

Universidad del Mar

Campus Puerto Ángel

División de Estudios de Posgrado



Actividad tóxica de doce especies vegetales del estado de Oaxaca contra *Nacobbus aberrans*

Tesis presentada a la división de estudios de posgrado de la Universidad del Mar, como requisito necesario para obtener el grado de Maestro en Ciencias Ambientales en área de concentración Química Ambiental.

Presenta

QFB. Raúl Velasco Azorsa

Directora de Tesis

Dra. Beatriz Hernández Carlos

Puerto Ángel, Oaxaca, Mayo 2014

votos

Agradecimientos

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo y confianza de invertir la beca nacional y de movilidad para mi formación profesional

Universidad del Mar (UMAR) por apoyarme y permitirme continuar con mis estudios de posgrado y brindarme los espacios adecuados para ello.

Departamento de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados (COLPOS) por permitir realizar en sus laboratorios los estudios Biológicos de este proyecto

Dra. Beatriz Hernández Carlos, por su depositar su confianza en mi formación académica y compartirme un poco de su gran experiencia académica y profesional.

Dr. Ignacio Cid del Prado Vera (COLPOS), por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, depositar su confianza en el presente proyecto de investigación así como sus consejos y compartir dentro de este trabajo su gran experiencia profesional.

Dr. Eleuterio Burgueño Tapia del departamento de química orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) por la obtención de los espectros de RMN de los compuestos analizados en este trabajo.

Dr. Gerardo Salazar Chávez Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), M. C. Ernestina Cedillo Portugal y M. C. Lilian López Chávez de la Universidad Autónoma de Chapingo por la identificación de los ejemplares utilizados en el presente trabajo.

A mis revisores el Dr. Marco Vinicio Ramírez Mares, M. en C. María del Rocío Gutiérrez Ortiz, Dr. Noé Ruiz García, Dr. Ignacio Cid del Prado Vera y Dra. Beatriz Hernández Carlos por sus acertadas opiniones así como el tiempo dedicado para la realización del presente trabajo.

A mis profesores del posgrado: Dra. Susana García Ortega , Mtra. Rosario Cid Rodríguez, Dr. Aitor Aizpuru, Dr. Juan Mentado Morales, Dra. Beatriz Hernández Carlos, Mtra. Isis Camacho Sánchez.

A los Doctores de la Universidad Veracruzana, Dra. Blandina Bernal Morales (departamento de neurofarmacología del instituto de neurociencias de la UV) por su apoyo en el tratamiento y análisis de datos estadísticos; a la Dra. Maribel Vázquez Hernández y el Dr. Alberto Sánchez Medina (unidad de apoyo en resolución analítica SARA- UV) por su consejos para la elaboración de la presente tesis.

Dedicatorias

Dedico este trabajo a:

A mis padres María Soledad Azorsa Pino y Salvador Velasco Hernández, quienes han sido muy importantes en mi formación personal, profesional y verlos siempre como un ejemplo de superación.

A mis hermanos Elizabeth, Jaime, Evelyn y Emiliano.

A mis amigos de Xalapa Veracruz: Diana, Rossana, Martha, Thalia, Martha Canul, Eve, Claudia, Vero, Edna, Maribel, Rosy, Chely, Lupita, Dorita, Dina, Tania, Monce, Mabel, Anabel, a mi gran amigo Dante Rafael, Ajax, Omar, Diego, Daniel, David, Enrique, Misael, Marco, Gabriel, Alberto, Jonathan, Edel, Gabriel, por sus buenos deseos desde que me fui de Xalapa para continuar mis estudios y seguir pasando buenos momentos.

A mis amigos de la UMAR Tania, Gaby, Isa, Lisa, Anita, Ale, Ada, Karla, Kalita, Yasu, Ivonne Santiago, Elizabeth Escobar, Coral, Ángel Leyva, Oscar, Omar, Jair, Tavo, Everardo, Panchito, Julio, Fer, Pepe, Servando, Israel, Dafnis, Toño y José Luis.

A mis amigas del posgrados: Lucero, Rocío, Itzel, Denise y Yulang.

A todos mis amigos de otros estados que han estado en muchas etapas de mi desarrollo académico: Cony, Brenda, Claudia, Emanuel, Omar e Iván (IPN), Ivone, Ely, Yolanda, Edgar, Jafet, Ricardo Serna y Arturo (COLPOS), Martha Navarro e Ivan, (UDG), Mariana, Gaby, Acela, Gonzalo y Gustavo (UAEH).

A mis profesores de la facultad de Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Veracruzana, campus Xalapa.

A todos y cada uno, les dedico con mucho cariño este trabajo.

Índice general

Agradecimientos	iii
Dedicatorias	v
Índice general	vi
Índice de cuadros	viii
Índices de figuras	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. Introducción	16
2. Antecedentes	17
2.1 <i>Nacobbus aberrans</i> (Thorne y Allenn 1944).....	17
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	17
2.1.2 Orígenes y distribución.....	17
2.1.3 Ciclo biológico de <i>Nacobbus aberrans</i>	19
2.1.4 Importancia agrícola de <i>N. aberrans</i>	19
2.1.5 Control de <i>N. aberrans</i>	20
2.2 Toxicidad de productos naturales de plantas contra nematodos agalladores.....	21
2.2.1 Extractos.....	21
2.2.2 Metabolitos secundarios.....	23
2.3 Plantas de estudio.....	28
3. Justificación	33
4. Hipótesis	34
5. Objetivos	34
5.1 Objetivo general.....	34
5.2 Objetivos particulares.....	34
6. Materiales y métodos	35
6.1 Equipos.....	35
6.2 Métodos cromatográficos.....	36
6.3 Material vegetal.....	37
6.4 <i>Extractos</i>	37
6.5 Fracciones AAmet-f4, AAmet-f9 y estigmasterol aislado de extracto de parte aérea <i>Adenophyllum aurantium</i> AAact.....	37
6.6. Compuestos.....	38
6.7. Juveniles del segundo estadio de <i>N. aberrans</i>	38
6.8. Actividad nematicida.....	38
Resultados	40
7.1 Rendimiento de extractos.....	40
7.2 Obtención de J2.....	40

7.3 Actividad nematocida de extractos.....	41
7.3.1 Tratamiento 1000 ppm.....	41
7.3.2 Tratamiento 100 ppm.....	44
7.3.3 Tratamiento 10 ppm.....	48
7.3.4 Comparación de la actividad biológica entre extractos del mismo género.....	50
7.3.5 Comparación de actividad biológica entre extractos de partes distintas de una misma planta con el mismo disolvente	52
7.3.6 Comparación de efecto biológico entre dos extractos de diferente polaridad de la misma planta.	55
7.3.7 Selección del extracto de <i>A. aurantium</i> parte aérea.....	56
7.4 Actividad nematocida de las particiones de acetona y metanol del extracto metanólico de la parte aérea de <i>A. aurantium</i>	59
7.5 Actividad nematocida de compuestos y fracciones obtenidos del extracto metanólico de la parte aérea y extracto de acetato de etilo de la raíz de <i>A. aurantium</i>	60
7.5.1 Compuestos y fracciones a 50 ppm	60
7.5.2 Compuestos y fracciones a 100 ppm	60
7.5.3 Actividad de los tratamientos con los esteroides estigmasterol y β -sitosterol..	61
7.5.4 Actividad nematocida de los tratamientos con β -tertiofeno	63
7.5.5 Actividad nematocida de los tratamientos con los compuestos y fracciones restantes.....	64
7.6 Separación del extracto metanólico de la parte aérea de <i>A. aurantium</i>	65
7.6.1 Rendimiento de la extracción de <i>A. aurantium</i>	65
7.6.2 Separación.....	65
7.7 Elucidación estructural AAact-c4 (estigmasterol).....	68
7.7.1 Desplazamientos de ^1H	70
7.7.2 Desplazamientos de ^{13}C	73
8. Conclusiones	81
Referencias.....	82

Índice de cuadros

Cuadro	Página
1. Distribución de <i>N. aberrans</i> en el continente Americano	18
2. Extractos vegetales con actividad tóxica en nematodos agalladores.....	22
3. Actividad nematicida de compuestos terpénicos.....	24
4. Rendimientos de extractos.....	40
5. Porcentaje de inmovilidad de todos los tratamientos a 1000 ppm (12-72h)	41
6. Promedio de % de inmovilidad a 1000 ppm y tiempo donde inicia el mayor efecto biológico	42
7. J2 recuperados después de 72 horas	43
8. Porcentaje de inmovilidad de todos los tratamientos a 100 ppm (12-72h)	44
9. Tiempo de mayor efecto en tratamientos a 100 ppm con recuperación	45
10. Promedio de % de inmovilidad de los tratamientos a 100 ppm que presentaron recuperación.....	46
11. Tiempo de mayor actividad biológica en tratamientos a 100 ppm sin recuperación.....	47
12. Promedio de % de inmovilidad de los tratamientos a 100 ppm sin recuperación.....	48
13. Porcentaje de inmovilidad de todos los tratamientos a 10 ppm (12-72h)	49
14. Promedio de porcentaje de inmovilidad y tiempo de mayor efecto contra el control a 10 ppm	50
15. Comparación de los promedios de % de inmovilidad de <i>A. subviscida</i> vs. <i>A. cuspidata</i> en 1000, 100 y 10 ppm.....	51
16. Comparación de % de inmovilidad de <i>A. cuspidata</i> vs. <i>A. subviscida</i> en las tres concentraciones a todos los tiempos.....	51
17. Comparación de los promedios de % de inmovilidad de <i>T. glabra</i> (raíz) vs. <i>T. glabra</i> (aérea) en 1000, 100 y 10 ppm	52
18. Comparación de % de inmovilidad de <i>T. glabra</i> (raíz) vs. <i>T. glabra</i> (aérea) en las tres concentraciones a todos los tiempos.....	53

19. Comparación de los promedios de % de inmovilidad de <i>P. varicosa</i> (raíz) vs. <i>P. varicosa</i> (bulbo) en 1000, 100 y 10 ppm.....	53
20. Comparación de % de inmovilidad de <i>P. varicosa</i> (raíz) vs. <i>P. varicosa</i> (bulbo) en las tres concentraciones a todos los tiempos.....	54
21. Comparación de % de inmovilidad de <i>A. aurantium</i> (raíz) vs. <i>A. aurantium</i> (aérea) en las tres concentraciones a todos los tiempos.....	54
22. Comparación de % de inmovilidad de <i>A. aurantium</i> (raíz) MeOH vs. <i>A. aurantium</i> (raíz) AcOEt en las tres concentraciones a todos los tiempos.	55
23. Comparación de % de inmovilidad de <i>H. terebinthinaceus</i> (agua) vs. <i>H. terebinthinaceus</i> (Hexano) en las tres concentraciones a todos los tiempos.....	56
24. Promedios de los % de inmovilidad de los extractos más activos en las tres concentraciones	56
25. Comparación del efecto biológico de <i>A. aurantium</i> (parte aérea) vs. Los extractos más activos de cada concentración.....	58
26. Porcentaje de inmovilidad de las particiones a 10 ppm (12-72h).....	59
27. Porcentaje de inmovilidad de las particiones 50 ppm (12-72h)	59
28. Comparación de % de inmovilidad de las particiones AAact y AAmet en las dos concentraciones a todos los tiempos.....	59
29. Porcentaje de inmovilidad de todos los compuestos y fracciones a 50 ppm (12-72h).....	60
30. Porcentaje de inmovilidad de todos compuestos y fracciones a 100 ppm (12-72h)	60
31. Promedios de % de inmovilidad de los compuestos a 100 y 50 ppm.....	61
32. Promedios de % de inmovilidad del estigmasterol y partición AAact.....	62
33. Promedios de % de inmovilidad de fracciones AAmet-f4, AAmet-f9 y partición AAmet.	64
34. Desplazamientos de RMN ¹ H y ¹³ C de estigmasterol	69

Índices de figuras

Figura	Página
1. Distribución de <i>N. aberrans</i> en el territorio mexicano, Cid del Prado et al., 2005	18
2. Monoterpenos con actividad nematocida	25
3. Triterpenos con actividad nematocida.....	27
4. Compuestos fenólicos con actividad nematocida contra J2 de nematodos agalladores	28
5. Alcaloides con actividad nematocida contra J2 de nematodos agalladores	28
6. Compuestos aislados de <i>A. aurantium</i> por Benítez-García (2005)	29
7. Fotografías de las plantas estudiadas.....	32
8. Fracciones obtenidas del extracto metanólico de la parte aérea de <i>A. aurantium</i> .	36
9. Comportamientos del % de inmovilidad en función del tiempo del tratamiento 100 ppm	45
10. Comparación de comportamiento % inmovilidad en función de tiempo de <i>A. subviscida</i> vs. <i>A. cuspidata</i> en las 3 concentraciones.....	51
11. Cromatoplasmas de AAmet-B.....	67
12. Cromatografía bidimensional de AAmet-B.....	68
13. Perfil cromatográfico de AAmet por CLAR	68
14. Estructura química del estigmasterol.....	69
15. Sección del espectro de RMN ¹ H de estigmasterol	71
16. Sección del espectro de RMN ¹ H de estigmasterol	72
17. Sección del espectro de RMN ¹ H de estigmasterol	73
18. Espectro RMN de ¹³ C de estigmasterol 150- 0 ppm	74
19. Sección de espectro RMN de ¹³ C de estigmasterol 150-65 ppm.....	75
20. Sección del espectro de RMN ¹³ C de estigmasterol 65-35 ppm y comparación con Koay et al., 2013	77

21. Sección del espectro de RMN ^{13}C de estigmasterol de 35 a 15 ppm y comparación con Koay et al., 2013	78
22. Sección del espectro de RMN ^{13}C de estigmasterol 14- 10 ppm.....	79
23. Estructura del estigmasterol con estereoquímica.....	79

Abreviaturas

^{13}C	Carbono 13
^1H	Hidrógeno 1
AAact	Extracto de <i>A. aurantium</i> con acetona
AAact-f4	Fracción 4 del Extracto de <i>A. aurantium</i> con acetona
AAmet	Extracto de <i>A. aurantium</i> con metanol
AAmet-f4	Fracción 4 del Extracto de <i>A. aurantium</i> con metanol
AAmet-f9	Fracción 9 del Extracto de <i>A. aurantium</i> con metanol
Ac	Acuoso
AcOEt	Acetato de etilo
ANDEVA	Análisis de varianzas
C ₁₀	Compuesto de 10 carbonos en texto se refiere a monoterpenos
C ₁₈	Compuesto de 18 carbonos en el texto se refiere a un hidrocarburo componente de la fase estacionaria de fase reversa (octadecilo)
C ₃₀	Compuesto de 30 carbonos en el texto se refiere a triterpenos
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfoxido
EtOH	Etanol o alcohol etílico
FS	Foto sensibilizador
h	Horas
Hex	Hexano
HPLC	High Performance liquid Chromatography por sus siglas en inglés, es igual a CLAR

J1	Juvenil del primer estadio
J2	Juvenil del segundo estadio
J3	Juvenil del tercer estadio
J4	Juvenil del cuarto estadio
MeOH	Metanol o alcohol metílico
MHz	Mega Hertz
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
sp ²	Hibridación sp ²
TLC	Thin layer chromatography por sus siglas en inglés
TMS	Tetrametil silano
μL	Microlitro 1x10 ⁻⁶ L
UV	Radiación ultravioleta
δ _C	Desplazamiento de carbono ¹³ C en ppm (RMN)
δ _H	Desplazamiento de hidrógeno ¹ H en ppm (RMN)

Resumen

Debido a los daños en los cultivos a causa el nematodo *Nacobbus aberrans* y a los problemas, ambientales y de salud que generan los nematicidas sintéticos utilizados para el control biológico de esta plaga, se evaluó el efecto tóxico de los extractos obtenidos de doce plantas del estado de Oaxaca, contra el estadio infectivo (J2) de *N. aberrans*. Se determinó el porcentaje de inmovilidad de los J2 en tratamientos de 10, 100 y 1000 ppm de cada extracto y las observaciones se hicieron cada 12 horas hasta las 72 h. Los resultados fueron analizados mediante ANDEVA y la prueba post hoc de Tukey, y se determinó que todos los extractos fueron efectivos a 1000 ppm, mientras que en algunos tratamientos a 100 ppm los nemátodos presentaron periodos de recuperación del movimiento. En el porcentaje de inmovilidad, en función del tiempo, se determinó que los extractos a 1000 ppm fueron efectivos entre 12 y 48 h mientras que a 100 ppm la efectividad se logró en 24 a 60 h. Finalmente, los tratamientos más activos fueron los extractos metanólicos de la raíz de *Prostechea varicosa* y de la parte aérea de *Adenophyllum aurantium*. Con base a estos resultados, el extracto de la parte aérea de *A. aurantium* fue particionado con acetona (AAact) y metanol (AAmet). Se determinó la actividad tóxica en los J2 de las dos particiones y después del análisis estadístico, se determinó que la partición de metanol (AAmet) fue la más activa (100% con 10 ppm x 24 h y 100% con 50 ppm x 12h). En ambos tratamientos no se observó recuperación de movilidad de los organismos. La mezcla AAmet fue separada en dos fracciones (AAmet-f4 y AAmet-f9), mientras que de la mezcla AAact se aisló un sólido blanco que fue identificado como estigmasterol en base a experimentos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C . El estigmasterol y un hidrocarburo lineal C_{50} , α -tertiofeno y mezcla β -sitosterol-estigmasterol, previamente reportados en la raíz de *A. aurantium*, fueron evaluados en tratamientos de 50 y 100 ppm contra J2 de *N. aberrans*. Los resultados analizados mediante ANDEVA y prueba pos hoc de Tukey, indicaron que el estigmasterol y el α -tertiofeno fueron los compuestos más activos.

Abstract

Due to damage on crops caused by the nematode *Nacobbus aberrans* and the environmental and health problems that generate synthetic nematicides which are used for biological control of this nematode, in this study the toxic effect of extracts obtained from twelve plants, in the state of Oaxaca, was evaluated against the infective stage (J2) of *N. aberrans*. The experiment was made to evaluate the percentage of immobility of J2 in treatments 10, 100 and 1000 ppm from each sample which were observed every 12 hours to during 72h. Data were analyzed by ANOVA and post hoc Tukey test, and it was found that in the terms of “concentration”, all the extracts were effective at 1000 ppm, some treatments at 100 ppm showed periods of recovery movement in J2, however; in percentage of immobility in terms of time it was determined that extracts at 1000 ppm were effective between 12 and 48 hours while at 100 ppm it was 24 to 60 h; Finally, depending on the type of extract, the most active treatments were are the methanolic extracts from root of *Prostechea varicosa* and aerial part *Adenophyllum aurantium*. Based on the results, the extract of the aerial parts of *A. aurantium* was partitioned with acetone (AAact) and methanol (AAMet). Again, the toxic activity against J2 *N. aberrans* with these two partitions were evaluated, and using ANOVA and Tukey post hoc tests, it was determined that partition methanol (AAMET) is more active partition AAact (100% at 10 ppm x 24 and 100% at ppm x 12 h), both treatments showed no recovery of mobility of organisms. The partition AAMet was separated by chromatographic techniques and there were obtained two chromatographic fractions (AAMet-f4 and AAMet-f9), and from AAact partition it was obtained a compound, which based on shift chemicals from ^1H and ^{13}C in the spectroscopic experiments of NMR, it was proposed the chemical structure of stigmaterol. The three obtained products: AAMet-f4, AAMet-f9 and stigmaterol $\approx 70\%$, together with a linear hydrocarbon C_{50} , α -terthienyl, stigmaterol and a mixture of β -sitosterol-stigmaterol from *A. aurantium* root previously reported, there examined in treatments at 50 and 100 ppm against J2 *N. aberrans*. The results analyzed by ANOVA and post hoc Tukey test indicated that stigmaterol and α -terthienyl were the most active compounds.

1. Introducción

Nacobbus aberrans (Thorne y Allenn, 1944) es un nematodo agallador de raíz, de relevante importancia fitosanitaria que parasita al tomate, frijol y chile en México. Este organismo puede causar la pérdida total de los cultivos y se ha identificado en 10 estados del territorio nacional. Debido al problema agrícola que representa, se han utilizado distintos tipos de tratamientos para su control biológico, principalmente el uso de agroquímicos con principios activos tipo organofosforados y carbamatos. Sin embargo, estos compuestos dañan la salud y el ambiente, por ello se investiga otros tipos de estrategias que puedan minimizar tales efectos.

Las plantas representan una fuente rica en diversidad de compuesto para la investigación de nuevos nematicidas; tales investigaciones cuando son *in vitro* frecuentemente evalúan el porcentaje de inmovilidad de juveniles del segundo estadio (J2), que corresponde a un estado infectivo de los nematodos agalladores. Se ha descrito que los extractos de distintas familias de plantas, principalmente Asteraceae, generan parálisis de J2 de algunos nematodos agalladores (Chitwood, 2002 y Andrés et al., 2012), debido a la presencia de metabolitos secundarios o mezclas de ellos, que de forma aislada, también presentan actividad nematicida *in vitro* contra dichos nematodos. Estos compuestos activos pueden ser de cualquier naturaleza química. Sin embargo, no hay estudios de la actividad nematicida de extractos vegetales o metabolitos secundarios contra *N. aberrans*. En el estado de Oaxaca se cuenta con una extensa biodiversidad de plantas de distintas familias, algunas de ellas son utilizadas en la medicina tradicional y otras cuentan con antecedentes de actividad plaguicida. La finalidad del trabajo fue evaluar la actividad nematicida de extractos vegetales de doce plantas del estado de Oaxaca contra J2 de *N. aberrans* y el aislamiento de al menos un compuesto con tal actividad.

2. Antecedentes

2.1 *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allenn 1944)

2.1.1 Clasificación taxonómica

Reino_____Animal
Phyllum_____Nematoda
Clase_____Secernentea
Orden_____Tylenchida
Suborden_____Tylenchida
Familia_____Pratylenchidae
Sunfamilia_____Nacobbinae
Genero_____ *Nacobbus*
Especie_____ *aberrans*

2.1.2 Orígenes y distribución

Este nematodo fue descrito por primera vez en 1948 en remolacha de azúcar, llamado “falso nematodo del nudo de raíz” o “falso agallador” porque su patrón de formación de agallas es parecido al de *Meloidogyne incognita*. Actualmente se sabe que puede parasitar hasta 84 especies de plantas, entre ellas algunas de importancia económica para México (tomate, chile y frijol) y se distribuye en las latitudes subtropicales desde Norteamérica hasta Sudamérica (Cuadro 1) y en México al menos en diez estados (Cuadro y Figura 1), aunque ya existen brotes en invernaderos del Reino Unido, Rusia, Finlandia y Holanda; probablemente por introducción de plantas infectadas, (Manzanilla-López et al., 2002).

