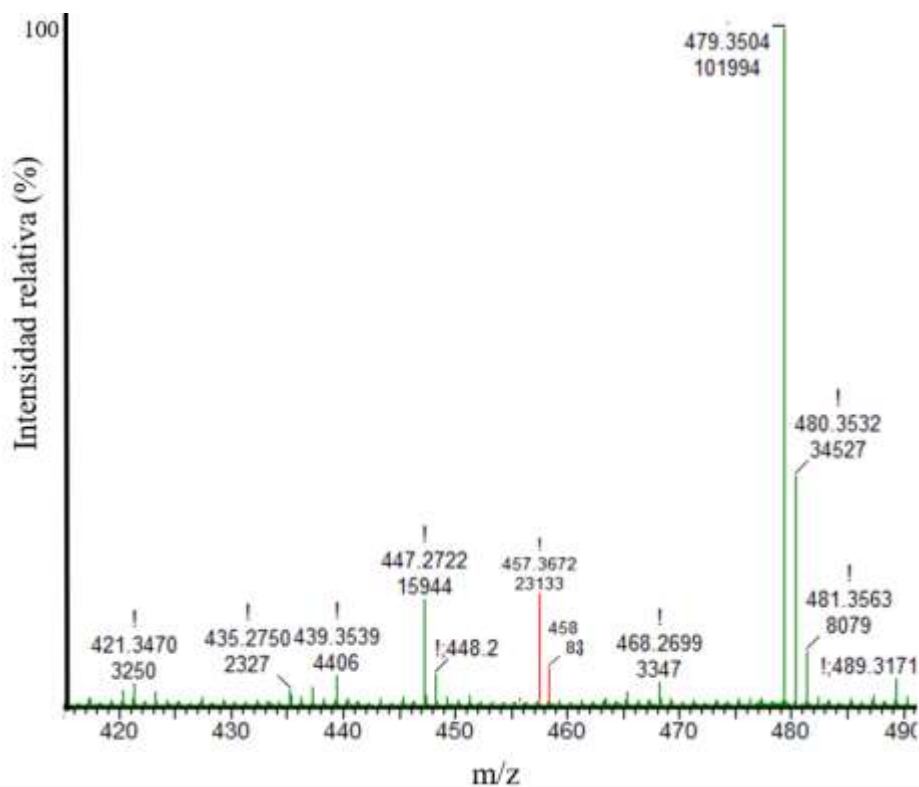


Figura 28. Espectro de masas de la fracción PB-H obtenido por ESI⁺. Se aprecia la niloticina con un $[M+H]^+$ de 457.3672 y los fragmentos 421.3470 y 439.3539.