Cuadro 1. Distribución de *N. aberrans* en el continente Americano

Región de América	Norteamérica	Centro América	Sudamérica
Países	Estados Unidos de América	México	Ecuador Perú Bolivia Chile (Norte) Argentina
Estados o departamentos	Arkansas Colorado Kansas Montana Nebraska Dakota (sur) Wyoming	Coahuila Guanajuato Hidalgo México Morelos Puebla Oaxaca San Luís Potosí Tlaxcala Zacatecas	Jujuy (Arg) Salta(Arg) Provincia de Tucumán (Arg) Región de los Andes Peruanos (Per)

Argentina (Arg) y Perú (Per). Información tomada de Manzanilla-López et al., 2002



Figura 1. Distribución de *N. aberrans* en el territorio mexicano, Cid del Prado et al., 2005

2.1.3 Ciclo biológico de *Nacobbus aberrans*

Se ha descrito que cuando las hembras secretan una matriz gelatinosa que contiene los huevos, éstos, después de completar su desarrollo embrionario, mudan al primer estadio juvenil dentro del huevo (J1) y al eclosionar pasan al estadio segundo juvenil (J2) que se caracteriza por ser móvil. Esta propiedad le permite penetrar la raíz. El J2 mudará dentro de la raíz a su tercer estadio (J3) menos activo. En este estadio ocurre el dimorfismo sexual. Con frecuencia, los J3 se localizan enrollados en la corteza de la raíz donde se desarrollan hasta llegar al cuarto estadio (J4); las hembras inmaduras vermiformes se establecen cerca del cilindro vascular de la raíz donde inducen la formación del nudo de raíz (agallas) y se desarrollarán hasta hembras adultas endoparásitas sedentarias, que depositarán sus huevos en la superficie de la raíz; J2, J3 y J4 se consideran estadios infectivos. Por otro lado, se cree que los machos migran a la raíz para localizar a las hembras y fertilizarlas (Manzanilla-López et al., 2002 y Cid del Prado et al., 2005).

A pesar de que se han desarrollado estrategias para el control de *N. aberrans*, éstas siguen siendo insatisfactorias debido a la falta de información sobre sus estadios y mecanismos de supervivencia. Se ha observado que J3 y J4 pueden encontrarse en el suelo en estados de reposo hasta doce meses (Cristóbal et al., 2001) y, bajo condiciones de laboratorio, los huevos juveniles y las hembras inmaduras pueden sobrevivir después de ocho meses en suelo deshidratado (Jatala y Kaltenbach, 1979).

2.1.4 Importancia agrícola de *N. aberrans*

En el continente Americano, países como Perú y Bolivia han sufrido más del 60% de pérdidas en cultivos de papa; en EEUU la reducción de remolacha azucarera en invernaderos es del 27-75 % y en campo es de 10- 20%; en México, *N. aberrans* ha dañado principalmente cultivos de tomate, frijol y chile (Velásquez-Valle, 2001). Sólo en el municipio de Tecamachalco y Valle de Valsequillo (Puebla), el nematodo ha causado la pérdida del 50-100% de cultivo de tomate y 18-36% de frijol (Zamudio, 1987).

En los cultivos de tomate, los daños son causados por las hembras y los estadios juveniles. Los síntomas en las plantas son un desarrollo pobre de la planta, menor tamaño, clorosis y agallas en forma de rosario en las raíces. Sin embargo, para otros cultivos como el betabel (*Beta vulgaris L.*), además de la agallas en la raíz principal, el nematodo produce lesiones en forma de grano en la cabeza de la raíz, enfermedad

conocida como “grano del betabel” (Tovar-Soto et al., 2012). Un estudio para conocer la gama de hospedantes de poblaciones mexicanas este nematodo, supone razas fisiológicas de *N. aberrans* que pueden dañar a otros cultivos de interés comercial (maíz, Papa, frijol negro, frijol bayo, nabo, zanahoria y calabaza) (Cid del Prado et al., 1997).

2.1.5 Control de *N. aberrans*

2.1.5.1 Control químico

En base a la experiencia de los agricultores se utilizan agroquímicos contra nematodos agalladores del genero *Meloidogyne* según el tipo de cultivo. Los compuestos activos de los agroquímicos utilizados generalmente son el carbofuran, (Furadan®, cufuran L-350®), fenamifos (Nemacur 400 CE®), etoprofos (Mocap ®) y aldicarb (Temik®), cuya eficiencia es variable; en ocasiones, el fenamifos es utilizado para tratar las semillas de papa, que pudieran estar infectadas por el nematodo (Main et al., 2001). Los compuestos descritos anteriormente, son dañinos a la salud humana y manifiestan algunos problemas ambientales (Fukuto, 1990), Por lo tanto, como alternativa a los problemas sanitarios y ambientales generados por el tratamiento químico, diversos grupos de investigación desarrollan nuevas estrategias para un control menos perjudicial a la salud humana y al ambiente.

2.1.5.2 Biofumigación

Los métodos de biofumigación consisten en la incorporación de materia orgánica para dar lugar a la proliferación de organismos antagonistas a los que se desea controlar, en este caso dirigidos al control de *N. aberrans*. En el control biológico de este nematodo por biofumigación, en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), existen estudios donde se ha incorporado gallinaza en tierra, observándose mejoras en el cultivo (Cristóbal-Alejo et al., 2006), o en tomate de tipo bola Saladette Var. Rio Grande¹, donde el tratamientos de gallinaza reduce el numero de nematodos de *N. aberrans*, superando a tratamientos con químicos y de asociación con plantas de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) (Cid del Prado et al., 1997).

La lombricomposta (vermicomposta) con estiércol reduce significativamente ($P \leq 0.05$) el índice de agallamiento hasta 40%, disminuye la necrosis en la raíz y recuperan el volumen radical y foliar de las plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a

nivel invernadero (Villa-Briones et al., 2008). En estudios de campo con cultivo de chile ancho (*Casicum annum L.*) se observó que el uso único de “enmiendas” orgánicas con col, lombricomposta y el hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia var. Chlamydosporia* reducen el índice de agallamiento y aumentan el peso foliar pero no existe recuperación total (Pérez-Rodríguez et al., 2001). Se ha observado que el hongo parasita los huevos y disminuye el número de juveniles de *N. aberrans* en cultivos de jitomate (*L. esculentum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Flores-Camacho et al., 2007). Sin embargo, el uso exclusivo del hongo no reduce en su totalidad los daños causados por el nematodo. Tratamientos con residuos de col (*Brassica oleracea L. cv. capitata*) en campos con cultivo de tomate, infestados de forma natural con *N. aberrans*, incrementaron el follaje, redujo el número de agallas y aumento la producción total hasta un 62% (Franco-Navarro et al., 2002).

2.1.5.3 Control de *N. aberrans* con productos naturales

Otra alternativa para el control de *N. aberrans* es el uso de productos naturales obtenidos de distintas fuentes biológicas. Se ha investigado la actividad nematicida *in vitro* con los biopolímeros quitina y quitosano obtenidos por biosíntesis con *Lactobacillus casei* a partir de cutículas de crustáceos (Sánchez-Portillo, 2010), aunque se han reportado numerosos estudios sobre la actividad biológica de extractos vegetales que provocan elevados porcentajes de inmovilidad en los juveniles J2 de nematodos agalladores del género *Meloidogyne* (estudios *in vitro*) (Chitwood, 2002, Pérez –López 2012 y Andrés et al., 2012), pero no en los J2 de *N. aberrans*.

2.2 Toxicidad de productos naturales de plantas contra nematodos agalladores

2.2.1 Extractos

Las mezclas de compuestos producidos por las plantas son una fuente potencial para el desarrollo de nuevos nematicidas, y pueden ser una alternativa al uso de compuestos sintéticos (Ntalli y Caboni, 2012). Algunos autores consideran que la familia *Asteraceae* es una de las principales fuentes de estos compuestos: porque se ha evidenciado que extractos crudos y compuestos aislados de *Asteraceae*, tienen actividad nematicida *in vitro* y en experimentos en maceta, (Chitwood, 2002, Pérez et al., 2003, Faizi et al., 2011

y Oka, 2012). Dicha actividad ha sido observada contra especies del *Meloidogyne*, sin embargo no hay reportes de la actividad nematocida contra el género *Nacobbus*, usando extractos acuosos, metanólicos, etanólicos, en hexano o acetato de etilo, en especies de otras familias como Umbeliferae, Malvaceae, Brassicaceae, entre otras (ver Cuadro 2).

Zia Ul Haq y colaboradores (2010) examinaron el efecto tóxico de extractos vegetales en concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 2% en J2 de *Meloydogine incognita* y *M. javanica* observando que en todos los extractos, el efecto biológico es mayor al aumentar la concentración, como el caso del extracto de *F. assafoetida* al 2% que generó el mayor porcentaje de inmovilidad (80 y 85% respectivamente), pero el extracto de *I. hederacea* a esa misma concentración, sólo inmovilizó al 45% de la población de *M. incognita*. Sin embargo, la parálisis de los organismos sólo fue observada hasta las 48 horas. Otros extractos alcohólicos con importante efecto tóxico en *M. incognita* son *N. tabacum* L, *S. aromaticum*, *P. betle*, *G. sylvestris* y *A. nilotica* al 1%; *D. retroflexa* , *E. microthea*, *C. album*, a 500 ppm; *N. cataria* y *C. quianesis* a 100 ppm, inmovilizaron al 94, 98, 83, 100, 100, 94, 96, 96.8, 86.6 y 73.3 % de la población de J2, respectivamente. (Taba et al., 2008;Sultana et al.,2011; Elbadri et al.,2008; Pavaraj et al.,2012).

Otros estudios con extractos acuosos de la parte aérea de *Bidens pilosa* var. *Radiata*, *Hydrocotyle dichondriles*, *Oxalis curniculata* y *Oxalis corymbosa* al 0.05% provocaron el 100, 100, 99.6 y 99.5 % de inmovilidad de J2 de *M. incognita* hasta los 7 días de exposición según Taba y colaboradores (2008), sin embargo, el extracto acuoso de la raíz de *L. camara* en proporción 1:2 provocó el 100% de inmovilidad de J2 de *M. javanica* en 24 horas (Shaukat et al., 2003)

Cuadro 2. Extractos vegetales con actividad tóxica en nematodos agalladores

Tipo de extracto	Planta	Familia	Nematodo	Referencia
EtOH 96%	<i>Ferula assafoetida</i> (res)	Umbeliferae	<i>M. incognita</i>	Zia Ul Haq et al., 2010
	<i>Grewia asiatica</i> (a)	Malvaceae		
	<i>Lepidium sativum</i> (a)	Brassicaceae		
	<i>Ferula assafoetida</i> (res)	Umbeliferae	<i>M. Javanica</i>	
	<i>Grewia asiatica</i> (a)	Malvaceae		
	<i>Ipomoea hederacea</i> (a)	Convolvulaceae		
	<i>Lepidium sativum</i> (a)	Brassicaceae		

Agua	<i>Bidens pilosa</i> var. <i>Radiata</i> (t)	Asteraceae	<i>M. incognita</i>	Taba et al., 2008
	<i>Hydrocotyle dichondrides</i> (t)	Araliaceae		
	<i>Oxalis corniculata</i> (t)	Oxalidaceae		
	<i>Oxalis corymbosa</i> (t)	Oxalidaceae		
EtOH 96%	<i>Nicotiana tabacum</i> L (h)	Solanaceae	<i>M. incognita</i>	Wiratno et al., 2009
	<i>Syzygium aromaticum</i> (v)	Myrtaceae		
	<i>Piper betle</i> (h)	Piperaceae		
Agua	<i>Lantana camara</i> (r)	Verbinaceae	<i>M. javanica</i>	Shaukat et al., 2003
EtOH AcO Et	<i>Gymnema sylvestris</i> (a) y <i>Acacia</i> <i>nilotica</i> (a)	Asclepiadaceae y Mimosaceae	<i>M. incognita</i>	Sultana et al 2011
	MeOH	<i>Dindera retroflexa</i> (h)		
<i>Eucalyptus microtheca</i> (h)		Myrtaceae		
<i>Chenopodium álbum</i> (h)		Amaranthaceae		
Hexano	<i>Cucumis melo</i> var. <i>Agrestis</i> (fr)	Cucurbitaceae	<i>M. incognita</i>	Pavaraj et al., 2012
	<i>Acacia nilotica</i> (va)	Micosaceae		
MeOH/ Soxhlet	<i>Nepeta cataria</i> (h)	Lamiaceae	<i>M. incognita</i>	Pavaraj et al., 2012
	<i>Couroupita guianensis</i> (h)	Lecythidaceae		

(t) = toda la planta, (a) = parte aérea, (res) = resina, (r) = raíz, (h) = hojas, (fr) = fruto, y (va) = vaina; en la columnas

Cuando los extractos son obtenidos con disolventes de baja polaridad, se sigue observando efecto nematicida del extracto de acetato de etilo de *G. sylvestris* y *A. nilotica* al 1%, junto con el extracto hexánico de *C. melo* var. *agrestis* y *A. nilotica* a 500 ppm, provocaron el 100, 100, 98.8 y 94.7 % de inmovilidad de J2 de *M. Incognita*. (Sultana et al., 2011 y Elbadri et al., 2008)

2.2.2 Metabolitos secundarios

Del metabolismo primario (carbohidratos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos) se derivan los metabolitos secundarios, que son compuestos necesarios para la interacción entre los organismos y con el ambiente, cuya naturaleza química es diversa. Se ha observado que algunos de estos compuestos tienen actividad tóxica en nematodos agalladores y se describen a continuación:

Terpenos

Los monoterpenos (C10) como carvacrol (Andrés et al., 2012), limoneno (Echeverrigaray et al., 2010), (+)-carvona (Oka et al., 2000) (Figura 2), entre otros, han mostrado actividades nematocidas en *M. javanica* y *M. incognita* desde el 83.1 al 100 % de inmovilidad en concentraciones de 500 y 1000 ppm (Cuadro 3). También algunos triterpenos glicosilados han mostrado actividad tóxica en concentraciones de 500 ppm (Hernández-Carlos et al., 2011). Las estructuras químicas de los compuestos descritos en el Cuadro 2, se muestran en la figura 2.

Cuadro 3. Actividad nematocida de compuestos terpénicos

Compuesto	Nematodo	Referencia
Carvacrol (1)	<i>M. javanica</i>	Andrés et al., 2012
Carvacrol 80%	<i>M. javanica</i>	Oka et al., 2000
Citronelol (3), Geraniol (4), Timol (2)	<i>M. javanica</i>	Andrés et al., 2012
1,8-Cineol (5), Limoneno (6) β-pineno (7), Acetato de linaliol (12), Acetato de Citronelol (13)	<i>M. incognita</i>	Echeverrigaray et al., 2010
(+)-Carvona (10) 50% y Limoneno 48% (6), <i>t</i> -Anetol 43% (9) y Limoneno (6%) (11) y piperitona 13% (15), (-)-Carvona 58% y Limoneno 19 % -Pulegona 70% (11)	<i>M. javanica</i>	Oka et al., 2000
Carvona 95% y Mentol 5% (14) Carvona 80% y Cineol 20%, α-Terpineno (8)	<i>M. javanica</i>	Andrés et al., 2012
16, 17, 18, 19, bayogenina (20)	<i>M. javanica</i>	Hernández Carlos et al., 2011

Nota: Porcentaje de inmovilidad > 83.1 %

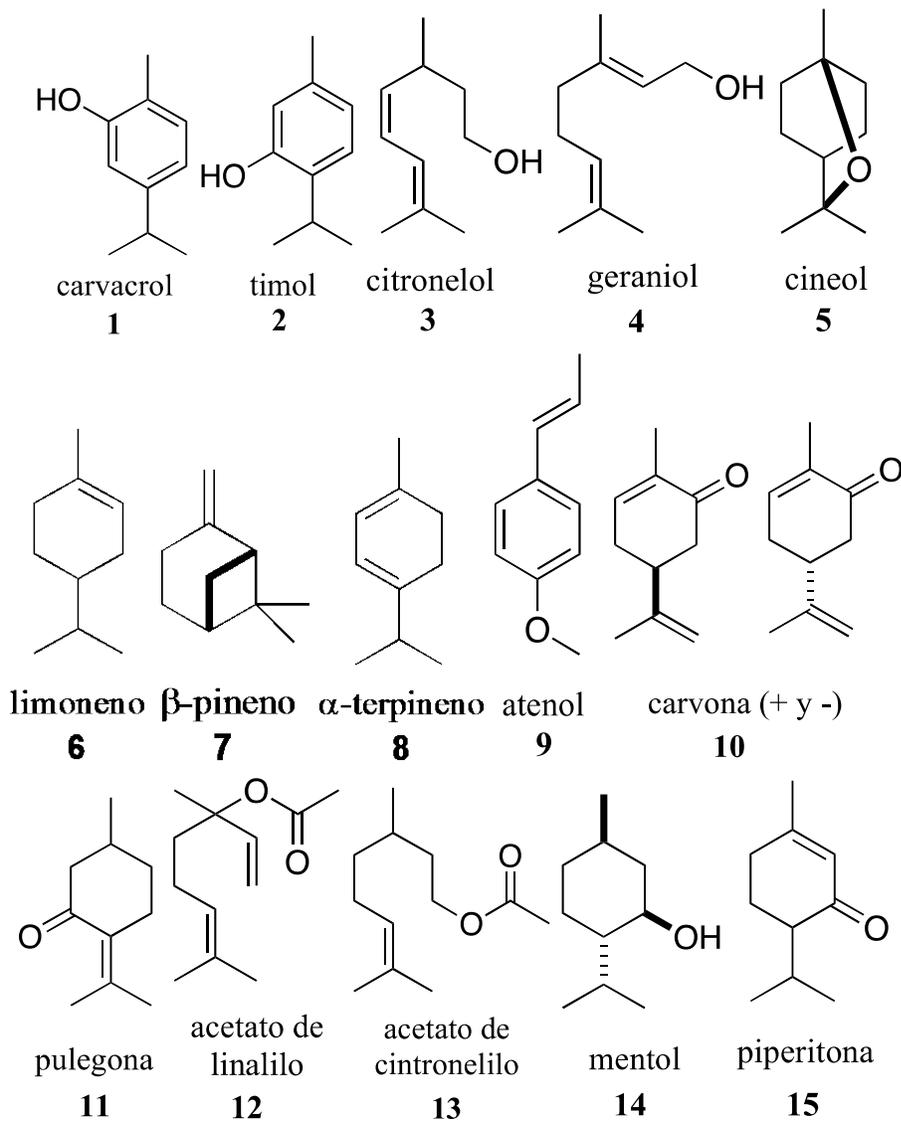
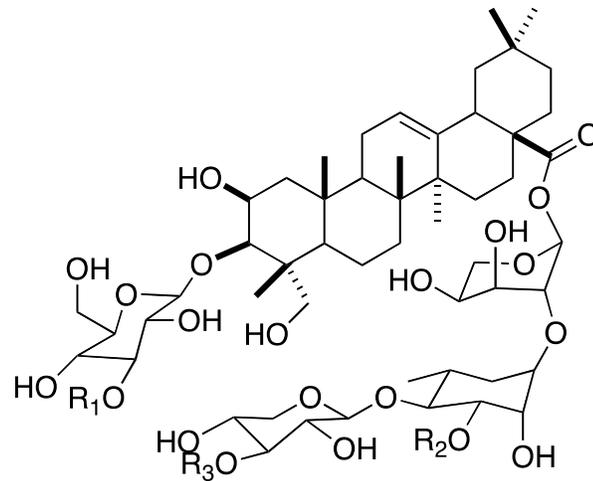


Figura 2. Monoterpenos con actividad nematocida

En otro trabajo se ha descrito la mezcla de β -sitosterol (**22**) y estigmasterol (**21**) 1:1 con 5 μ g/ml generan el 74.8% de inmovilidad en J2 de *M. incognita* (Barbosa et al., 1999). Las

estructuras de los compuestos terpénicos descritos anteriormente se muestran en la figura 3.

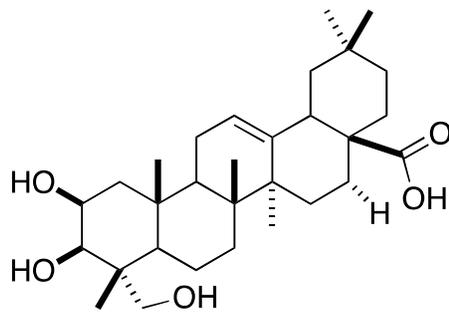


saponinas

16, 17, 18 y 19

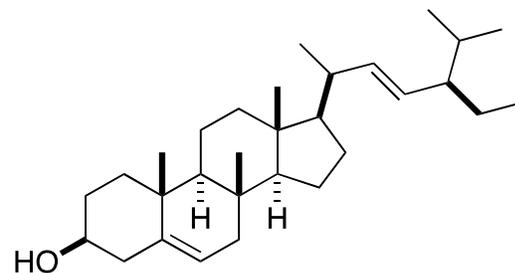
Donde

- 7) $R = OH$, $R_1 = H$, $R_2 =$ apiosa y $R_3 = H$; 8) $R = H$, $R_1 =$ glucosa, $R_2 = H$ y $R_3 =$ rafinosa;
 9) $R = OH$, $R_1 =$ glucosa, $R_2 = H$ y $R_3 =$ rafinosa y 10) $R = OH$, $R_1 =$ glucosa, $R_2 =$ apiosa y $R_3 = H$



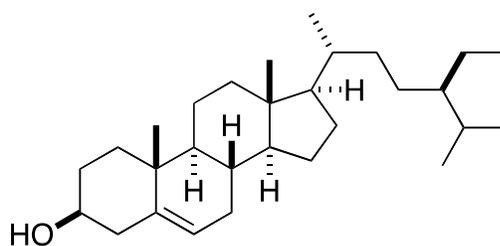
Bayogenina

20



estigmasterol

21



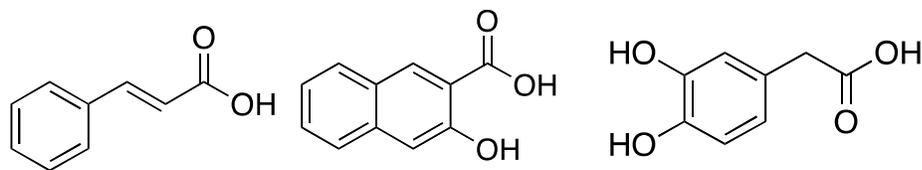
β -sitosterol

22

Figura 3. Triterpenos con actividad nematocida.

Compuesto fenólicos

Mahajan y colaboradores (1985) demostraron que los ácidos *trans*-cinámico (**23**), 2-hidroxi-naftoico (**24**) y 3,4-dihidroxifenilacético (**25**) tienen actividad nematocida en *J2* de *M. incognita* (figura 3). De la parte aérea de *Lantana camara*, se han aislado derivados de flavonoides como lantanósido (**26**) y linarósido (**27**) que al 1% tienen elevada actividad nematocida (90, 85 y 100% de inmovilidad en 24 horas), parecida al furadan® a la misma concentración, contra *M. incognita*, (Sousa y Costa, 2012). Figura 4.

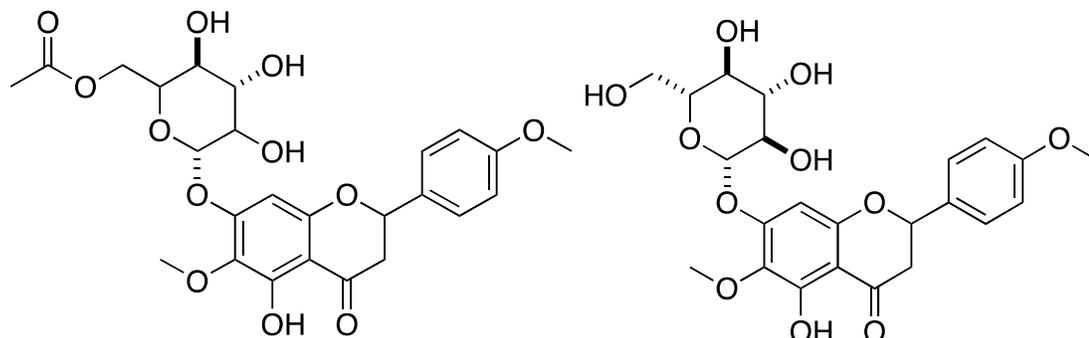


ácido *trans*-cinámico ácido 2-hidroxinaftoico ácido 3,4-hidroxifenilacético

23

24

25



lantanósido

linarósido

26

27

Figura 4. Compuestos fenólicos con actividad nematicida contra J2 de nematodos agalladores

Alcaloides

La drupacina (**28**) y otros alcaloides, del género *Cephalotaxus* como la Cefalotaxina (**30**), Cefalotaxinona (**31**) y Demetilcefalotaxinona (**29**) (Figura 5), pueden suprimir la eclosión de *M. incognita* (Wen et al., 2013).

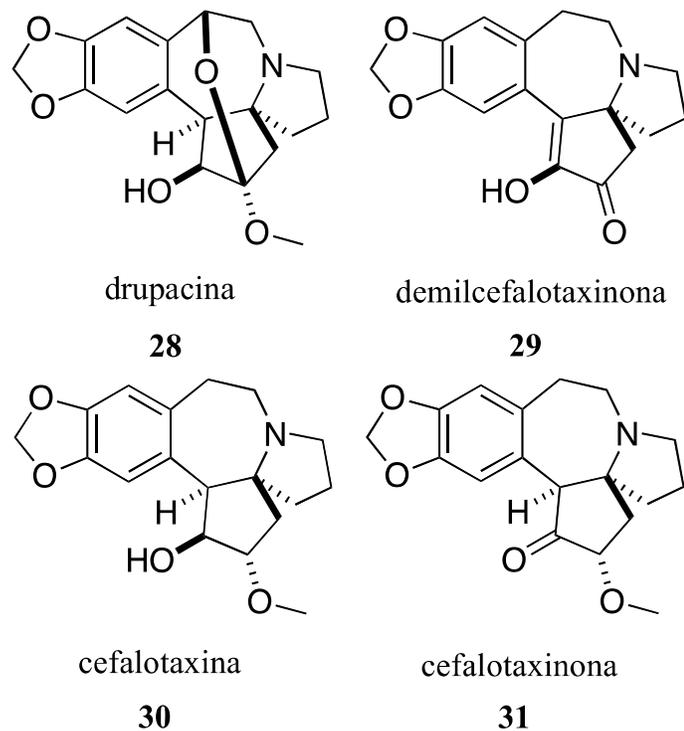


Figura 5. Alcaloides con actividad nematicida contra J2 de nematodos agalladores

2.3 Plantas de estudio

Acalypha cuspidata Jacq (Euphorbiaceae) (Figura 7-a) fue estudiada ampliamente por Rosquete (2002), quién evaluó la actividad citostática, espasmolítica, diurética y laxante de los aceites esenciales de dicha especie, y da a conocer veintidós compuestos, once de ellos nuevos. Mirón en 2005 aisló e identificó el β -sitosterol de la parte aérea de esta planta, y aunque no logró determinar los compuestos, dio a conocer la presencia de componentes inestables de naturaleza aromática.

Acalypha subviscida S. Watson (Euphorbiaceae) (Figura 7-b) es conocida como “hierba del pastor”. Esta planta está ampliamente distribuida en México, principalmente en el

estado de Oaxaca donde es usada en medicina tradicional para curar los “jiotes” (escabiosis o sarna). No cuenta con antecedentes de actividad nematicida contra *N. aberrans*, pero algunos géneros como *A. torta*, *A. tricolor* y *A. sp* presentan resistencia a nematodos agalladores como *M. incognita* (Salawu y Darabidan, 2010)

Adenophyllum aurantium (L.) (Figura 7-c) Strother (Asteraceae) es conocida en la mayoría de las poblaciones de la región Costa de Oaxaca como “Geriondilla” y “ruda montés”. Su época de floración es durante los meses de noviembre, diciembre y enero. La parte aérea de esta planta es utilizada para curar enfermedades de músculos y para algunas dermatosis. La forma común de preparación es por maceración en alcohol de las hojas y tallos, por tiempo indefinido. De la raíz de esta planta se han identificado compuestos derivados de tiofenos (**32** y **33** de la figura 6) (Benítez-García, 2005). Esta planta no cuenta con estudios de actividad nematicida, sin embargo, la familia Asteraceae es considerada una fuente de nematicidas naturales (Chitwood, 2002).

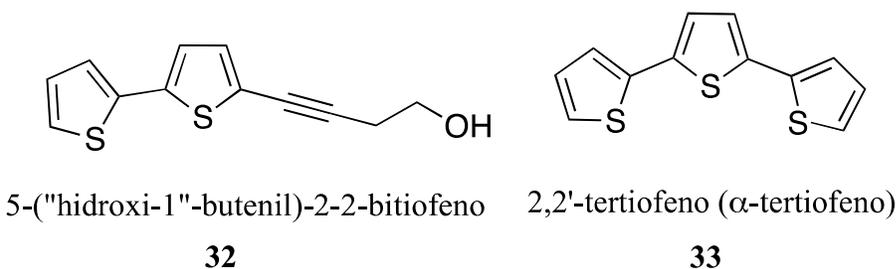


Figura 6. Compuestos aislados de *A. aurantium* por Benítez-García (2005)

Alloispermum integrifolium (DC.) H. Rob (Asteraceae) (Figura 7-d), planta conocida como prodigiosa cuyas partes aéreas son usadas como hipoglucémico (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005). No existen estudios químicos o biológicos de la especie.

Echeveria acutifolia Lindley (Crasulaceae) (Figura 7-e) es una planta de ornato, las especies vegetales pertenecientes al género *Echeveria* (Crasulaceae) que existen en México no poseen estudios químicos o biológicos en detalle. Se sabe que algunas especies de *Echeveria* contienen proantocianidinas y ácido gálico (Stevens et al., 1995) o ácido fórbico (Kringstad, 1978). Los estudios biológicos descritos en este género son aquellos que demuestran actividad espermicida (Delgado et al., 1999; Reyes et al., 2002).

Galium mexicanum Kunth (Rubiaceae) (Figura 7-f). Las infusiones orales son usadas como abortivo (Andrade-Cetto, 2005) y se ha demostrado actividades antimicrobianas,

antiparasitarias y antiinflamatorias de extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos (Bolívar et al., 2011).

Lantana achyranthifolia Desf. (Verbenaceae) (Figura 7-g) el género *Lantana* es uno de los más estudiados en cuanto a productos naturales se refiere, así de *L. achyranthifolia* se han aislado de la parte aérea flavonoides y aceites esenciales con actividad antibacteriana y antifúngica (Hussain et al., 2011, Hernández et al., 2005 y Hernández et al., 2008). Entre los compuestos identificados se encuentra el carvacrol, un compuesto con actividad nematocida probada en otras investigaciones, como se muestra en el Cuadro 3. De la raíz se aisló un nuevo compuesto de tipo furano-1-4-naftoquinona (Abeygunawardena et al., 1991). Esta planta no cuenta con estudios de actividad nematocida, sin embargo, el género *Lantana* es conocido por contener metabolitos activos contra J2 de *M. incognita* (Hussain et al., 2011 y Sousa y Costa 2012)

Prosthechea varicosa Bateman ex Lindl (Orquidaceae) (Figura 7-h). Las plantas del género *Prosthechea* (*Encyclia*) están formadas por pseudobulbos alargados, frecuentemente aplanados que portan de una a cinco hojas delgadas. Estos pseudobulbos se consumen en la sierra sur distrito de Miahuatlán para saciar la sed de los caminantes. No se le conocen usos medicinales, no posee estudios químicos o biológicos, aunque se sabe que estas especies poseen C-glicósidos de flavonas (Higgins, 2003) y bibencilos (Tovar-Gijón et al., 2006).

Salpianthus arenarius Humb & Bonpl (Nyctaginaceae) (Figura 7-i). La infusión de hojas de *S. arenarius* es usada en México para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) y se ha demostrado que posee actividad hipoglicémica en ratones diabéticos inducidos con aloxano (Pérez et al., 1993). Una especie del género *Salpianthus* (*S. purpurascens*) es usada en combinación con otras en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas (Hernández-Cano y Volpato, 2004).

Ipomoea murucoides Roem & Schult (Convolvulaceae) (Figura 7-j). Del género *Ipomoea* se ha reportado que existen alcaloides derivados de ergolina, indolizidina y nortropano; así como cumarinas, isocumarinas, norisoprenoides, diterpenos, triterpenos, lignanos y glicolípidos con potencial uso medicinal (Meira et al., 2012), sin embargo también se ha

descrito la actividad nematicida y plaguicida de una planta de este género. El tratamiento con el extracto etanólico de las semillas de *I. hederaceae* Jacq al 2% causa 45% de inmovilidad de J2 de *M. Javanica* (agallador) (Zia Ul Haq et al., 2010) y 90% en el nematodo *Helicotylenchus indicus*, así como 80, 70 y 75 % de mortalidad de los insectos plaga *Callosobruchus analis*, *Tribolium castaneum* y *Ryzopertha dominica* respectivamente; además a concentración de 100 ppm este extracto es altamente citotóxico (Ercisli et al., 2012). De la planta *I. murucoides* se ha reportado que en extractos metanólicos de ésta e *I. pauciflora*, contienen abundantes taninos, flavonoides, terpenos y alcaloides, estos dos últimos en menor cantidad (Mila-Arango 2013) y del extracto clorofórmico de las flores se han aislado los glicolípidos estoloniferina I, los ácidos simónico B y operculínico A (Chérigo y Pereda-Miranda 2006), sin embargo no hay reportes de actividad nematicida de esta especie o de sus metabolitos contra *N. aberrans*.

Heliocarpus terebinthinaceus (DC.) Hochr (Tiliaceae) (Figura 7-k). Sus hojas son utilizadas como remedio para acné y gastritis. En un estudio fitoquímico en la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM) se aisló un glicósido de flavonoide 3-O-(7'-O-E-p-cumaroil)- β -D-glucosilcaempferol (tilirósido) que tiene actividad antioxidante (Fernández-Rojas, 2006) sin embargo no se han descrito estudios de actividad nematicida del extracto.

Tournefortia glabra L (Boraginaceae) (Figura 7-l). Del genero *Tournefortia* de la especie *sarmentosa* se han aislado compuestos de tipo fenólico tournefolinas A, B, C y ácido salicílico (Lin et al., 1999) y tournefolato de etilo B, tournefolal, los ácidos tournefólico A y B, salvianólico A, isosalvianólico C, litospermico, salvianólico F y rosmarínico (Lin et al., 2002), sin embargo estos compuestos no cuentan con estudios de actividad tóxica contra nematodos agalladores y *T. glabra* tampoco cuenta con antecedentes sobre actividad nematicida.



7-a) *Acalypha cuspidata*
Jacq (Euphorbiaceae)



7-b) *Acalypha subviscida* S. Watson
(Euphorbiaceae)



7-c) *Adenophyllum aurantium* (L.) Strother
(Astecaceae)



7-d) *Alloispermum integrifolium* (DC.) H. Rob
(Asteraceae)



7-e) *Echeveria acutifolia*
Lindley (Crasulaceae)



7-f) *Galium mexicanum*
Kunth (Rubiaceae)



7-g) *Lantana achyranthifolia* Desf.
(Verbenaceae)



7-h) *Prosthechea varicosa* Bateman ex Lindl
(Orquidaceae)



7-i) *Salpianthus arenarius* Humb & Bonpl
(Nyctaginaceae)



7-j) *Ipomoea murucoides* Roem & Schult
(Convolvulaceae)



7-k) *Heliocarpus terebinthinaceus* (DC.)
Hochr (Tiliaceae).



7-l) *Tournefortia glabra*
L. (Boraginaceae).

Figura 7. Fotografías de las plantas estudiadas

3. Justificación

Debido a la importancia del control biológico del nematodo *Nacobus aberrans* y a los daños a la salud y al ambiente que generan algunos nematicidas comerciales, es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes para obtener compuestos con propiedad nematicida, por lo tanto un estudio biodirigido con extractos vegetales de doce especies de la flora endémica del estado Oaxaca, *A. cuspidata*, *A. subviscida*, *A. aurantium*, *A. integrifolium*, *E. acutifolia*, *G. mexicanum*, *H. terebinthinaceus*, *I. murucoides*, *L. achyranthifolia*, *P. varicosa*, *S. arenarius* y *T. glabra* resultan una fuente atractiva para la investigación de compuestos novedosos con actividad nematicida, ya que no se han reportado compuestos aislados con esta actividad de estas plantas contra J2 de *N. aberrans*

4. Hipótesis

Debido a que algunas plantas generan metabolitos secundarios de diversa naturaleza con actividad tóxica contra J2 de algunos nematodos agalladores, dentro de un grupo de 12 plantas con antecedentes etnobotánicos y fitoquímicos, es posible encontrar al menos un extracto con actividad nematicida y de éste obtener al menos un compuesto con esta actividad contra J2 del nematodo agallador *Nacobbus aberrans*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto nematicida de los extractos de las especies vegetales *Acalypha cuspidata*, *Acalypha subviscida*, *Adenohyllum aurantium*, *Alloispermum integrifolium*, *Echeveria acutifolia*, *Galium mexicanum*, *Heliocarpus terebinthinaceus*, *Ipomoea murucoides*, *Lantana achyranthifolia*, *Prosthechea varicosa*, *Salpianthus arenarius* y *Tournefortia glabra*, contra J2 de *Nacobbus aberrans*

5.2 Objetivos particulares

5.2.1 Determinar y seleccionar el extracto más bioactivo.

5.2.2 Evaluación de actividad nematicida en fracciones y compuestos obtenidos del extracto seleccionado

5.2.2 Elucidación estructural del o los compuestos activos

6. Materiales y métodos

El estudio químico que comprende la extracción, fraccionamiento y aislamiento de compuestos se realizaron en el laboratorio 4 de química orgánica, en el área de laboratorios de Ingeniería Ambiental de la Universidad del Mar campus (UMAR) Puerto Ángel, en el Estado de Oaxaca. La obtención de los espectros de RMN se hizo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) en la Ciudad de México. La actividad nematocida, se hizo en el laboratorio 109 de Nematología del Instituto de Fitosanidad en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), campus Montecillos en el Estado de México, en esta misma institución se proporcionó el inóculo de *Nacobbus aberrans*, así como microscopios y material de laboratorio necesario para realizar las pruebas biológicas de esta investigación

6.1 Equipos

Para la eliminación de disolventes se usó un Rotavapor Büchi Waterbath B-480 con temperatura del baño de agua a 45°C

En la separación de la fracción AAmet se utilizó un Cromatógrafo modelo Dinamax con detector UV, modelo UV-1, con columna analítica de fase reversa Supelco LiChrosorb RP-C₁₈, tamaño de partícula 5µ y dimensiones 150 mm x 4.6 mm; columna preparativa de fase reversa Econosil C₁₈, tamaño de partícula 10µ, dimensiones 250 mm x 22 mm; Se usó agua pasada por un desionizador Barnstead EasypureII a 18.3MΩ-cm, y desgasificador Bransol 551 y los disolventes usados fueron grado analítico y CLAR J.T. Backer. El agua para uso cromatográfico se desgasificó y filtró por membrana de Nylon Whatman 0.2 µm.

Para la obtención de los datos espectroscópicos se usó un espectrómetro de RMN marca Varian Mercury de 300 MHz, CDCl₃

En la obtención de masas de huevos y las observaciones de número de organismos (J2) inactivos se usó un estéreo Microscopio American Optical Corporation, modelo 570 0.7 a 4.2 X la lente. Los huevos y J2 de *N. aberrans* se incubaron en una incubadora Mechanical Convection Incubator marca Precision.

6.2 Métodos cromatográficos

Placa fina (TLC): Se determinó la fase móvil y estacionaria para separar o fraccionar los extractos **AAC**, **AAact** y **AAmet** (Figura 8), por medio de cromatografía en capa fina con cromatofolios de fase normal (silica) y reversa (C₁₈) Merck de 5 x 3 cm. Los cromatofolios fueron revelados por luz ultravioleta de onda corta y/o larga por medio de una lámpara Entela modelo CSA C22.2, con sulfato cérico amoniacal (reactivo preparado) y cámara de yodo.

Cromatografía en columna: La fracción **AAact-f4** se obtuvo por cromatografía en columna de vidrio de 50 cm de largo x 3 cm de diámetro, en soporte de sílica gel y se usaron los disolventes metanol, acetato de etilo y hexano grado reactivo Química Meyer, para cromatografía de fase normal y para fase reversa se utilizó la fase estacionaria C₁₈ Sigma-Aldrich y disolventes metanol y acetonitrilo grado reactivo Química Meyer y agua desionizada y desgasificada para cromatografía (Figura 8).

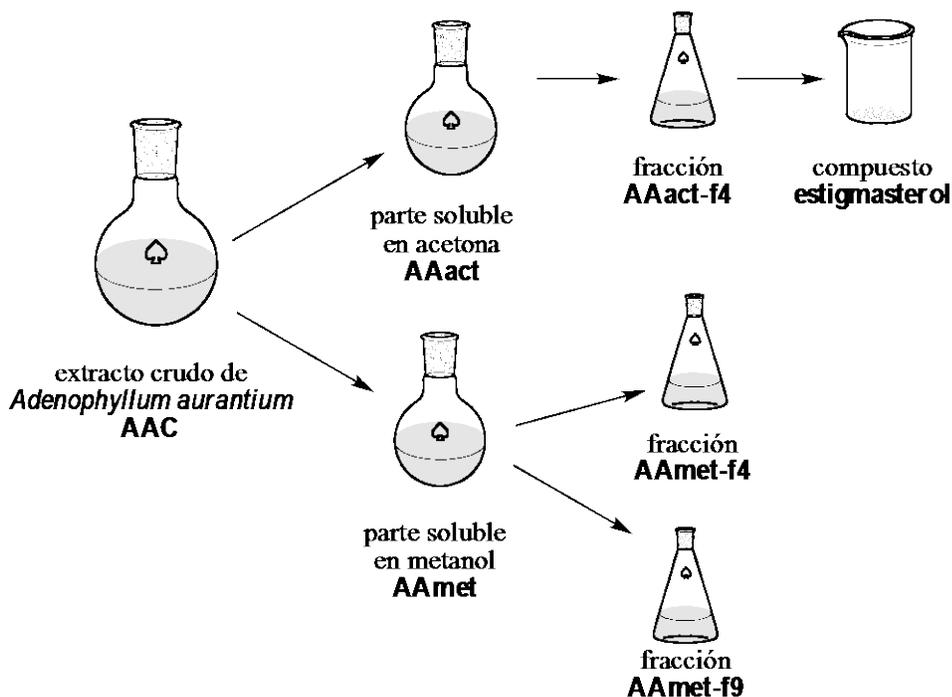


Figura 8. Fracciones obtenidas del extracto metanólico de la parte aérea de *A. aurantium*

6.3 Material vegetal

Las especies se colectaron en época de floración en: i) Jardín Botánico de la UMAR localizado en Chepilme, San Pedro Pochutla (*Salpianthus arenarius*, *Tournefortia glabra*, *Adenophyllum aurantium*) latitud 15°46'09,8"N, longitud 09°26'49,7"W, ii) Reserva comunitaria de San Miguel Suchixtepec, Miahuatlán (*Acalypha subviscida*, *Galium mexicanum*, *Alloispermum integrifolium* y *Prosthechea varicosa*) latitud 16°5'37.21"N, longitud 96°27'55.35"W. iii) Huajuapán de León Oaxaca (*Lantana achyranthifolia*) latitud 16°48'16.66"N, longitud 97°46'50.58"W, iv) Rancho los Pitillos, Ejutla (*Echeveria acutifolia*) latitud 16°33'54.50"N, longitud 96°53'51.98"W, v) Candelaria, San Pedro Pochutla (*Acalypha cuspidata*) latitud 15°55'34.46"N, longitud 96°29'29.14"W, vi) *Ipomoea murucoides* y *Heliocarpus terebinthinaceus* fueron colectadas en el jardín botánico de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM).

Todos los ejemplares fueron identificados por Dr. Gerardo Salazar Chávez Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), M. C. Ernestina Cedillo Portugal y M. C. Lilian López Chávez de la Universidad Autónoma de Chapingo

6.4 Extractos

Todas las plantas, excepto *Echeveria acutifolia*, fueron deshidratadas con cámara de luz durante una semana.

Los extractos se obtuvieron macerando el material vegetal seco dos semanas en metanol grado analítico; transcurrido el tiempo, se filtró el macerado con ayuda de un embudo de vidrio de 13 cm de diámetro, papel filtro Whatman® #5, gasa y algodón.

6.5 Fracciones AAmet-f4, AAmet-f9 y estigmasterol aislado de extracto de parte aérea *Adenophyllum aurantium* AAact.

La Separación de la fracción **AAmet** obtenida por cromatografía en columna de fase reversa fue analizada por CLAR en columna analítica de fase reversa, a flujo de 0.5 ml/min y longitud de onda del detector 254 nm, con fase móvil metanol-agua 45-50 %. La separación de la fracción se realizó por columna preparativa de fase reversa a flujo de 5ml/min usando como fase móvil metanol-agua a la misma concentración. Todas las muestras en solución, antes de ser inyectadas pasaron por filtros con tamaño de poro 0.22

µm. Se utilizaron jeringas cromatográficas Hamilton de 500, 200 y 50 µL según el volumen de inyección.

Separación de la fracción AAact. Se separó por columna usando sílica como fase estacionaria y hexano(Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH): Hex, Hex-AcOEt 9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 1:2, 1:3, 2:8, 9:1, AcOEt, AcOEt-MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 1:2, 1:3, 2:8, 9:1, MeOH; la fracción obtenida **AAact-f4** fue purificada por recristalización con diclorometano y MeOH.

6.6. Compuestos

El estigmasterol (aprox. 70%) fue extraído de AAact y su estructura fue elucidada a partir de los datos espectroscópicos descritos en la sección 6.1.

Los compuestos estigmasterol, mezcla estigmasterol/β-sitosterol, α-tertiofeno, hidrocarburo C₅₀ y la fracción 33b, obtenidos de la raíz de *A. aurantium*, fueron proporcionados por la pasante de Biología Bilma Angelina de la UMAR campus Puerto Escondido producto de la investigación para su tesis.

6.7. Juveniles del segundo estadio de *N. aberrans*

Se utiliza solución de hipoclorito de sodio NaClO al 0.53% para disolver la masa gelatinosa que protege lo huevos del nematodo, tamices de 100 y 400 para lavar y recuperar los organismos.

6.8. Actividad nematocida

Se determinó la actividad biológica en placas de 96 pozos, colocando 100 – 150 J2 por pozo (Taba et al., 2008) con disoluciones de extracto o compuesto, preparadas en DMSO 0.5% en un volumen final de 5 µL más 95 µL de agua destilada, (volumen final 100 µL x 100 J2), las concentraciones finales fueron de 10, 100 y 1000 ppm para cada extracto y fracciones, y para compuestos 10 y 100 ppm; y se incubaron con los organismos a 24 °C. Se contó el número de organismos activos cada 12 horas, hasta cumplir 72 horas de tratamiento y posteriormente se calculó el porcentaje de inmovilidad. Los nematodos se consideran muertos cuando no se mueven si se les toca con un aguja fina. Todos los

tratamientos se replicaron 5 veces, como blanco o testigo DMSO con 0.5% de tween 20 en un volumen final de 5 μ L más 95 μ L de agua destilada.

Con la finalidad de asegurar que el tratamiento presentó efecto nematicida y observar si existió recuperación o resistencia de los J2 al tratamiento, al ensayo de mayor concentración (1000 ppm), al finalizar las 72 h con ayuda de un tamiz # 400, los organismos de cada pozo se lavaron con agua destilada 3 veces y se depositaron en su pozo correspondiente; se incubaron nuevamente a 24°C por 72 horas y se observó en el microscopio si presentaban movilidad los J2. La inmovilidad se determinó de acuerdo a la siguiente formula (Argentieri et al., 2008 y D'Addabbo et al., 2013)

$$i = 100 \times (1 - nt/nc)$$

Ecuación 1

Dónde:

i = % de nematodos inmóviles

nt = número de nematodos activos después del tratamiento (población final con tratamiento)

nc = número de nematodos activos en el control (población final sin tratamiento)

Los resultados del porcentaje de inmovilidad fueron tratados por análisis de varianza (ANDEVA) con el programa SigmaStat versión 3.0

Resultados

7.1 Rendimiento de extractos

Los extractos obtenidos tuvieron los siguientes rendimientos (Cuadro 4):

Cuadro 4. Rendimientos de extractos

	Planta	Peso material seco/peso extracto (gramos)	% recup.
1	<i>T. glabra</i> (raíz)	54.6338/1.661	3.040
2	<i>T. glabra</i> (parte aérea)	60.3744/7.1916	11.91
3	<i>A. cuspidata</i>	14.3328/0.52	3.62
4	<i>A. subviscida</i>	500/46.4617	9.29
5	<i>P. varicosa</i> (bulbo)	400/9.7952	2.45
6	<i>P. varicosa</i> (raíz)	85/5.6566	6.65
7	<i>L. achyranthifolia</i>	53.7112/0.6822	1.27
8	<i>A. integrifolium</i>	61.6926/8.5458	13.83
9	<i>A. aurantium</i> (aérea)	800/78.4028	9.80
10	<i>A. aurantium</i> (raíz)	215.7/ 7.9512- 1.8499	MeOH (2.8) AcOEt(0.85)
11	<i>E. acutifolia</i>	500/6.5013	1.30
12	<i>G. mexicanum</i>	108.10/8.1889	7.58
13	<i>S. arenarius</i>	140.00/38.443	27.459
14	<i>H. terebinthinaceus</i> (agua)	Datos UTM	0.70
15	<i>H. terebinthinaceus</i> (hexano)	Datos UTM	3.03
16	<i>I. murucoides</i> (Éter)	Datos UTM	3.00

7.2 Obtención de J2

Por medio de la solución de hipoclorito de Sodio al 0.53% se logró disolver la masa gelatinosa que protegía a los huevos de nematodo; se lograron extraer alrededor de 500 masas de huevos de las raíces agallas. Con ayuda de tamices #100 y 400, se recuperaron

los huevos de *N. aberrans*, los cuales eclosionaron entre 5 y 7 días a 24 °C, para obtener aproximadamente 40 500 J2 necesarios para todos los estudios.

7.3 Actividad nematocida de extractos

Una vez obtenidos los J2 de *N. aberrans*, fueron sumergidos en disoluciones de los extractos indicados en la sección 7.1 en concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm con DMSO al 0.005%; se observaron cada 12 horas, al igual que el grupo control que contenía únicamente solución acuosa de DMSO a 0.005%. Los resultados se muestran a continuación

7.3.1 Tratamiento 1000 ppm

En el Cuadro 5 se presenta el promedio y desviación estándar (de) de los resultados obtenidos de las cinco réplicas, en todos los tratamiento a concentración de 1000 ppm y en los tiempos observados.

Cuadro 5. Porcentaje de inmovilidad de todos los tratamientos a 1000 ppm (12-72h)

	CON. 1000ppm	12h	de	24h	de	36h	de	48h	de	60h	de	72h	de
1	<i>T. glabra</i> L. (r) MeOH	82.04	7.21	91.29	6.03	94.18	2.14	96.71	3.30	96.32	2.17	97.87	0.47
2	<i>T. glabra</i> L. (a) MeOH	77.98	14.45	88.87	6.47	95.96	1.42	95.31	1.30	96.17	1.23	96.97	0.69
3	<i>A. subviscida</i> MeOH	88.10	3.23	88.29	4.99	97.27	0.61	98.83	1.33	98.57	1.71	98.65	0.86
4	<i>A. cuspidata</i> MeOH	83.11	3.83	87.26	3.49	97.61	1.04	97.95	1.24	97.33	2.06	98.03	1.54
5	<i>P. varicosa</i> (b) MeOH	86.01	8.38	69.90	6.79	93.68	2.18	97.43	3.06	97.89	1.72	99.23	1.72
6	<i>L. achyranthifolia</i>	89.86	2.21	90.97	4.68	96.62	5.35	98.39	1.64	98.58	1.78	98.97	1.85
7	<i>P. varicosa</i> (r) MeOH	98.59	2.34	98.45	1.74	97.71	2.89	99.82	0.40	99.64	0.80	99.83	0.37
8	<i>A. integrifolium</i> MeOH	71.53	10.65	95.33	2.64	93.02	5.68	98.43	1.35	99.38	0.86	99.62	0.52
9	<i>A. aurantium</i> (a) MeOH	83.73	4.35	94.35	2.16	98.68	1.15	98.43	1.69	98.65	1.26	98.38	1.91
10	<i>A. aurantium</i> (r) MeOH	77.19	9.01	69.94	3.98	95.81	3.46	99.09	0.08	100.0	0.00	100.0	0.00
11	<i>E. acutifolia</i> MeOH	74.50	3.08	77.62	3.53	79.18	7.41	85.75	4.93	78.19	6.93	79.61	3.41
12	<i>G. mexicanum</i> MeOH	86.94	1.73	92.79	2.00	97.03	1.34	97.65	1.55	97.43	1.17	97.84	1.42
13	<i>S. arenarius</i> MeOH	86.99	2.92	92.36	3.24	92.62	5.93	94.44	5.18	95.47	4.17	96.35	3.45
14	<i>A. aurantium</i> (r) AcOEt	74.84	6.81	90.06	6.11	96.78	3.34	99.84	0.35	100.0	0.00	100.0	0.00
15	<i>H. terebinthinaceus</i> Ac	93.76	2.26	98.89	1.24	100.0	0.00	98.43	1.23	99.28	0.99	98.09	0.92
16	<i>H. terebinthinaceus</i> Hx	41.43	6.60	68.97	6.09	68.53	6.20	82.22	5.52	77.92	5.22	79.35	3.69
17	<i>I. murucoides</i> Éter	11.99	4.53	47.61	11.5	76.16	3.56	65.70	6.67	76.36	4.53	75.34	5.09

(r) = raíz, (a)= parte aérea, (b)=bulbo, Ac= agua y Hx= hexano

Con base en los resultados analizados con ANDEVA de tres vías se determinó que el % de inmovilidad difiere significativamente por tipo de extracto [$F_{(16, 1632)} = 363.003$, $p < 0.001$], por la concentración empleada [$F_{(3, 1632)} = 39244.216$, $p < 0.001$], por el tiempo de exposición [$F_{(5, 1632)} = 873.825$, $p < 0.001$], y por la interacción de los tres factores (extracto x concentración [$F_{(48, 1632)} = 109.011$, $p < 0.001$]; extracto por tiempo [$F_{(80, 1632)} = 15.180$, $p < 0.001$], concentración por tiempo [$F_{(15, 1632)} = 277.997$, $p < 0.001$] y extracto x concentración x tiempo [$F_{(240, 1632)} = 15.491$, $p < 0.001$]). El análisis de los datos por la prueba pos hoc de Tukey, determinó que todos los extractos en concentración de 1000 ppm produjeron el mayor efecto de inmovilidad. A esta concentración se observó el aumento gradual del porcentaje de inmovilidad conforme el tiempo aumenta, excepto *P. varicosa* (raíz), *E. gigantea*, *A. aurantium* (parte aérea) y *H. terebinthinaceus* (agua). En el cuadro (6) se enlista el % promedio de inmovilidad de cada extracto a 1000 ppm, y el tiempo de aparición del mayor % de inmovilidad.

Cuadro 6. Promedio de % de inmovilidad a 1000 ppm y tiempo donde inicia el mayor efecto biológico

Extracto	Media (mínimos cuadrados)	Tiempo (Horas) *
<i>T. glabra</i> L. (raíz) MeOH	93.070*	48
<i>T. glabra</i> L. (aérea) MeOH	91.876	48
<i>A. subviscida</i> MeOH	94.952	36
<i>A. cuspidata</i> MeOH	93.548	36
<i>P. varicosa</i> (bulbo) MeOH	90.691	36
<i>L. achyranthifolia</i>	95.565*	24
<i>P. varicosa</i> (raíz) MeOH	99.008*	12*
<i>A. integrifolium</i> MeOH	92.887	24
<i>A. aurantium</i> (aérea) MeOH	95.370*	12*
<i>A. aurantium</i> (raíz) MeOH	90.338	36
<i>E. acutifolia</i> MeOH	79.142*	12*
<i>G. mexicanum</i> MeOH	94.945	36

<i>S. arenarius</i> MeOH	93.039	24
<i>A. aurantium</i> (raíz) AcOEt	93.588	24
<i>H. terebinthinaceus</i> (Ac)	97.751*	12*
<i>H. terebinthinaceus</i> (Hx)	69.736	24
<i>I. murucoides</i> Eter	58.860	24

(*) Tiempo donde no hay cambios significativos (<0.050) en comparación al tiempo de mayor valor.

Los tres tratamientos que produjeron la mayor inmovilidad en solo 12 h fueron *P. varicosa* (raíz) 99.008 % 12h, *H. terebinthinaceus* (agua) 97.751% 12h, y *A. aurantium* (parte aérea) 95.370% 12 h, mientras que *L. achyranthifolia* 95.365% lo hizo a las 24 h.

Después del primer tratamiento (1000 ppm) cuya concentración fue la más elevada, todos los organismos fueron lavados con agua destilada y se recuperaron con tamices de 100 y 400, finalmente fueron sumergidos en las microplacas con agua destilada e incubados a 24°C; se observó que después 72 horas todos los tratamientos tenían J2 activos (Cuadro 7).

Cuadro 7. J2 recuperados después de 72 horas

Extractos	% J2 activos	Desy. Estandar
1 <i>T. glabra</i> L. (raíz) MeOH	5.60	2.88
2 <i>T. glabra</i> L. (aérea) MeOH	9.0	3.00
3 <i>A. subviscida</i> MeOH	3.20	1.92
4 <i>A. cuspidata</i> MeOH	9.0	6.36
5 <i>P. varicosa</i> (bulbo) MeOH	0.40	0.55
6 <i>L. achyranthifolia</i> MeOH	5.60	6.58
7 <i>P. varicosa</i> (raíz) MeOH	3.20	1.30
8 <i>A. integrifolium</i> MeOH	0.20	0.45
9 <i>A. aurantium</i> (aérea) MeOH	2.0	3.46
10 <i>A. aurantium</i> (raíz) MeOH	0.20	0.45
11 <i>E. acutifolia</i> MeOH	0.20	0.45
12 <i>G. mexicanum</i> MeOH	4.20	2.28

13	<i>S. arenarius</i> MeOH	6.40	3.97
14	<i>A. aurantium</i> (raíz) AcOEt	1.20	1.64
15	<i>H. terebinthinaceus</i> Agua	11.20	8.87
16	<i>H. terebinthinaceus</i> Hexano	40.67	9.24
17	<i>I. murucoides</i> Éter	34.60	9.56

7.3.2 Tratamiento 100 ppm

En el Cuadro 8 se presenta el promedio y desviación estándar (de) de los resultados obtenidos de las cinco réplicas, en todos los tratamientos a concentración de 100 ppm y en los tiempos observados

Cuadro 8. Porcentaje de inmovilidad de todos los tratamientos a 100 ppm (12-72h)

	CONC. 100 PPM	12h	de	24h	de	36h	de	48h	de	60h	de	72h	de
1	<i>T. glabra</i> L. (r) MeOH	66.13	6.69	23.99	4.18	41.30	4.93	49.77	5.95	69.54	3.58	77.46	3.78
2	<i>T. glabra</i> L. (a) MeOH	51.10	9.00	25.97	4.28	27.20	4.23	45.12	5.42	67.36	7.23	76.57	4.70
3	<i>A. subviscida</i> MeOH	39.56	2.70	9.17	4.59	14.05	4.29	20.56	2.67	67.72	10.14	76.38	4.35
4	<i>A. cuspidata</i> MeOH	35.37	6.06	28.54	6.33	20.37	7.06	22.63	6.84	68.06	6.36	75.97	6.64
5	<i>P. varicosa</i> (b) MeOH	18.72	4.66	13.67	6.73	18.34	8.34	27.55	7.93	68.89	7.34	76.76	5.47
6	<i>L. achyranthifolia</i>	82.21	2.03	77.68	3.96	66.07	3.11	72.64	3.54	76.58	3.89	81.95	4.28
7	<i>P. varicosa</i> (r) MeOH	82.24	5.82	75.76	8.41	64.88	8.56	71.28	5.19	75.10	2.93	79.91	1.99
8	<i>A. integrifolium</i> MeOH	18.94	7.14	31.15	8.45	71.32	3.07	74.82	2.60	76.59	5.14	82.14	2.98
9	<i>A. aurantium</i> (a) MeOH	81.00	1.06	81.15	4.67	73.34	3.52	72.34	4.55	81.65	2.61	82.31	5.25
10	<i>A. aurantium</i> (r) MeOH	26.53	6.03	30.51	6.16	51.08	7.05	61.93	2.38	73.48	6.88	76.92	3.98
11	<i>E. acutifolia</i> MeOH	22.41	3.35	16.88	5.91	17.59	4.57	16.52	2.66	56.58	6.66	60.55	4.94
12	<i>G. mexicanum</i> MeOH	23.53	6.64	25.91	5.80	24.56	5.48	35.80	3.10	68.74	4.16	74.52	8.60
13	<i>S. arenarius</i> MeOH	19.52	2.85	23.60	6.10	20.55	4.18	34.16	2.86	66.96	7.11	76.89	3.37
14	<i>A. aurantium</i> (r) AcOEt	16.43	4.58	47.01	8.18	44.81	3.63	47.70	4.19	72.73	10.15	75.34	5.65
15	<i>H. terebinthinaceus</i> Ac	5.47	2.55	2.62	1.95	24.09	6.24	35.68	5.96	79.77	6.79	82.28	4.76
16	<i>H. terebinthinaceus</i> Hx	5.70	2.29	13.38	9.52	28.35	9.84	20.64	9.54	39.33	12.33	25.12	11.37
17	<i>I. murucoides</i> Eter	0.35	0.78	15.06	1.81	15.65	3.96	12.05	4.29	49.76	7.97	50.97	7.42

(r) = raíz, (a)= parte aérea, (b)=bulbo, Ac= agua y Hx= hexano

Para el tratamiento de 100 ppm (Cuadro 8) se observó que los extractos de *T. glabra* (raíz y parte aérea), *A. subviscida*, *A. cuspidata*, *A. aurantium* (parte aérea), *P. varicosa* (bulbo

y raíz), *H. terebinthinaceus* (hexano) y *L. achyranthifolia* no paralizaron a los J2 de forma regular, debido a que presentaron periodos de recuperación durante la exposición al extracto, esto se determinó por que se observó que los datos reportados no tranzaban una curva progresiva de respuesta en función del tiempo, sino que en algún punto de la curva el % de inmovilidad disminuía de forma significativa y aumentaba posteriormente conforme el tiempo exposición avanzaba. Dicho comportamiento se esquematiza en la figura (9- b); el resto de los extractos tuvieron efecto biológico gradual al aumentar el tiempo, curva esperada por la respuesta (% de inmovilidad) en función de tiempo (Figura 9- a).

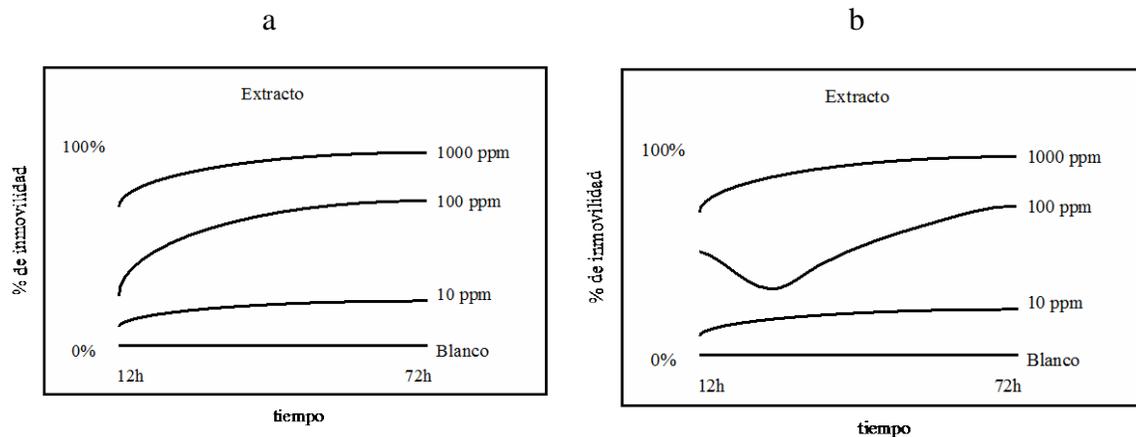


Figura 9. Comportamientos del % de inmovilidad en función del tiempo del tratamiento 100 ppm

Para el grupo de extractos que presentaron recuperación durante el tratamiento (figura 9- b), los tiempos donde los % de inmovilidad son significativamente mayores a los tiempos iniciales (12 y 24 h) y de recuperación se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Tiempo de mayor efecto en tratamientos a 100 ppm con recuperación

Extracto 100 ppm	Hora
<i>T. glabra</i> (raíz)	72
<i>T. glabra</i> (parte aérea)	60
<i>A. subviscida</i>	60
<i>A. cuspidata</i>	60

<i>P. varicosa</i> (bulbo)	60
<i>A. aurantium</i> (parte aérea)	60

Para el caso de *H. terebinthinaceus* (hexano) se observaron dos tiempos de recuperación a las 48 y 72 h. Por el contrario, los tratamientos con *P. varicosa* (raíz) y *L. achyranthifolia*, presentaron recuperación a las 36 horas, donde el 64.88 y 66.07 % de J2 permaneció inmóvil, aumentando significativamente a las 48 a 72 h. Se reportaron valores semejantes a los del primer tiempo (82.24%, 12h – 79.91%, 72 h) y (82.21, 12h- 81.95, 72h) respectivamente, ambos sin diferencias significativas. Sin embargo, estos tratamientos junto con *A. aurantium* (Parte aérea) son los que tienen el mayor efecto biológico a 100 ppm desde las 12 horas en comparación con todos los tratamientos a esta concentración (Cuadro 10).

Cuadro 10. Promedio de % de inmovilidad de los tratamientos a 100 ppm que presentaron recuperación.

Grupo con recuperación	Media
<i>T. glabra</i> (raíz)	54.698
<i>T. glabra</i> (parte aérea)	48.887
<i>A. subviscida</i>	37.907
<i>A. cuspidata</i>	41.823
<i>P. varicosa</i> (bulbo)	37.324
<i>L. achyranthifolia</i>	76.186*
<i>P. varicosa</i> (raíz)	74.862*
<i>A. aurantium</i> (parte aérea)	78.631*
<i>H. terebinthinaceus</i> (agua)	22.086

(*)Datos significativamente mayores al grupo de datos.

Los comportamientos de recuperación de movilidad de organismos después del tratamiento de 100 ppm, como se presenta en el cuadro 10, y las variaciones de inmovilidad en función del tiempo como se aprecia en este grupo de experimentos, puede ser explicada posiblemente a causa de resistencia o recuperación de los organismos frente al medio. Algunos autores no consideran la inmovilidad como un reflejo de la mortalidad

de los nematodos porque está evidenciado que después de algún tratamiento, existe recuperación de los J2 de algunos nematodos agalladores, (Heeswijck, 2004 y Ahmad et al., 2010), lo cual se ha descrito como “parálisis temporal”, posiblemente a causa de la presencia de sustancias con efecto “nematostático” (Ntalli et al., 2010). Según Ibáñez (2005), la inmovilidad de nematodos es causada por la reducción de sus funciones vitales incluyendo el movimiento, por lo tanto, adopta una posición rígida en presencia de condiciones desfavorables, al punto de presentarse un estado de mortalidad no comprobado; por ello es necesario hacer lavados del tratamiento para garantizar el efecto estudiado

Los tratamientos que demostraron actividad biológica sin periodos de recuperación fueron: *A. integrifolium*, *A. aurantium* (raíz), *A. aurantium* (raíz AcOEt) *E. gigantea*, *G. mexicanum*, *S. arenarius*, *H. terebinthinaceus* (agua) e *I. muruoides*. Los tiempos en que los extractos provocaron un % de inmovilidad significativamente diferente ($P < 0.050$) se muestran a continuación en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Tiempo de mayor actividad biológica en tratamientos a 100 ppm sin recuperación

Extracto (100 ppm)	Hora
<i>A. integrifolium</i>	36
<i>A. aurantium</i> (raíz)	36
<i>A. aurantium</i> (raíz-AcOEt)	24
<i>E. acutifolia</i>	60
<i>G. mexicanum</i>	48
<i>S. arenarius</i>	48
<i>H. terebinthinaceus</i> (Agua)	36
<i>I. muruoides</i>	60

El promedio de % de inmovilidad de los tratamientos que no mostraron recuperación, a continuación se presentan en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Promedio de % de inmovilidad de los tratamientos a 100 ppm sin recuperación

Grupo	Media (%)
<i>A. integrifolium</i>	59.160
<i>A. aurantium</i> (raíz)	53.409
<i>E. gigantea</i>	31.756
<i>G. mexicanum</i>	42.179
<i>S. arenarius</i>	40.278
<i>A. aurantium</i> (AcOEt)	50.670
<i>H. terebinthinaceus</i> (agua)	38.318
<i>I. muruoides</i>	23.975

Con base en los resultados del tratamiento anterior para el ensayo de 10 ppm se excluyeron los extractos con las medias más bajas: *H. terebinthinaceus* (Hexano) e *I. muruoides*, ya que el comportamiento de dosis-respuesta de todos los extractos a 1000 y 100 ppm sugiere que a una concentración 10 veces menor a 100 ppm, no se observaría actividad.

7.3.3 Tratamiento 10 ppm

En el Cuadro 13 se presenta el promedio y desviación estándar (de) de los resultados obtenidos de las cinco réplicas, en todos los tratamientos a concentración de 10 ppm y en los tiempos observados y se observó un fenómeno parecido al de “recuperación durante el tratamiento”, sin embargo, no se encontraron cambios significativos por lo que no fueron considerados como tal.

Cuadro 13. Porcentaje de inmovilidad de todos los tratamientos a 10 ppm (12-72h)

	CONC. 10 PPM	12h	de	24h	de	36h	de	48h	de	60h	de	72h	de
1	<i>T. glabra</i> L. (r) MeOH	26.57	7.69	12.95	3.04	17.30	1.63	34.69	5.46	33.70	5.72	34.13	5.35
2	<i>T. glabra</i> L. (a) MeOH	11.78	6.80	13.18	4.60	13.07	6.26	17.79	2.80	17.51	4.03	19.66	5.00
3	<i>A. subviscida</i> MeOH	2.04	2.10	1.35	1.57	11.42	4.31	15.06	1.23	14.71	2.29	15.55	5.31
4	<i>A. cuspidata</i> MeOH	8.87	3.77	2.32	1.91	19.39	5.40	20.63	3.38	16.87	8.97	21.78	6.94
5	<i>P. varicosa</i> (b) MeOH	14.82	6.57	12.01	1.70	13.70	6.17	16.78	5.81	17.27	4.50	20.42	5.35
6	<i>L. achyranthifolia</i> MeOH	1.27	1.11	1.96	1.42	29.12	5.28	28.77	6.62	20.59	7.04	18.98	7.09
7	<i>P. varicosa</i> (r) MeOH	5.89	5.01	6.65	5.79	22.67	10.69	21.85	9.03	21.83	13.1	27.85	9.92
8	<i>A. integrifolium</i> MeOH	13.17	7.14	11.88	5.84	12.54	4.00	24.00	6.82	23.91	8.04	26.00	9.45
9	<i>A. aurantium</i> (a) MeOH	10.14	3.92	13.64	6.69	15.91	5.24	24.58	10.4	26.74	6.41	33.94	9.84
10	<i>A. aurantium</i> (r) MeOH	19.27	5.51	14.92	4.65	17.16	2.20	27.50	3.21	18.90	6.38	29.93	8.69
11	<i>E. gigantea</i> MeOH	4.25	3.99	6.77	3.91	7.78	3.10	6.88	5.97	24.48	3.11	24.39	6.60
12	<i>G. mexicanum</i> MeOH	14.94	2.43	16.74	4.05	17.20	2.72	19.18	3.67	22.66	2.46	16.39	4.12
13	<i>S. arenarius</i> MeOH	1.36	3.03	11.96	1.30	6.54	3.75	8.11	1.48	8.99	2.55	11.39	4.80
14	<i>A. aurantium</i> (r) AcOEt	2.52	1.65	4.52	1.46	5.02	1.27	6.78	2.31	10.59	4.19	9.83	2.11
15	<i>H. terebinthinaceus</i> Ac	0.14	0.30	0.41	0.61	3.63	1.57	11.72	3.67	13.93	4.85	15.16	5.58

(r) = raíz, (a)= parte aérea, (b)=bulbo y Ac= agua

A esta concentración los extractos que fueron diferentes estadísticamente significativos y superiores a los blancos desde las 12 h, fueron: *T. glabra* (raíz y parte aérea), *P. varicosa* (bulbo), *A. integrifolium*, *A. aurantium* (raíz y parte aérea) y *G. mexicanum*. Sin embargo los extractos restantes, al aumentar el tiempo de exposición inmovilizaron a los J2 de forma significativamente diferente y mayor al blanco, con excepción del tratamientos con extracto de AcOEt de la raíz de *A. aurantium*, que en todos los tiempos no fue diferente estadísticamente al blanco. A continuación, en el cuadro 14, se muestra el promedio de cada tratamiento y el tiempo a partir de donde fueron diferentes al blanco.

Cuadro 14. Promedio de porcentaje de inmovilidad y tiempo de mayor efecto contra el control a 10 ppm

Extracto	media	Tiempo para % de inmovilidad diferente del blanco P<0.05
<i>T. glabra</i> (raíz)	26.557	12
<i>T. glabra</i> (parte aérea)	15.500	12
<i>A. subviscida</i>	10.021	36
<i>A. cuspidata</i>	14.941	36
<i>P. varicosa</i> (bulbo)	15.833	12
<i>L. achyranthifolia</i>	16.783	36
<i>P. varicosa</i> (raíz)	17.788	36
<i>A. integrifolium</i>	18.586	12
<i>A. aurantium</i> (parte aérea)	20.825	24
<i>A. aurantium</i> (raíz)	21.277	12
<i>E. gigantea</i>	12.426	60
<i>G. mexicanum</i>	17.852	12
<i>S. arenarius</i>	8.058	24
<i>A. aurantium</i> (raíz-AcOEt)	6.545	Es igual al blanco
<i>H. terebinthinaceus</i> (agua)	7.495	48

7.3.4 Comparación de la actividad biológica entre extractos del mismo género.

En los experimentos se observó que al menos en los extractos de *A. cuspidata* y *A. subviscida*, que son especies distintas del mismo género, no existen diferencias significativas y describen un mismo comportamiento dosis-respuesta y es similar la respuesta en función del tiempo. (figura 10).

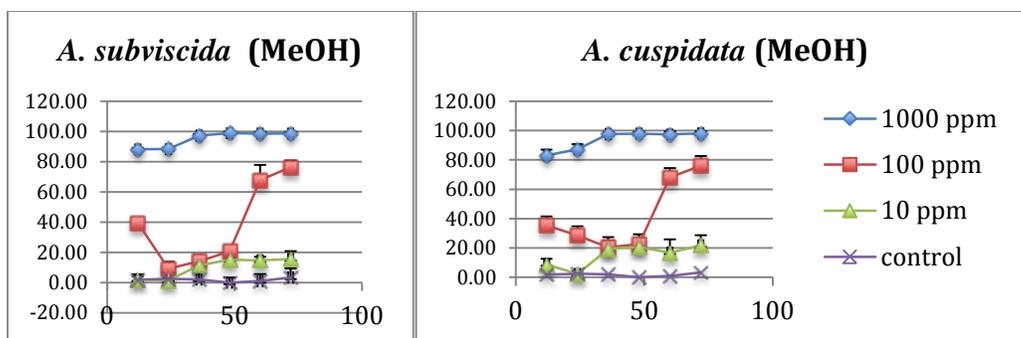


Figura 10. Comparación de comportamiento % inmovilidad en función de tiempo de *A. subviscida* vs. *A. cuspidata* en las 3 concentraciones

Los resultados a las tres concentraciones en ambas especies, tienen valores parecidos, además en tratamiento de 100 ppm, ambos presentan recuperación durante el tratamiento, como muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Comparación de los promedios de % de inmovilidad de *A. subviscida* vs. *A. cuspidata* en 1000, 100 y 10 ppm

	1000 ppm	100 ppm	10 ppm
<i>A. subviscida</i>	94.954/36h	37.907/recuperación	10.021/36h
<i>A. cuspidata</i>	93.548/36h	41.823/recuperación	14.941/36h

En el análisis de varianza de tres vías se pudo comparar el % de inmovilidad de *A. cuspidata* contra *A. subviscida* en todos los tiempos observados en las tres concentraciones. Ambos extractos no tuvieron diferencias significativas, por lo tanto la actividad biológica examinada para los extractos de estas dos plantas es igual en función de tiempo y la concentración, ver Cuadro 16.

Cuadro 16. Comparación de % de inmovilidad de *A. cuspidata* vs. *A. subviscida* en las tres concentraciones a todos los tiempos

concentración	H, $P < 0.05$, dif sig.
10 ppm	12h/ 0.557 No
	24h/ 0.056 No
	36h/ 0.271 No
	48h/ 0.860 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.716 No

100 ppm	12h/ 0.988 No
	24h/ 0.945 No
	36 h/ 0.693 No
	48h/ 0.999 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.999 No
1000 ppm	12h/ 0.940 No
	24h/ 0.999 No
	36h/ 0.999 No
	48h/ 0.999 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.999 No

La similitud del comportamientos de ambos extractos se puede deber a que están reportados análisis fitoquímico de distintas especies del género *Acalypha*, donde han evidenciado la presencia de metabolitos secundarios tipo flavonoides, taninos y alcaloides como componentes principales de sus extractos obtenidos por metanol y otros disolventes (Noumedem et al., 2013 y Anandakumar et al., 2009).

7.3.5 Comparación de actividad biológica entre extractos de partes distintas de una misma planta con el mismo disolvente

7.3.5.1 *T. glabra* (raíz y parte aérea) MeOH

Comparando los tratamientos de raíz y parte aérea de *T. glabra* que fueron extraídos con MeOH, el % de inmovilidad solo es estadísticamente diferente en la concentración de 10 ppm a partir de las 48 h, teniendo el efecto mayor relativamente el extracto de raíz, sin embargo dicha actividad biológica es igual en todos los tiempos observados para las concentraciones de 100 y 1000 ppm. Ver cuadros 17 y 18.

Cuadro 17. Comparación de los promedios de % de inmovilidad de *T. glabra* (raíz) vs. *T. glabra* (aérea) en 1000, 100 y 10 ppm

	1000 ppm	100 ppm	10 ppm
<i>T. glabra</i> (raíz)	93.070/48h	54.698/recuperación	26.557/12h
<i>T. glabra</i> (aérea)	91.876/48h	48.887/recuperación	15.500/12h

Cuadro 18. Comparación de % de inmovilidad de *T. glabra* (raíz) vs. *T. glabra* (aérea) en las tres concentraciones a todos los tiempos

Concentración	H, $P < 0.05$, dif sig
10 ppm	12h/ <0.001 Si
	24h/ 0.999 No
	36h/ 0.999 No
	48h/ <0.001 Si
	60h/ <0.001 Si
	72h/ 0.001 Si
	100 ppm
24h/ 0.999 No	
36h/ <0.001 Si	
48h/ 0.968 No	
60h/ 0.999 No	
72h/ 0.999 No	
1000 ppm	
	24h/ 0.999 No
	36h/ 0.999 No
	48h/ 0.999 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.999 No

7.3.5.2 *P. varicosa* (Raíz y bulbo) MeOH

Ambos extractos a 10 ppm tienen actividad biológica similar, sin embargo, en 100 ppm el extracto de la raíz es más activo que el del bulbo con diferencias significativas hasta las 48 horas, en 1000 ppm el extracto de raíz continúa siendo más activo hasta las 48 horas, porque después de ese tiempo el % de inmovilidad no presenta diferencias entre ambos extractos ver cuadros 19 y 20.

Cuadro 19. Comparación de los promedios de % de inmovilidad de *P. varicosa* (raíz) vs. *P. varicosa* (bulbo) en 1000, 100 y 10 ppm

	1000 ppm	100 ppm	10 ppm
<i>P. varicosa</i> (raíz)	99.008/12h	74.820/recuperación	15.833/12h
<i>P. varicosa</i> (bulbo)	90.691/36h	37.324/recuperación	17.788/36h

Cuadro 20. Comparación de % de inmovilidad de *P. varicosa* (raíz) vs. *P. varicosa* (bulbo) en las tres concentraciones a todos los tiempos

Concentración	H, $P < 0.05$, dif sig.
10 ppm	12h/ 0.999 No
	24h/ 0.999 No
	36h/ 0.999 No
	48h/ 0.932 No
	60h/ 0.973 No
	72h/ 0.397 No
100 ppm	12h/ <0.001 Si
	24h/ <0.001 Si
	36h/ <0.001 Si
	48h/ <0.001 Si
	60h/ 0.723 No
	72h/ 0.999 No
1000 ppm	12h/ <0.001 Si
	24h/ <0.001 Si
	36h/ 0.992 No
	48h/ 0.999 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.999 No

7.3.5.3 *A. aurantium* (raíz y parte aérea) MeOH

En 10 ppm ambos extractos tienen actividad biológica similar, sin embargo, a 100 ppm el extracto de la parte aérea es más activo hasta las 60 horas y en 1000 ppm solo a las 24 horas.

Cuadro 21. Comparación de % de inmovilidad de *A. aurantium* (raíz) vs. *A. aurantium* (aérea) en las tres concentraciones a todos los tiempos

Concentración	H, $P < 0.05$, dif sig.
10 ppm	12h/ 0.999 No
	24h/ 0.999 No
	36h/ 0.999 No
	48h/ 0.999 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.993 No
100 ppm	12h/ 0.001 Si
	24h/ 0.001 Si
	36h/ 0.001 Si

	48h/ 0.001 Si
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.890 No
1000 ppm	12h/ 0.636 No
	24h/ 0.001 Si
	36h/ 0.999 No
	48h/ 0.999 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.999 No

7.3.6 Comparación de efecto biológico entre dos extractos de diferente polaridad de la misma planta.

7.3.6.1 *A. aurantium*, raíz (MeOH y AcOEt)

Cuadro 22. Comparación de % de inmovilidad de *A. aurantium* (raíz) MeOH vs. *A. aurantium* (raíz) AcOEt en las tres concentraciones a todos los tiempos.

Concentración	H, $P < 0.05$, dif sig
10 ppm	12h/ 0.001 Si
	24h/ 0.023 Si
	36h/ 0.002 Si
	48h/ 0.001 Si
	60h/ 0.207 No
	72h/ 0.001 Si
100 ppm	12h/ 0.033 Si
	24h/ 0.001 Si
	36h/ 0.706 No
	48h/ 0.001 Si
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.999 No
1000 ppm	12h/ 0.999 No
	24h/ 0.001 Si
	36h/ 0.999 No
	48h/ 0.999 No
	60h/ 0.999 No
	72h/ 0.999 No

7.3.6.2 *H. terebinthinaceus* (Agua y Hexano)

El efecto biológico de estos dos extractos muestra que hay diferencias significativas entre ambos extractos, donde el efecto biológico es mayor y estadísticamente significativo en el extracto acuoso, los resultados de la prueba de Tukey se presentan en el cuadro 23.

Cuadro 23. Comparación de % de inmovilidad de *H. terebinthinaceus* (agua) vs. *H. terebinthinaceus* (Hexano) en las tres concentraciones a todos los tiempos

Concentración	H. $P < 0.05$
10 ppm	---
100 ppm	12h/ 0.999 No
	24h/ 0.014 Si
	36h/ 0.986 No
	48h/ 0.001 Si
	60h/ 0.001 Si
	72h/ 0.001 Si
1000 ppm	12h/ 0.001 Si
	24h/ 0.001 Si
	36h/ 0.001 Si
	48h/ 0.001 Si
	60h/ 0.001 Si
	72h/ 0.001 Si

7.3.7 Selección del extracto de *A. aurantium* parte aérea

El tratamiento con el extracto de parte aérea de *A. aurantium* en las tres concentraciones está entre los cinco tratamientos más activos al igual que *T. glabra* (raíz) y *P. varicosa* (raíz).

Cuadro 24. Promedios de los % de inmovilidad de los extractos más activos en las tres concentraciones

concentración	Media de % inmovilidad	Extractos
10 ppm	26.557	<i>T. glabra</i> (raíz)
	21.277	<i>A. aurantium</i> (raíz)
	20.825	<i>A. aurantium</i> (aérea)
	18.586	<i>A. integrifolium</i>
	17.788	<i>P. varicosa</i> (raíz)

100 ppm	78.631	<i>A. aurantium</i> (aérea)
	76.186	<i>L. achyranthifolia</i>
	74.862	<i>P. varicosa</i> (raíz)
	59.160	<i>A. integrifolium</i>
	54.698	<i>T. glabra</i> (raíz)
1000 ppm	99.008	<i>P. varicosa</i> (raíz)
	97.751	<i>H. terebinthinaceus</i> (agua)
	95.565	<i>L. achyranthifolia</i>
	95.370	<i>A. aurantium</i> (aérea)
	94.945	<i>G. mexicanum</i>

En el análisis de medias, se observó que uno los tratamientos más activos en las tres concentraciones es el extracto de *A. aurantium* (parte aérea).

En concentración de 10 ppm, el tratamiento con extracto de *A. aurantium* (raíz y parte aérea) y *T. glabra* (raíz), son los más activos (Cuadro 24) porque son significativamente mayores a los tratamientos restantes y blanco.

A 100 ppm el tratamiento de *A. aurantium* (parte aérea) es el más activos junto con *P. varicosa* (raíz) y *L. achyranthifolia* y es diferente significativamente y mayor al resto de los tratamientos y blanco.

Finalmente en 1000 ppm los tratamientos más activos fueron *H. terebinthinaceus* y *P. varicosa* (raíz) hasta las 24 horas ya que después de ese tiempo el extracto de la parte aérea de *A. aurantium* al igual que *L. achyranthifolia* y *G. mexicanum*, no tuvieron diferencia significativas con los tratamientos anteriormente mencionados.

Tomando en cuenta la actividad biológica del tratamiento de *A. aurantium* (parte aérea) en las tres concentraciones, con la finalidad analizar el comportamiento de este tratamiento en función del tiempo, en el ANOVA de 3 vías se comparó el % de inmovilidad del tratamiento de *A. aurantium* de la parte aérea (Aaa) contra el % de

inmovilidad de los tratamientos más activos, en todos los tiempos y los resultados se muestran en el Cuadro 25, en éste se observa que el tratamiento de *P. varicosa* (raíz) no tiene diferencias significativas en las tres concentraciones y solo es mayor y significativamente diferente al de la parte aérea de *A. aurantium* solo hasta las 24 horas con concentración de 1000 ppm.

Cuadro 25. Comparación del efecto biológico de *A. aurantium* (parte aérea) vs. Los extractos más activos de cada concentración

concentración	Comparación	Diferencias significativas $P < 0.05$						Observación
		12	24	36	48	60	72	
10 ppm	TGr vs. Aaa	Si	No	No	Si	No	No	(-)
	Aar vs. Aaa	No	No	No	No	No	No	-
	AI vs. Aaa	No	No	No	No	No	No	-
	PVr vs. Aaa	No	No	No	No	No	No	-
100 ppm	Aaa vs. LA	Si	No	No	No	No	No	(-)
	Aaa vs. PVr	No	No	No	No	No	No	-
	Aaa vs. AI	Si	Si	No	No	No	No	(+)
	Aaa vs. TGr	Si	Si	Si	Si	Si	No	(+)
1000 ppm	PVr vs. Aaa	Si	No	No	No	No	No	(-)
	Hteragua vs. Aaa	Si	No	No	No	No	No	(-)
	LA vs. Aaa	No	No	No	No	No	No	-
	Aaa vs. GM	No	No	No	No	No	No	-

% de inmovilidad con tratamiento de *A. aurantium* (Parte aérea) donde fue mayor con diferencia significativa (+) y menor con diferencia significativa (-)

Por lo tanto, los extractos más activos son *P. varicosa* (raíz) y *A. aurantium* (parte aérea) y se eligió para continuar el trabajo, el extracto de la parte aérea de *A. aurantium*, porque en un trabajo realizado por Bilma Angelina, Pasante de Biología de la UMAR, Puerto Escondido. Se aislaron tres compuestos: α -tertiofeno, estigmasterol, un hidrocarburo lineal de C50, una mezcla de dos compuestos estigmasterol- β -sitosterol 1:1 y una fracción a partir de la raíz de *A. aurantium* en AcOEt. Por consiguiente, al obtener

compuestos de la parte aérea contribuye completar el estudio químico- biológico de esta especie.

7.4 Actividad nematocida de las particiones de acetona y metanol del extracto metanólico de la parte aérea de *A. aurantium*.

Por ANDEVA de tres vías y prueba de Tukey se comparó el % de inmovilidad de ambas fracciones a dos concentraciones (10 y 50 ppm) en todos los tiempos, dicho análisis mostró que la partición metanólica del extracto de *A. aurantium* (aérea) es más activo y cuando la concentración aumenta, reacciona en menor tiempo.

Cuadro 26. Porcentaje de inmovilidad de las particiones a 10 ppm (12-72h)

10ppm	12h	de	24h	de	36h	de	48h	de	60h	de	72h	de
AAact	9.17	2.55	9.17	2.55	9.86	3.88	21.81	2.27	21.81	2.27	100.00	0.00
AAmet	36.00	3.54	100.00	0.00								

Cuadro 27. Porcentaje de inmovilidad de las particiones 50 ppm (12-72h)

50 ppm	12h	de	24h	de	36h	de	48h	de	60h	de	72h	de
AAact	10.04	2.33	23.09	2.47	23.09	2.33	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
AAmet	10.00	3.54	100.00	0.00								

La comparación de actividad biológica entre la partición en acetona (AAact) con la de metanol (AAmet), indica que AAact es menos activa y significativamente diferente hasta las 60 y 36 h a AAmet.

Cuadro 28. Comparación de % de inmovilidad de las particiones AAact y AAmet en las dos concentraciones a todos los tiempos

Concentración	H, $P < 0.05$, dif sig
10 ppm	12h/ 0.001 Si
	24h/ 0.001 Si
	36h/ 0.001 Si
	48h/ 0.001 Si
	60h/ 0.001 Si
	72h/ 0.999 No
50 ppm	12h/ 0.001 Si
	24h/ 0.001 Si
	36h/ 0.001 Si

48h/ 0.999 No

60h/ 0.999 No

72h/ 0.999 No

Después del tratamiento con 50 ppm, todos los organismos fueron lavados con agua destilada y se recolectaron con tamices 100 y 400; finalmente fueron sumergidos en las microplacas con agua destilada e incubados a 24°C, para observar recuperación. En ningún tratamiento hubo recuperación de los organismos observados en 12 y 72 horas. Por lo tanto, en la partición en metanol del extracto de *A. aurantium*, posiblemente existen metabolitos secundarios con actividad nematocida contra J2 de *N. aberrans*. Por lo tanto se procedió a extraer compuestos de ambas particiones y de la fracción acetónica se obtuvo una mezcla cuyo componente principal (70%) es estigmasterol y de la fracción metanólica solo se pudieron aislar 2 fracciones por HPLC AAmet-f4 y AA met-f9. Estos productos fueron evaluados junto con los compuestos aislados de la raíz.

7.5 Actividad nematocida de compuestos y fracciones obtenidos del extracto metanólico de la parte aérea y extracto de acetato de etilo de la raíz de *A. aurantium*

7.5.1 Compuestos y fracciones a 50 ppm

Cuadro 29. Porcentaje de inmovilidad de todos los compuestos y fracciones a 50 ppm (12-72h)

CONC. 50 PPM	12h	de	24h	de	36h	de	48h	de	60h	de	72h	de
1 Estigmasterol ≈70%	60.66	6.68	75.96	4.87	80.10	8.83	79.28	8.35	80.51	5.50	82.65	6.21
2 AAmet-f4	35.13	6.59	66.13	13.11	84.17	2.95	81.51	4.03	83.96	4.79	84.71	5.38
3 AAmet-f9	57.23	2.72	76.05	2.08	82.56	3.04	83.00	3.20	85.59	3.53	87.02	4.47
4 Hidrocarburo C ₅₀	59.04	6.64	61.56	11.42	76.40	5.24	82.17	3.46	84.84	3.16	86.00	2.69
5 Fracción 33 b	69.60	3.60	77.24	1.90	81.03	3.34	85.00	6.99	87.56	3.99	87.65	3.20
6 α-tertiofeno	76.05	2.09	75.32	3.95	82.37	2.06	86.26	1.99	91.38	3.42	89.58	3.65
7 Estigm./β-sitosterol	66.85	5.17	79.47	7.92	82.19	3.66	84.45	2.38	89.17	1.14	91.24	1.20
8 Estigmasterol	71.51	14.14	81.89	2.19	94.30	6.38	98.50	1.73	99.30	1.09	98.97	1.80

7.5.2 Compuestos y fracciones a 100 ppm

Cuadro 30. Porcentaje de inmovilidad de todos compuestos y fracciones a 100 ppm (12-72h)

CONC. 100 PPM	12h	de	24h	de	36h	de	48h	de	60h	de	72h	de
---------------	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----	-----	----

1	Estigmasterol \approx 70%	77.26	4.36	81.09	3.05	85.38	3.63	82.32	3.53	89.36	1.79	87.94	2.56
2	AAmet-f4	44.79	4.00	71.20	5.58	85.51	3.65	87.30	4.58	91.43	0.89	90.83	2.05
3	AAmet-f9	63.22	6.15	78.42	6.94	83.83	1.96	88.83	5.17	89.25	1.06	92.83	2.12
4	Hidrocarburo C ₅₀	72.85	4.20	79.34	4.76	80.62	4.83	90.32	1.78	88.19	1.49	90.36	1.53
5	Fracción 33 b	74.39	4.47	82.80	4.13	86.58	3.86	94.24	2.70	91.29	4.25	92.49	2.06
6	α -tertiofeno	80.38	2.94	83.16	5.16	85.94	5.13	89.52	4.97	90.35	2.85	93.27	3.13
7	Estigm./ β -sitosterol	76.71	10.36	88.31	3.75	87.04	4.84	88.86	2.57	90.33	1.27	94.62	1.25
8	Estigmasterol	92.02	1.13	95.86	3.82	99.42	0.55	99.78	0.50	100.0	0.00	100.0	0.00

Cuadro 31. Promedios de % de inmovilidad de los compuestos a 100 y 50 ppm

Compuesto o fracción	Media 100 ppm	Media 50ppm
Estigmasterol 70%	83.890	76.527
AAmet-f4	78.510	72.601
AAmet-f9	82.731	78.575
Hidrocarburo C ₅₀	83.615	75.001
Fracción 33b	86.966	81.348
α -Tertiofeno	87.104	83.493*
Estigmasterol/ β -Sitosterol1:1	87.644	82.228*
Estigmasterol	97.846	90.744*

7.5.3 Actividad de los tratamientos con los esteroides estigmasterol y β -sitosterol

Por el análisis de ANDEVA y la prueba pos hoc de Tukey se observó que el tratamiento con estigmasterol a 100 ppm tiene el efecto biológico mayor y significativamente diferente a todos los compuestos, incluso las mezclas que lo contienen (estigmasterol \approx 70% y estigmasterol/ β -sitosterol 1:1). Además, este tratamiento a 50 ppm no presenta diferencias significativas ($P < 0.001$) con el de 100 ppm después de las 36 h de exposición, es decir, a este tiempo ambas concentraciones tienen efectos biológicos similares

La mezcla estigmasterol/ β -sitosterol 1:1 no tiene diferencia significativa en ambas concentraciones a partir de las 36 h, al igual que el tratamiento de estigmasterol. Sin embargo, la actividad biológica de la mezcla es menor y significativamente diferente al tratamiento de estigmasterol en ambas concentraciones, y en el caso del tratamiento con

estigmasterol \approx 70%, se esperaba que tuviera mayor efecto al de la mezcla estigmasterol/ β -sitosterol, porque tiene mayor cantidad de compuesto activo (70% vs. 50%). Sin embargo, las dos concentraciones del tratamiento a las 24 horas tienen efectos similares por que no presentan diferencias significativas y comparado con el efecto biológico de la mezcla en las 2 concentraciones, no presentan diferencias significativas. Se puede suponer que este comportamiento se debe a: a) las impurezas del tratamiento \approx 70% antagonizan el efecto del activo por no presentar diferencias significativas al tratamiento con menor cantidad de activo, b) si se descarta la posibilidad de mecanismos antagonistas en el tratamiento \approx 70%, el β -sitosterol pudiera favorecer un mecanismo sinérgico, por lo cual un tratamiento con menor cantidad de activo puede tener efecto biológico similar al de mayor cantidad, o c) si se descartan las anteriores, debido a que no presentan diferencias significativas los tratamientos estigmasterol \approx 70% y mezcla estigmasterol/ β -sitosterol 1:1, pero tienen menor efecto biológico estadísticamente significativo al tratamiento de mayor cantidad de activo, estas concentraciones pueden ser el umbral de una dosis mínima efectiva.

Por otra parte, comparando la actividad biológica del tratamiento con estigmasterol \approx 70% contra AAact (partición de acetona) de donde fue obtenido, se observó que existen diferencias significativas hasta las 60h y el compuesto tiene mayor promedio de % de inmovilidad que la partición de donde deriva.

Cuadro 32. Promedios de % de inmovilidad del estigmasterol y partición AAact

Partición y Compuesto (50 ppm)	Promedio del % de inmovilidad
AAact	59.368
Estigmasterol	76.527

Por lo tanto el estigmasterol puede ser uno de los metabolitos secundarios que contribuye a la toxicidad de esta partición (AAact) contra los juveniles del segundo estadio (J2) de *N. aberrans*.

No se han publicado trabajos donde se evalúe el % de inmovilidad del estigmasterol en J2 de *N. aberrans* o de otro nematodo agallador; una evidencia de la posible actividad

nematicida de estigmasterol, es el estudio de Barbosa y colaboradores (1999), que observaron que una mezcla de estigmasterol/ β -sitosterol a 5 ppm, provocó 74.4% de inmovilidad en J2 de *M. incognita* en 48 h a 26°C, en el presente trabajo se utilizaron concentraciones diez y veinte veces mayores en J2 de *N. aberrans* para obtener 84.45 y 88.86 % de inmovilidad en 48h a 25°C.

En las plantas el estigmasterol deriva del β -sitosterol y se deposita en las membranas celulares y se cree que su biosíntesis está relacionada con el estrés biológico (Griebel y Zeier, 2010) pero en estudios en campo, las altas concentraciones de estigmasterol dentro de la planta del tomate disminuye su resistencia frente a *M. incognita* y otros nematodos agalladores (Arias et al., 2009), no existen estudios del efecto *in vitro* del estigmasterol en J2 de nematodos agalladores. Por lo tanto, los resultados encontrados para J2 de *N. aberrans* contribuyen al conocimiento de la actividad biológica de este compuesto.

7.5.4 Actividad nematicida de los tratamientos con α -tertiofeno

El α -tertiofeno fue uno de los compuestos más activos como nematicidas junto con aquellas mezclas que contienen estigmasterol. El porcentaje de inmovilidad de J2 causado por el α -tertiofeno no tuvo diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos de 100 y 50 ppm, sin embargo, su actividad biológica es parecida a la observada con las mezclas, pero no mayor o igual de estigmasterol. De este tiofeno se ha reportado que tiene importante actividad como insecticida y nematicida, aunque no en J2 de *N. aberrans*. Se ha descrito que su toxicidad aumenta en presencia de luz UV (Bakker et al., 1979 y Nivsarkar et al., 2001), así el efecto tóxico del α -tertiofeno en los organismos, es debido a la formación de oxígeno singulete, que es un estado electrónicamente excitado del oxígeno y lo vuelve altamente oxidante, éste reacciona con enzimas a través de los aminoácidos; histidina, triptófano y metionina, generando inhibición enzimática (Chen et al., 2004). Para obtener el estado singulete del oxígeno se requiere de “fotosensibilizadores” (FS), moléculas que pueden capturar la luz y excitar a otra, los sistemas aromáticos, pueden ser FS (DeRosa y Crutchley, 2002). El α -tertiofeno es un FS debido a que es un compuesto policíclico aromático, que puede absorber la luz UV en el

intervalo de 325-400 nm, soportar la densidad electrónica y ceder esa energía para excitar al oxígeno (Bakker et al., 1979).

El α -tertiofeno tiene efecto tóxico contra otros organismos plaga como *Manduca sexta* (gusano del tabaco), *Musca domestica* (mosca) y *Tribolium castaneum* (insecto plaga de cereales) (Nivsakar et al., 2001 y Bakker et al., 1979) y en el presente trabajo se demuestra también tal efecto en J2 de *N. aberrans*, algunos autores lo consideran un compuesto de interés para el estudio de nuevos nematocidas, debido a que el α -tertiofeno también se presume tiene potencial como herbicida, ya que logra inhibir el crecimiento hasta del 50% de las malezas *Amaranthus retroflexus* y *Chenopodium album*, sin dañar a cultivos de importancia comercial como el maíz (*Zea mays*) (Lambert et al., 1991). Sin embargo, es necesario investigar el efecto fitotóxico de este compuesto en chile, tomate y frijol, que son los hospederos de *N. aberrans* y estudiar su forma de aplicación ya que debido a su “fotoactivación” se ha demostrado que puede causar daños en la piel (Rampone et al., 1986).

7.5.5 Actividad nematocida de los tratamientos con los compuestos y fracciones restantes

Todos los tratamientos con las fracciones y el hidrocarburo lineal C50 no tuvieron diferencias significativas entre ellos, en las dos concentraciones, y fueron similares a los resultados de los tratamientos más activos a las 24 h en concentración de 100 ppm y de 36 h en 50 ppm. Por otro lado, en los resultados de las fracciones obtenidas de AAmet, los cuales fueron analizados por ANDEVA se determinó que disminuyó la actividad biológica de forma significativa con respecto a la partición de la que fueron obtenidas (AAmet) (Cuadro 33).

Cuadro 33. Promedios de % de inmovilidad de fracciones AAmet-f4, AAmet-f9 y partición AAmet.

Partición y fracciones a 50 ppm	Promedio de % de inmovilidad
AAmet	89.33
AAmet-f4	72.601
AAmet-f9	78.575

Al comparar el efecto biológico de las fracciones AAmet-f4 y AAmet-f9 contra la partición de la que derivan AAmet (Cuadro 33), se observó que entre las fracciones no hay diferencia significativa del efecto, sin embargo su % de inmovilidad es menor al de la partición, la cual es mayor que el extracto del que deriva: 89.33 a 10 ppm de AAmet Vs. 20.825 a 10 ppm de *A. aurantium* (aérea). Por lo tanto la partición AAmet contiene uno o más metabolitos secundarios que tienen importante actividad nematicida y quizás los contenidos en las fracciones f4 y f9 contribuyan de forma minoritaria.

7.6 Separación del extracto metanólico de la parte aérea de *A. aurantium*.

7.6.1 Rendimiento de la extracción de *A. aurantium*.

Se obtuvieron 40.35 g de extracto crudo de 600 g de material seco, equivalente al 6.72% en peso seco y fue denominado AAC, soluble en metanol y parcialmente soluble en acetona.

7.6.2 Separación

El extracto AAC fue parcialmente soluble en acetona, se realizó una partición del extracto crudo utilizando este disolvente, lo que generó dos fases; la parte soluble en acetona que se caracterizó por tener color verde, tal partición fue denominada “AAact” y fue separada de la parte no soluble por decantación y recuperada por lavados con acetona obteniéndose 28.863 g de AAact (4.81 % de rendimiento).

La fase insoluble en acetona fue disuelta en metanol y se denominó “AAmet”, la cual se caracterizó por ser café oscuro y tener olor dulce. Se evaporó el disolvente de la partición metanólica y se recuperaron 11.356 g, equivalente al 1.89% de rendimiento

Con la finalidad de explorar el extracto AAC, se pesaron 1.032 g y se realizó una cromatografía en columna con sílica gel, se observó que en fase normal utilizando hexano como fase móvil, el extracto no se puede separar, a diferencia de cuando se aumenta la polaridad con acetato de etilo (Hex-AcOEt 1:1) con lo que ya se aprecia fraccionamiento del extracto, tal fenómeno continuó al aumentar la polaridad hasta utilizar MeOH.

Se observaron fracciones o compuestos diferentes a clorofilas. Por otra parte, se pesaron 50 mg de extracto AAC y se utilizaron para la prueba biológica en concentraciones de 10 y 50 ppm, mostró aceptable actividad nematocida (Ver sección 7.6 y 7.7)

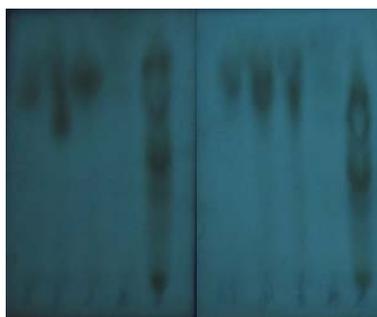
Extracción con acetona

Del extracto de AAact mediante cromatografía en columna en fase normal se obtuvieron 40 mg de una fracción rosa y olor dulce, que fue separada por la fase móvil Hexano-AcOEt 2:1, esta fracción mostró una mancha en el cromatofolio de sílica, sin embargo, al ser revelada con sulfato cérico amoniacal, se pudo observar que había un compuesto mayoritario, el cual fue fraccionado por cromatografía en columna en fase normal con hexano, se obtuvieron 30 mg de un compuesto blanco que puede cristalizarse con diclorometano o acetona, con punto de fusión de 142 °C y cuyo análisis en RMN de ^1H y ^{13}C permite proponer la estructura del estigmasterol ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$) con una pureza aproximada del 70%.

Extracción con metanol

El extracto AA1Met, se fraccionó a partir 1.0560 g de muestra en columna (3 x 50 cm) empacada con C_{18} , obteniéndose la fracción A con el sistema metanol-agua 1:1 y la fracción B con el sistema metanol-agua 3:1. Por cuestiones de la cantidad de fase estacionaria, esta cromatografía se repitió 10 veces en la misma columna, haciendo lavados con metanol, obteniéndose así 850 mg de fracción B y se denominó AA1Met-B, de aspecto sólido, café-blanquecino y altamente soluble en agua (Figura 11).

Fracción A



Fracción B



Figura 11. Cromatoplasmas de AAmet-B

El perfil cromatográfico de AA1Met- B en placa, mostró 3 manchas al ser reveladas con sulfato cérico amoniacal, yodo y luz UV (onda corta y larga), sin embargo, para confirmar la presencia de sólo tres puntos se realizó una cromatografía bidimensional (Cieśła y Waksmundzka-Hajnos 2009) en capa fina de C₁₈; se observó que el sistema inicial que mostró tres manchas, contra un sistema de mayor polaridad, resolvió 4 manchas (izquierda), sin embargo, las manchas centrales parecían sobrepuestas con otras. Este efecto se observó sólo bajo luz UV y al revelar con yodo, por lo que se realizó una segunda cromatografía bidimensional, enfrentando el sistema que separó 3 manchas contra un sistema de menor polaridad, que provocaría una migración lenta de la fracción, por lo que se hizo pasar tal sistema mayor número de veces (derecha) y se observó que de las manchas centrales se separaron otras, sumando 8 en el perfil cromatográfico de AA1Met-B (Figura 12).

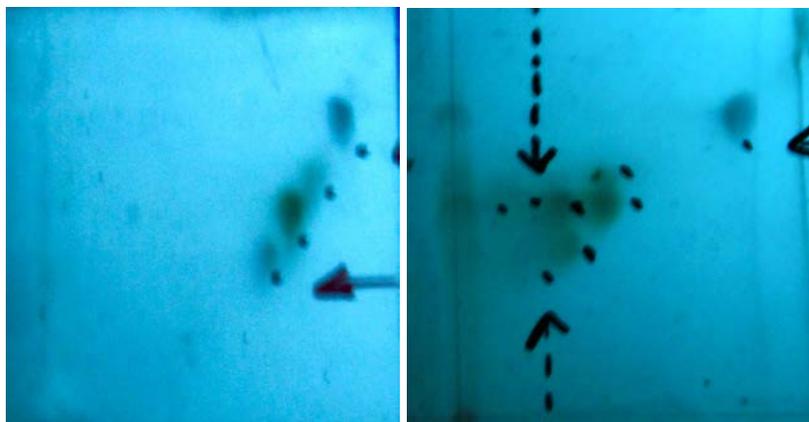


Figura 12. Cromatografía bidimensional de AAmet-B

Posteriormente la fracción fue separada por cromatografía líquida de alta resolución,(CLAR) probando la fase móvil desde MeOH puro hasta 45%.

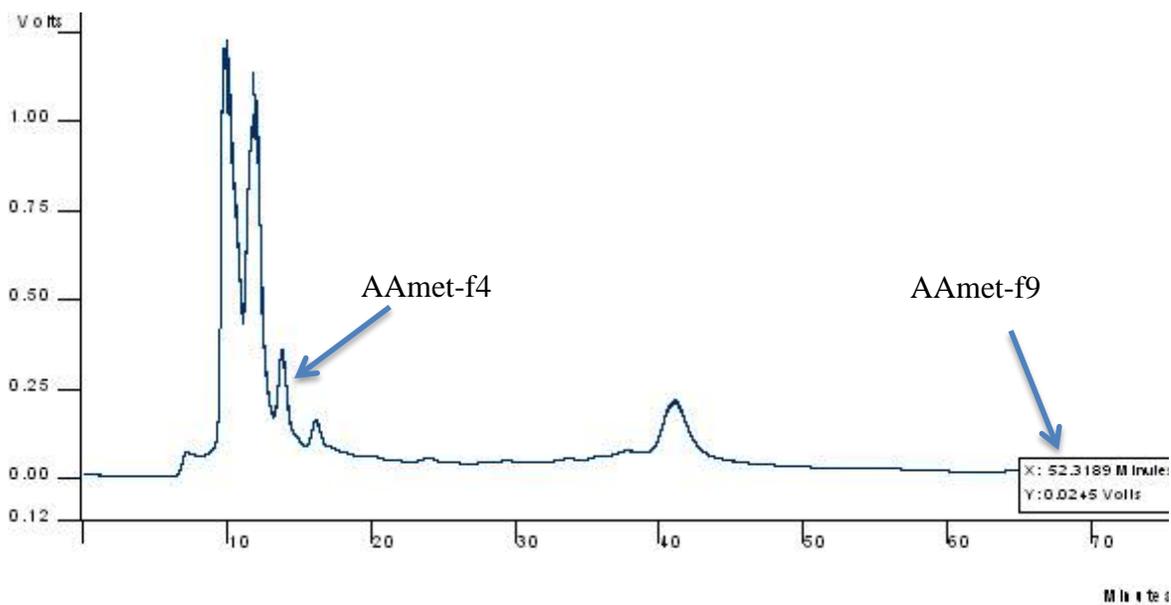


Figura 13. Perfil cromatográfico de AAmet por CLAR

Finalmente la proporción 45% Metanol 55% agua se utilizó para hacer CLAR en columna preparativa, se emplearon 350 mg de AAmet-B y se obtuvieron, las fracciones 4 (30 mg) Tr= 12.35 min. y 9 (10 mg) Tr= 69.50 min. (Figura 13).

7.7 Elucidación estructural AAact-c4 (estigmasterol)

Con base a los desplazamientos de ^1H y ^{13}C , se propone la estructura del estigmasterol $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ (Figura 14)

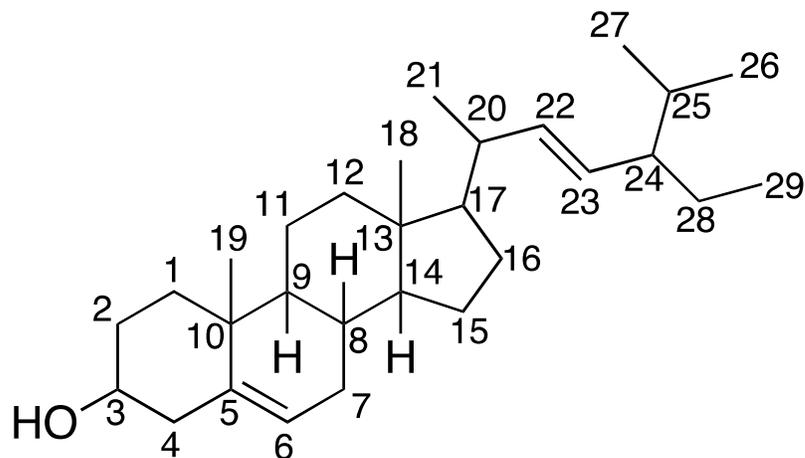


Figura 14. Estructura química del estigmasterol

Los desplazamientos químicos obtenidos en 500 MHz y cloroformo deuterado (CCl_3D) con TMS (tetrametil silano $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$) como referencia, ($\text{TMS}=0.00$), se muestran a continuación.

Cuadro 34. Desplazamientos de RMN ^1H y ^{13}C de estigmasterol

Posición	^1H (δ_{H})	^{13}C (δ_{C})	Refer. ^1H	Ref ^{13}C
1	1.835 (β) 1.09 (α)	37.260	1.84 (β) m, 1.08(a) H_1	37.6
2	1.521(β)	31.662	1.83 (α) m, 1.51 (β) H_1	31.9
3	3.524(α)	71.821	3.51 (α) m H_1	72.0
4	2.284 2.285	42.299	2.30 (α), 2.23 (β) H_1	42.5
5	-----	140.740	-----	140.8
6	5.350	121.707	5.34 m, H_1	121.8
7	1.979 (β)	31.662	1.97 (β) m, 1.50 (a) m H_1	32.1
8	1.521	31.916	1.46 (β) m H_1	32.2
9	0.929	50.170	0.94 (α) m H_1	50.5
10	-----	36.520	-----	36.5, 40.6

11		21.214	1.50 (α , β) m H ₂	21.2
12	1.998	39.689	2.00 (β), 1.18 (a) m H ₁	40.0
13	-----	42.224	-----	42.2,42.6
14	ni	56.872	1.01 (α) m H ₁	56.8, 57.1
15	ni	24.366	1.56 (α), 1.06 (b) m H ₁	24.4, 24.5
16	1.699 (a) 1.258 (b)	28.912	1.72 (α), 1,28 (b) m H ₁	28.9, 29.3
17	ni	56.068	1.15 (α) m H ₁	56.3
18	0.681 H ₃ 0.699 H ₃	12.051	0.70 (β) s H ₃	12.2
19	1.011 H ₃	19.397	1.01 (β) s H ₃	18.9, 19.5
20	2.004	40.480	2.06 m H ₁	40.4, 40.6
21	1.254 H ₃	21.214	1.03 d H ₃	21.4
22	5.042 H ₁	138.296	5.17 dd H ₁	138.3
23	5.147 H ₁	129.278	5.04 dd H ₁	129.7
24	1.532	51.239	1.54 m H ₁	51.5
25	ni	29.697	1.55 m H ₁	29.6 -32.2
26	0.916	21.214	0.83 d H ₃	21.2
27	0.806	19.039	0.80 d H ₃	19.2
28	1.254	25.401	1.43, 1.18 m H ₁	25.4, 25.8
29	0.803	12.241	0.81 t H ₃	12.1, 12.2

(Forgo y Kövér, 2004; Chaturvedula y Prakash, 2012; Koay et al., 2013)

7.7.1 Desplazamientos de ¹H

NMR ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 3.524 (1H, multiplete, H-3), 5.350 (1H, multiplete, H-6), 5.042 (1H, doble de doble $J = 15.2, 8.6$ Hz, H-22) 5.147 (1H, doble de dobles, $J = 15.2, 8.6$ Hz, H-23), 3.524, (1H, multiplete, H-3), según Koay y colaboradores (2013), H-4 (1H) se acopla a los hidrógenos vecinos y genera una señal con multiplicidad en 2.31 ppm, posiblemente corresponda al 2.84 reportado en el cuadro 34. Los hidrógenos del carbono 21 son química y magnéticamente equivalentes y dan una señal simple a 1.254

ppm al igual que los H-19 pero entre ellos no, por eso su desplazamiento es a 1.011, los 3H de H-26 están acoplados con H-25y dan un doblete en 0.916 con $J = 5.8$ Hz, 0.83, H-29 da un triplete a 0.803 ppm por acoplamiento de 2H de H-28 y 0.70 los 3H de H-18 por ser química y magnéticamente equivalentes dan una señal simple a 0.681 ppm

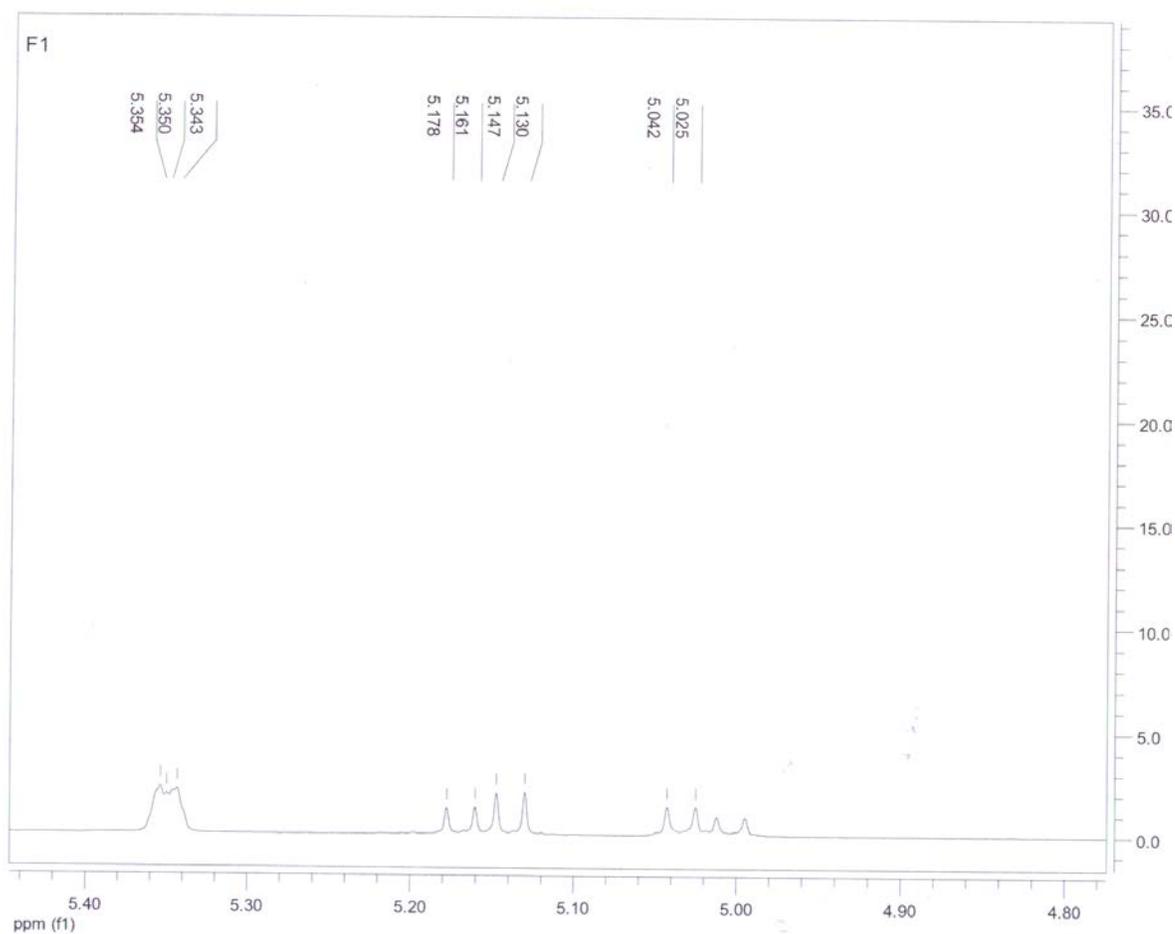


Figura 15. Sección del espectro de RMN ^1H de estigmasterol

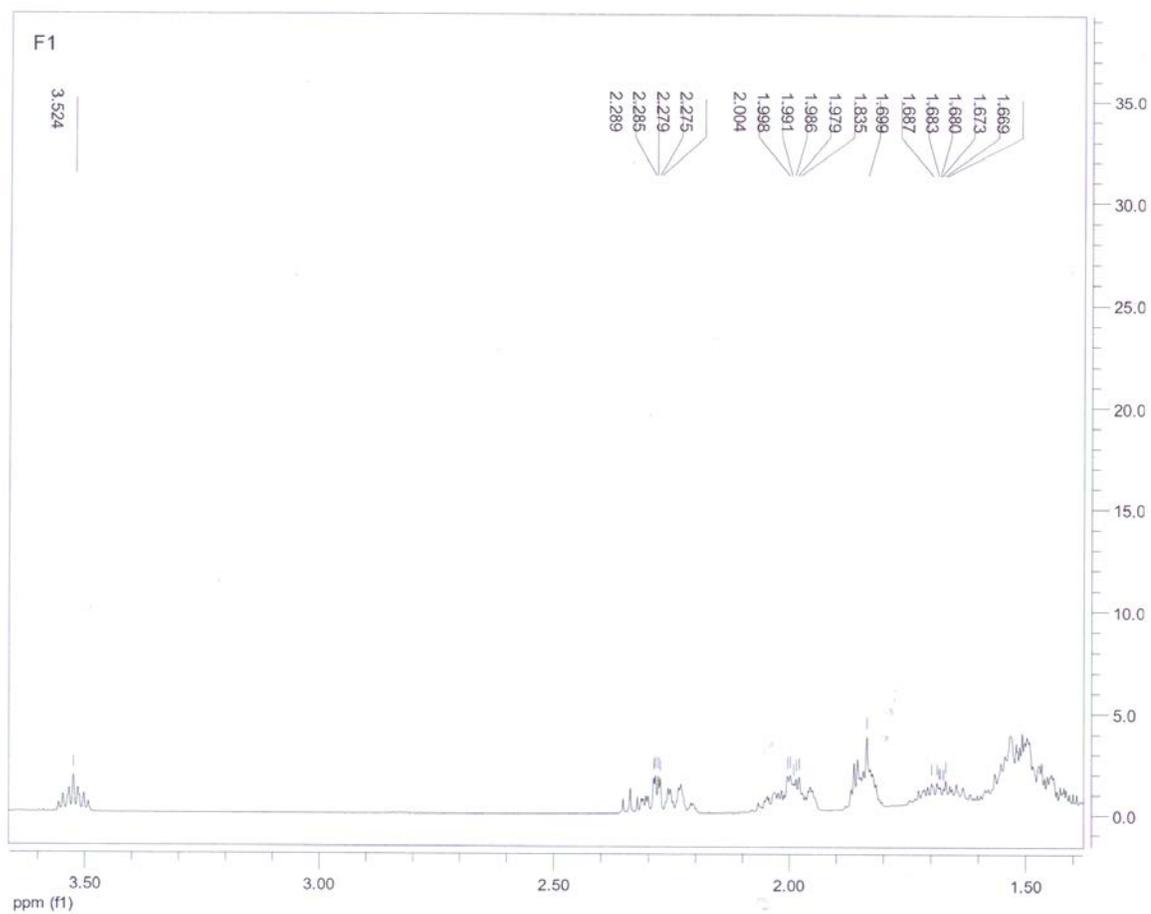


Figura 16. Sección del espectro de RMN ^1H de estigmasterol

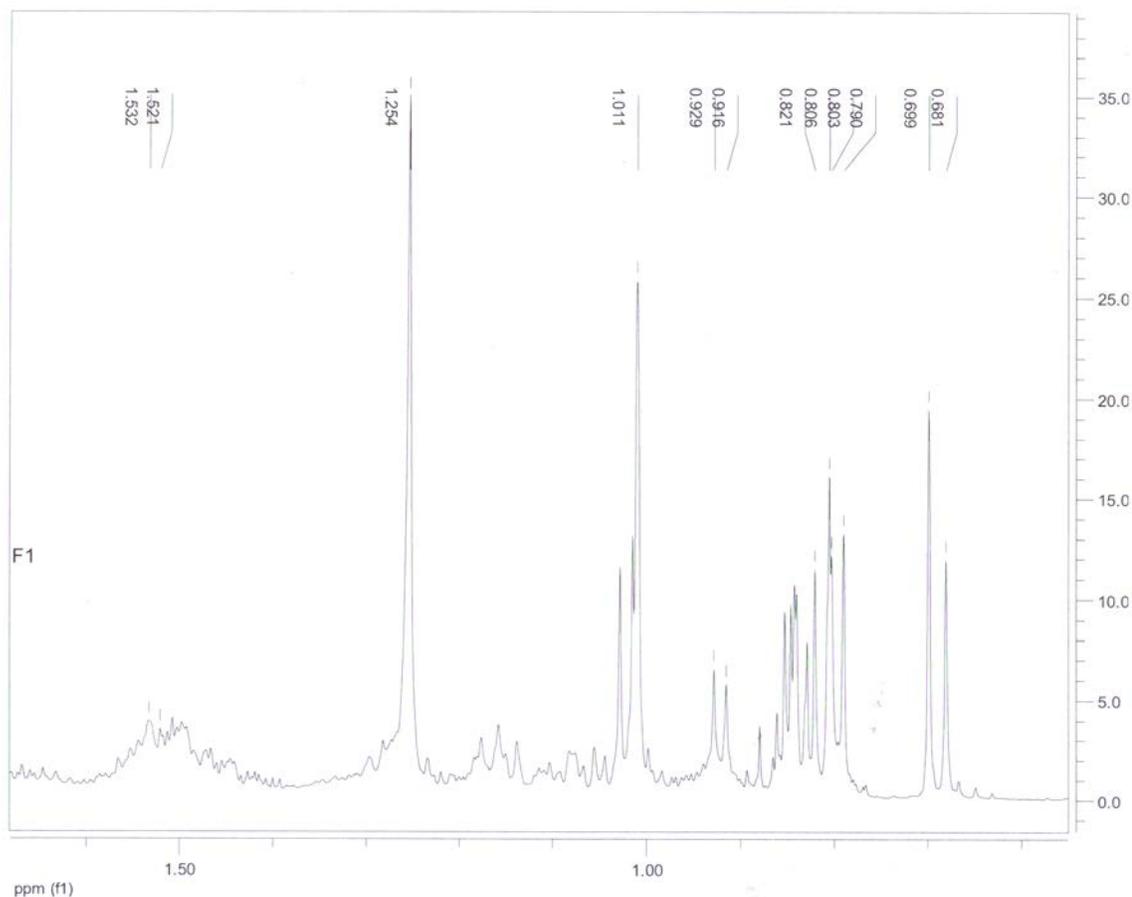


Figura 17. Sección del espectro de RMN ^1H de estigmasterol

7.7.2 Desplazamientos de ^{13}C

NMR ^{13}C (500 MHz, CDCl_3): la estructura del estigmasterol $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ tiene 27 átomos de carbonos química y magnéticamente diferentes y dos químicamente equivalentes (C-26 y C-27). Cuatro carbonos tienen hibridación sp^2 (C-5, C-6, C-22 y C-23) y el resto son carbonos sp^3 . Después de la señal del disolvente hacia el campo bajo se observan cuatro señales con desplazamientos entre 100-150 ppm, que pueden corresponder a los carbonos 5, 6, 22 y 23 ya que en ésta región de espectro absorben los carbonos con doble enlace y carbonos de sistemas aromáticos, sin embargo en la estructura propuesta no hay presencia de aromáticos; por otra parte el resto de los carbonos absorben entre 10 -60 ppm, que corresponde a la región de absorción de los carbonos con enlace sencillo. En la figura 18 se propone la asignación de grupos de carbonos según el tipo enlace presente en la molécula de estigmasterol.

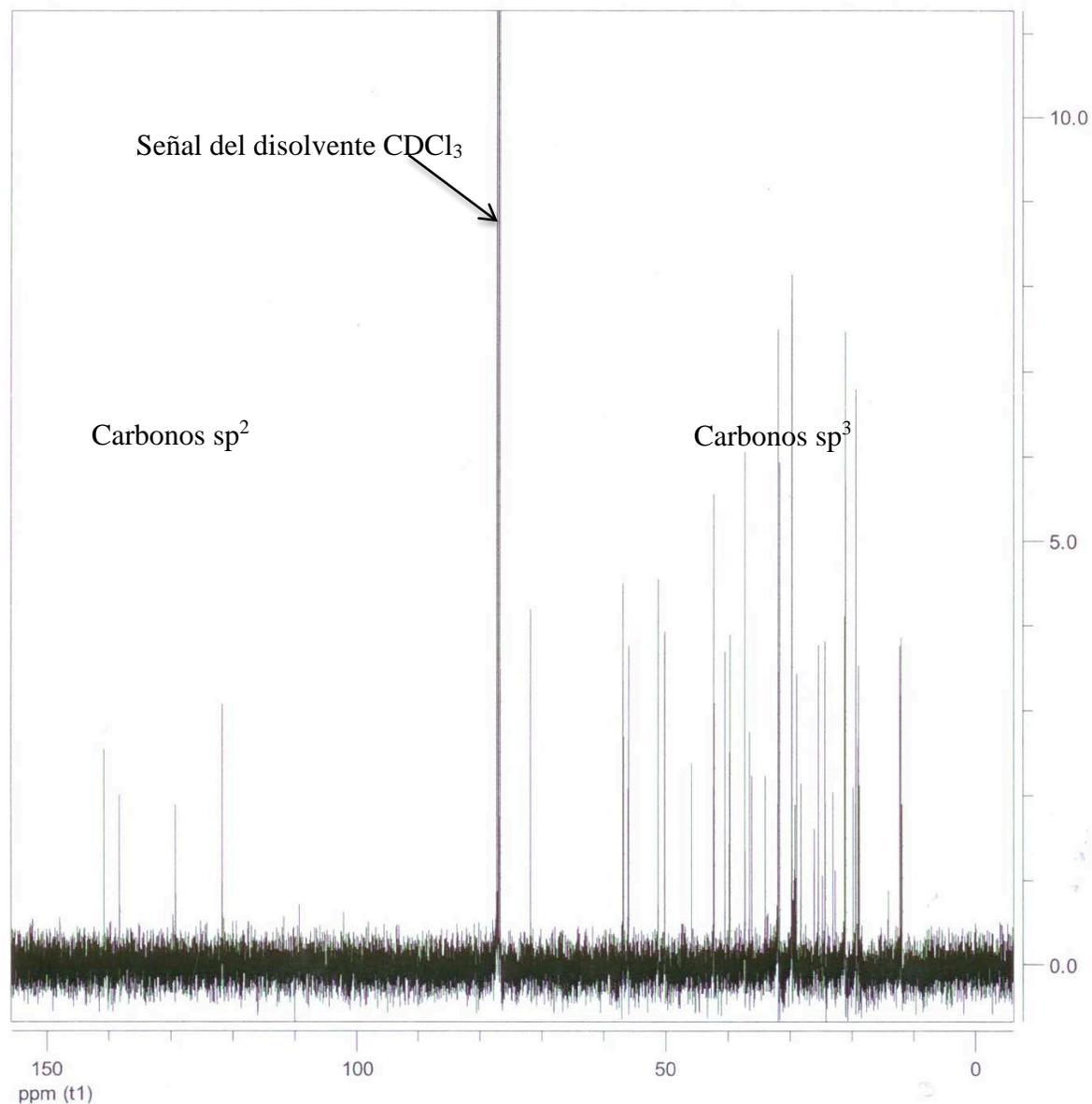


Figura 18. Espectro RMN de ^{13}C de estigmasterol 150- 0 ppm

Las señales con desplazamientos en campo bajo δC (ppm): 140.740 (C-5), 138.296 (C-22), 129.278 (C-23), 122.707 (C-6) son debido a la mayor electronegatividad relativa, que tienen los carbonos sp^2 con respecto a los sp^3 (Figura 19). Esta electronegatividad relativa es debido a que un orbital híbrido sp^2 tiene mayor carácter “s” que un orbital híbrido sp^3 , a mayor carácter “s” es mayor la electronegatividad.

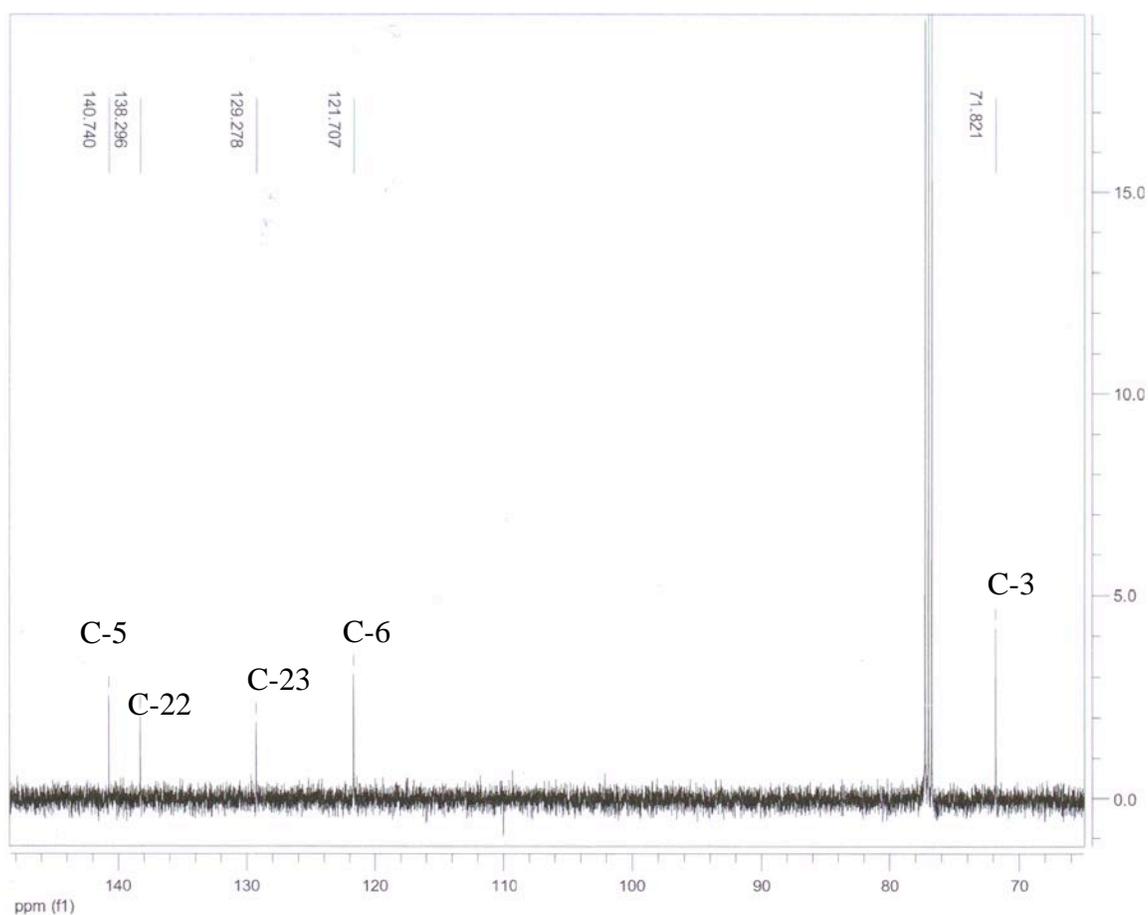


Figura 19. Sección de espectro RMN de ^{13}C de estigmasterol 150-65 ppm

En la figura 19 se muestra una sección del espectro de RMN ^{13}C , donde se propone la asignación de una parte de los carbonos de la molécula de estigmasterol en función de las siguientes observaciones: la señal del C-5 es la que se desplaza a campo más bajo por su proximidad al átomo de oxígeno que es más electronegativo, sin embargo la señal correspondiente al C-6 no se encuentra cercana a la de C5 por el efecto anisotrópico y de protección al estar dentro de una estructura cíclica; el C22 es relativamente más cercano al átomo de oxígeno que C-23, también tiene efecto anisotrópico y se desplaza a campo relativamente alto a C-22, pero éste no está influenciado por la protección de una

estructura cíclica, lo que lo hace ser desplazado a campo bajo en relación a la señal de C-6. En cambio la señal de C-3, carbono con hibridación sp^3 , está desplazado a campo relativamente más bajo que el de los demás carbonos sp^3 , por que se encuentra enlazado directamente al grupo hidroxilo (-OH).

Después de la señal de disolvente, los δ_C (ppm) 56.872 (C-14), 56.068 (C-17), 51.239 (C-24), 50.170 (C-9), 42.299 (C-4), 42.224 (C-13), 40.480 (C-20), 39.689 (C-12), 37.262 (C-1), 36.520 (C-10), fueron comparables con los reportados por Koay y colaboradores (2013), ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ_C : 57.2 (C-14), 56.3 (C-17), 51.6 (C-24), 50.5 (C-9), 42.7 (C-4), 42.6 (C-13), 41.0 (C-20), 40.0 (C-12), 37.6 (C-1), 36.6 (C-10) (figura 20).

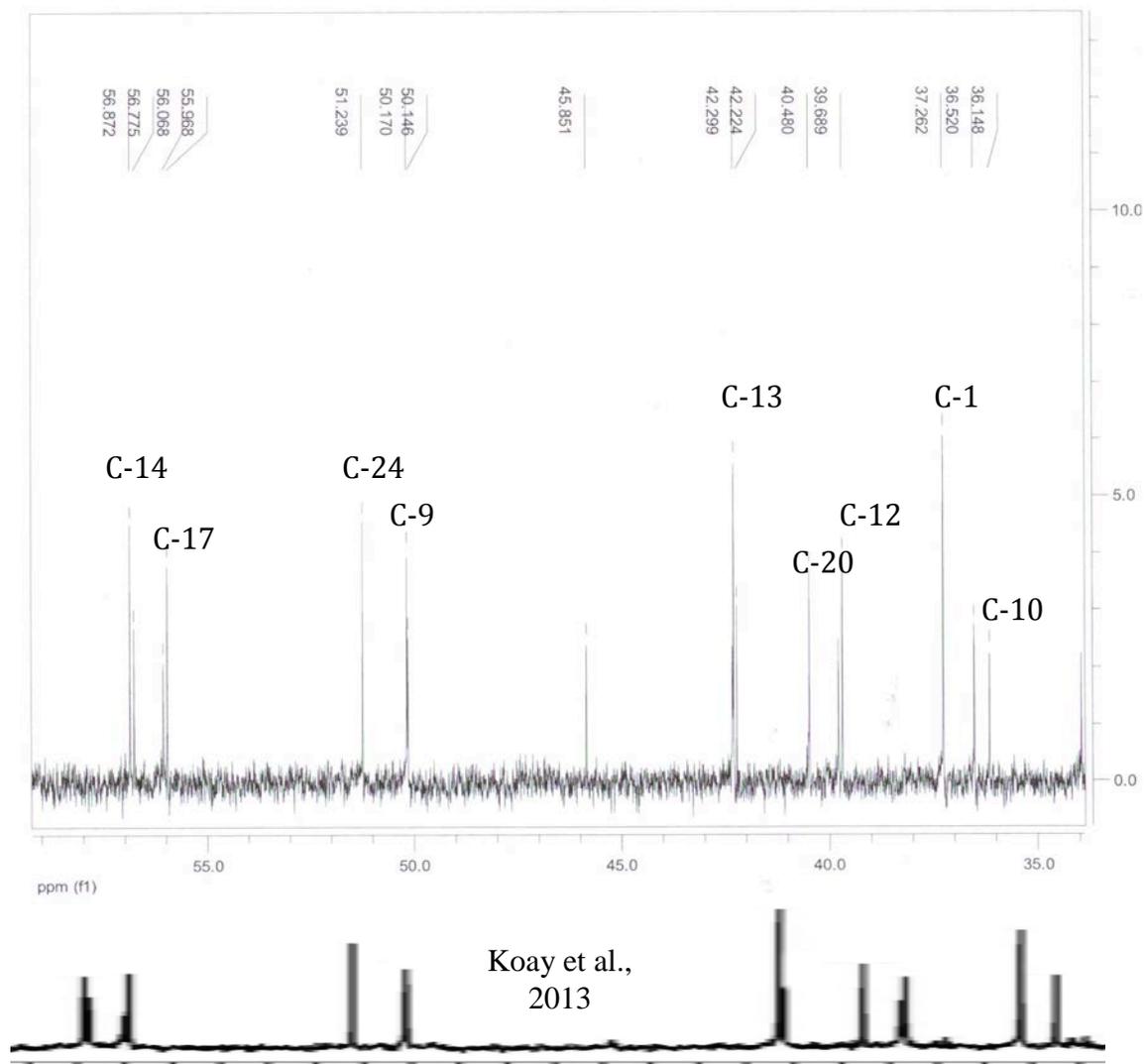


Figura 20. Sección del espectro de RMN ^{13}C de estigmasterol 65-35 ppm y comparación con Koay et al., 2013

Los desplazamientos ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3) para los carbonos 2, 7, 8, 11, 15, 16, 19, 21 y 25-28 del cuadro 34 son comparables con los reportados por Koay y colaboradores (2013), ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 32.3 (C-8, C-25), 32.0 (C-2, C-7), 28.7 (C-16), 25.8 (C-28), 24.7 (C-15), 21.5 (C-11) 21.078 (C-21, C-26), 19.4 (C-19), 19.2 (C-27) y su posible asignación se propone en figura 21.

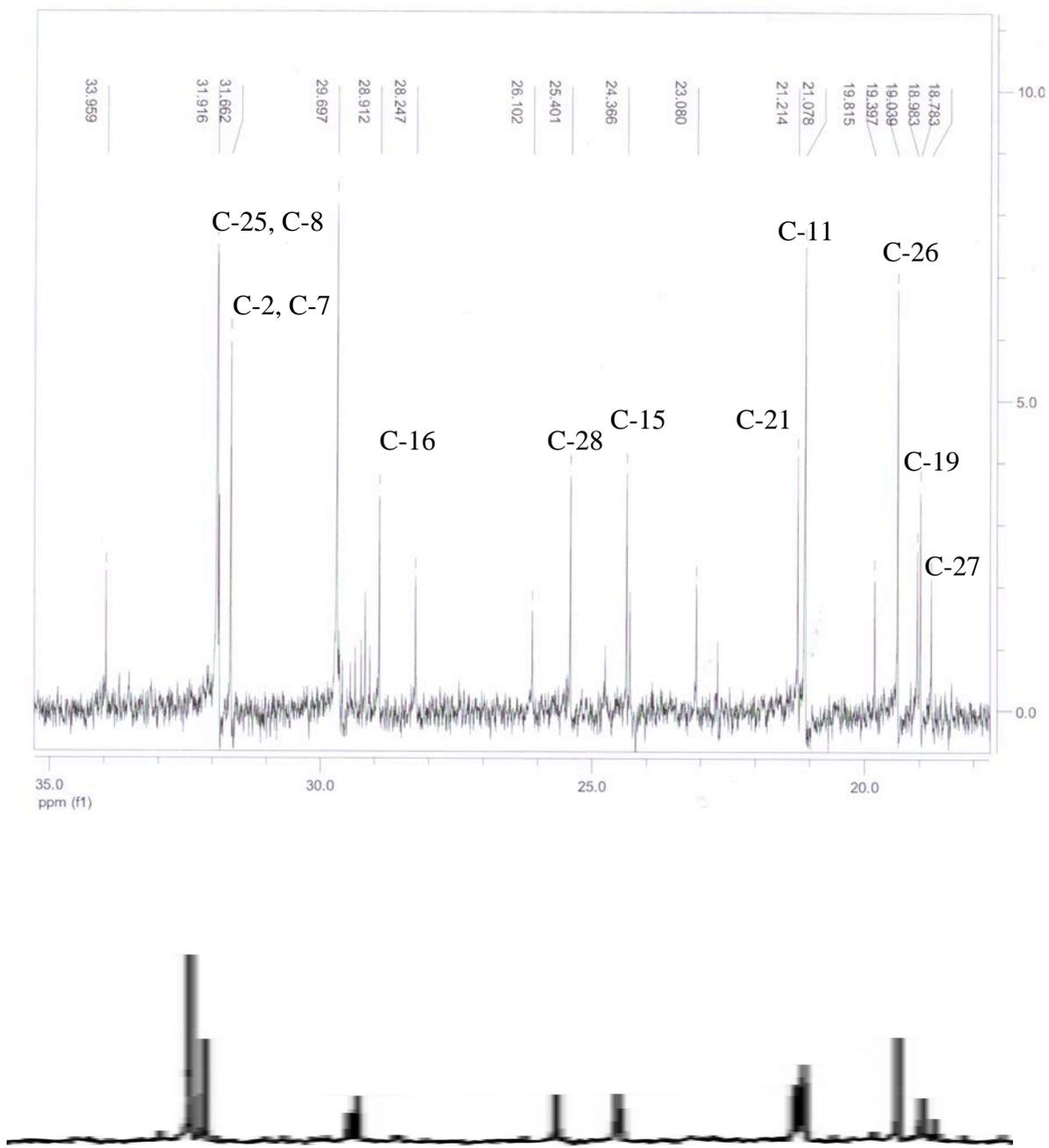


Figura 21. Sección del espectro de RMN ^{13}C de estigmasterol de 35 a 15 ppm y comparación con Koay et al., 2013

Los desplazamientos para los carbonos 29 y 18 que son los más protegidos al campo magnético, fueron asignados como se muestra en la figura 22.

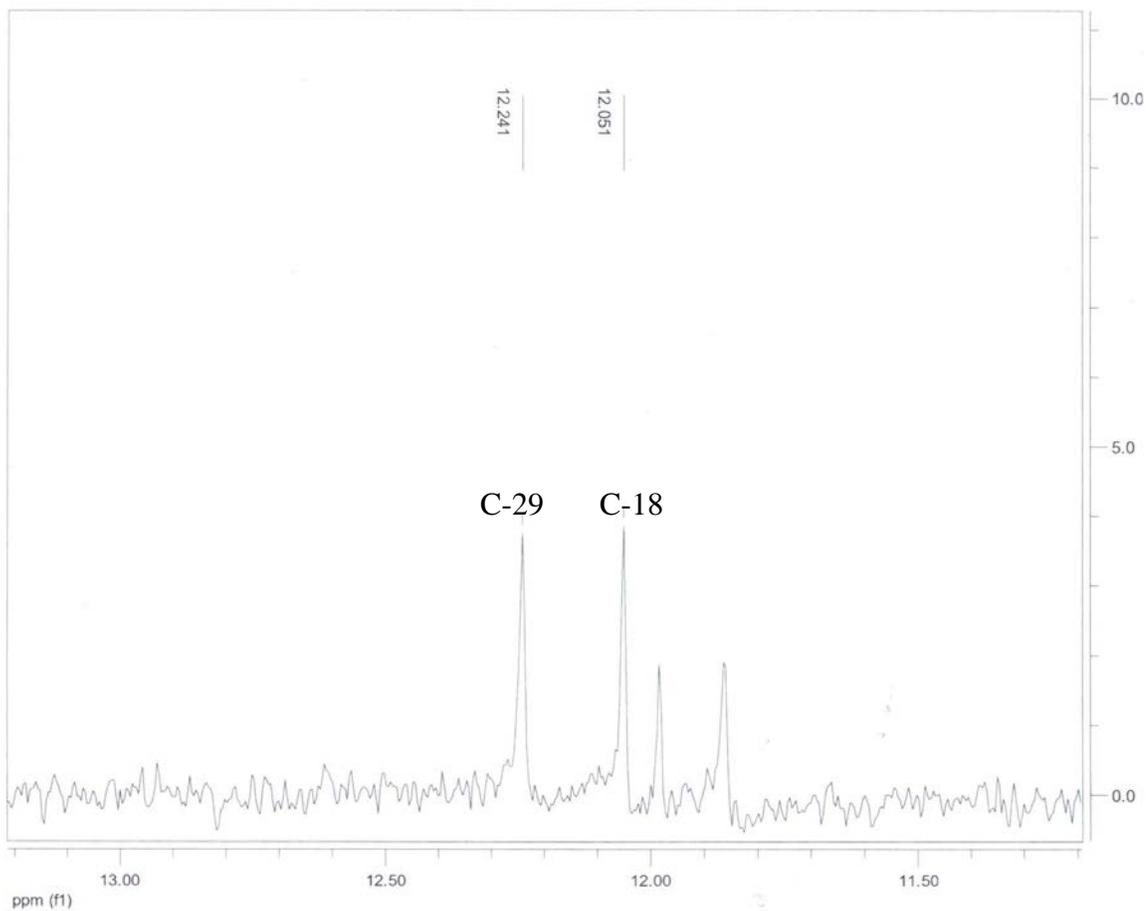


Figura 22. Sección del espectro de RMN ^{13}C de estigmasterol 14- 10 ppm

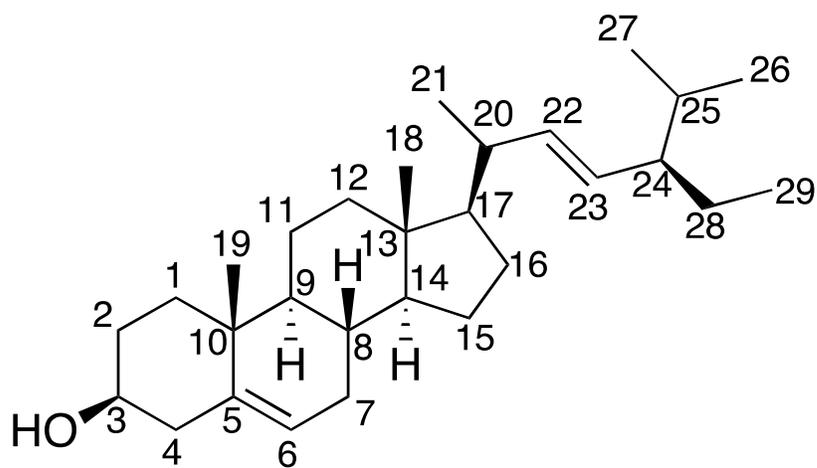


Figura 23. Estructura del estigmasterol con estereoquímica

Los desplazamientos de ^1H y ^{13}C corresponden a los reportados en otras publicaciones donde se asume que la estereoquímica de los compuestos triterpenos no cambia para los carbonos, 8, 9, 10, 13, 14 y 17 (Forgo y Kövér, 2004; Chaturvedula y Prakash, 2012; Koay et al., 2013) (figura 23).

8. Conclusiones

En el presente trabajo se observó que los extractos de *A. cuspidata*, *A. subviscida*, *A. aurantium*, *A. integrifolium*, *E. acutifolia*, *G. mexicanum*, *H. terebinthinaceus*, *I. murucoides*, *L. achyranthifolia*, *P. varicosa*, *S. arenarius* y *T. glabra*, tienen una importante actividad nematocida contra el segundo estado juvenil (J2) de *N. aberrans* en concentración de 1000 ppm; dentro de este grupo de plantas, en las tres concentraciones examinadas (10, 100 y 1000 ppm), los extractos más activos son los de la raíz de *P. varicosa* y la parte aérea de *A. aurantium*. La toxicidad de esta última planta puede estar relacionada con los metabolitos secundarios de la partición metanólica, que aún no han sido estudiados, ya que es más activa que la de acetona, de la cual se aisló el estigmasterol, un compuesto ya reportado que tuvo importante actividad nematocida *in vitro* contra J2 de *N. aberrans*.

Se ha evidenciado que *A. aurantium* puede ser una fuente de compuestos con potencial nematocida ya que en el trabajo previo del que se aislaron de la raíz el estigmasterol, una mezcla de estigmasterol con β -sitosterol y α -tertiofeno, resultaron muy activos contra los J2 de *N. aberrans* y ninguno de estos compuestos había sido evaluado contra este organismo.

No obstante, es necesario resaltar que este trabajo es un estudio *in vitro* y requiere de otras pruebas, para garantizar el potencial nematocida de los extractos y compuestos y su posible aplicación en maceta o invernadero, para proponerlos como método alternativo en el control biológico de *N. aberrans*.

Referencias

- Abeygunawardena C., Kumar V., Marshall D.S, Thomson R.H. y Wickramaratne D.B.M.** 1991. Furanonaphtoquinones from two *Lantana* species. *Phytochemistry*. 30: 914-945.
- Ahmad F., Rather M.A. y Siddiqui M.A.** 2010. Nematicidal activity of leaf extracts from *Lantana camara* L. against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood and its use to manage roots infection of *Solanum melongena* L. *Braz. Arch Biol. Technol* 53: 543-548.
- Anandakumar A.M., Paulsamy S. y Senthilkumar P.** 2009. Preliminary phytochemical studies for the quantification of secondary metabolites of medicinal importance in the plant, *Acalypha fruticosa* Forssk. *Journal of applied and natural science*. 1:41-43.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M.,** 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99, 325-348.
- Andrés M.F., González-Coloma A., Sanz J., Burillo J. y Sainz P.** 2012. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochem Rev.* 11:371-390.
- Arias Y., Gonzáles I., Rodríguez M., Rosales C., Suárez Z. y Peteira B.** 2009. General aspects of the interaction tomato (*Solanum lycopersicon* L.)-*Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección veg.* 24:1-13.
- Argentieri M.P., D'Addabbo T., Tava A., Agostinelli A., Jurzysta M. y Avato P.** 2008. Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago* spp. *Eur. Plant Pathol.* 120: 189-197.
- Bakker J., Gommers J., Nieuwenhuis I. y Wynber H.** 1979. Photoactivation of the nematicidal compound α -terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes* species). *The Journal of Biological Chemistry.* 254: 1841-1844.
- Barbosa L.C.A, Barcelos F.F., Demuner A.J. y Santos M.A.** 1999. Chemical constituents from *Macuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. *Nematropica* 29: 81-88.
- Benítez García, S.E.** 2005 Selección y Estudio Químico de una especie vegetal de la familia Asteraceae en la región costa de Oaxaca, Tesis de Licenciatura, Universidad del Mar.

- Bolivar, P., Cruz-Paredes, C., Hernández, L.R., Juárez, Z.N., Sanchez-Arreola, E., Av-Gay, Y., Bach, H.,** 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. J Ethnopharmacol 137, 141-147.
- Chaturvedula V.S.P. y Prakash I.** 2012. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. International current pharmaceutical journal. 9:239-242.
- Chen X.Y, Chen S.Y. y Dickson D.W.** 2004. Nematology: Advances and perspectives Vol. 2. CABI. EUA 1234 pp.
- Chérigo L. y Pereda-Miranda R.** 2006. Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. J. Nat. Prod 69: 595-599.
- Chitwood D.** 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annu Rev Phytopalogy 40: 221-249.
- Cid del Prado V. I., Cristóbal A.J. y Evans K.** 1997. Manejo de poblaciones de *Nacobbus aberrans* en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Nematropica. 27: 103.
- Cid del Prado V. I., Franco A.G.E. y Cristóbal A.J.** 1997. Gama de hospedantes de poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans* (Thorne,1935). Nematropica. 27: 104.
- Cid del Prado Vera I., Franco J.C., Alejo R., Flores C., J.A. Hernández, R., Manzanilla L. and K. Evans.** 2005. Characteristics and Ecology of *Nacobbus aberrans* in Mexico. California Nematology Workshop.
- Cieśla L. y Waksmundzka-Hajnos M.** 2009. Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. J. Cromatogr A. 1216: 1035-52.
- Cristóbal A.J. Cid del Prado-Vera I. Manzanilla-López R.H. Marbán M.N., Mora A.G. y Sánchez G.P.** 2001. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. Nematropica. 3:227-233
- Cristóbal-Alejo J., Mora-Aguilera G., H. Manzanilla-López R., Marbán-Méndoza N., Sánchez-García P., Cid Del Prado-Vera I., y Evans K.** 2006. Epidemiology and integrated control of *Nacobbus aberrans* on tomato in Mexico. Nematology. 8:727-737.

- Delgado, N.M., Taboada-Ramírez, J., Ortega-Hernández, A., Merchant-Larios, H., Sánchez-Vázquez, M.L., Ramírez, G., Reyes, R.** 1999 Effects of a Purified Fraction from *Echeveria gibbiflora* Aqueous Crude Extract on Guinea-pig Spermatozoa. *Phytother. Res.* 13, 46–49
- D’Addabbo T., Carbonara T. Argentieri M.P., Radicci V., Leontti P., Villanova L. y Avato P.** 2013. Nematicidal potencial of *Artemisia annua* and its main metabolites. *Eur. Plant Pathol* 137: 295-204.
- DeRosa M.C. y Crutchley R.J.** 2002. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry reviews* 234: 351-371.
- Echeverrigaray S., Zacaria J. y Beltrão.** 2010 Nematicidal activity of monoterpenoids againts the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 100:199-203.
- Elbadri G.A., Lee D.W., Park J.C., Yu H.B. y Choo H.Y.** 2008. Evaluation of various plants extracts for their nematicidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Asian-Pacific Entomology*. 11: 99-102.
- Ercisli S., Quyum M., Raza Shah M., y Zia-Ul-Haq M.** 2012. Biological screening of selected flora of Pakistan. *Biol Res* 45: 375-379.
- Faizi S., Fayyas S., Bano S., Iqbal E.Y., Lubna, Siddiqi H. y Nas A.,** 2011. Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. Yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zea* infective stage larvae. *J. Agric. Food Chem.* 59: 9080-9093.
- Fernández-Rojas B.** 2006. Aislamiento y caracterización del tilirósido a partir de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. Tesis licenciatura Uversidad Tecnológica de la Mixteca.
- Flores-Camacho R., Manzanilla-López R.H., Cid del Prado-Vera I., y Martínez-Garza A.** 2007 Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:26-34.
- Forgo P. y Kövér K.E.** 2004. Gradient enhanced selective experiments in the ¹H NMR Chemical shift assignment of the skelton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids*. 69: 43-50.

- Franco-Navarro F., Cid del Prado-Vera I., Zavaleta-Mejía E. y Sánchez-García P.** 2002. Aplicación de enmiendas orgánicas para el manejo de *Nacobbus aberrans*, en tomate. *Nematropica*, 32: 113-124.
- Fukuto T.R.** 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*. 80:245-254
- Griebel T. y Zeier J.** 2010. A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant- pathogen interactions. *Plant. J.* 63: 254-268.
- Heeswijck R.V.** 2004. Reporte: Improved resistance to root pests. Australian National University. Australia 35p.
- Hernández-Carlos B., González-Coloma A., Orozco-Valencia U.A., Ramírez-Mares M.V., Andrés-Yeves M.F. y Joseph-Nathan P.** 2011. Bioactive Saponins from *Microsechium helleri* y *Sicyos bulbosus*. *Phytochemistry*. 72: 743-751.
- Hernández T., Canales M., Avila J.G., Garcia A.M., Martínez A., Caballero J., Romo de Vivar A. y Lira R.** 2005. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal ethnopharmacology*. 96: 551-554.
- Hernández T., Canales M., García M., Duran A., Meráz S., Dávila P. y Ávila J.G.** 2008. Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* y *Lippia graveolens* of Zapotitlan de Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 0717-7917.
- Hernández-Cano, J., Volpato, G.** 2004 Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J. Ethnopharmacology*, 90:293-316.
- Higgins, W.E.** 2003 *Prosthechea*: A chemical discontinuity in Laeliinae. *Lankesteriana* 7: 39-41.
- Hussain H., Hussain J., Al-Harrasi A. y Shinwari Z.K.** 2011. Chemistry of some species genus *Lantana*. *Pak J. Bot.*, 43:51-62.
- Ibáñez L.G.** 2005. Evaluación in vitro de nematocidas químicos y extractos naturales en solución salina sobre *Meloidogyne spp.* Chitwood (1949). Tesis licenciatura. Universidad del Mar. Viña del mar, Chile 92p.

- Jatala. P. y Kaltenbach R.** 1979. Survival of *Nacobbus aberrans* in adverse conditions (Abstr) J. Nematol 11:303.
- Koay C.Y., Wong K.C., Osman H., Eldeen I. y Asmawi M.Z.** 2013. Chemical constituents and biological activities of *Strobilanthes crispus* L. Rec. Nat. Prod. 7:59-64.
- Kringstad, R.** 1978 Determination of phorbic acid in *Echeveria elegans* by gas-liquid chromatography. J Chromatogr. 151: 401-405.
- Lambert J.D.H., Campbell G., Arnason J.T. y Majak W.** 1991. Herbicidal properties of alpha-terthienyl, a naturally occurring phototoxin. Can. J. Plant Sci. 71: 215-218.
- Lin Y.L., Chang Y.Y., Kuo Y.H. y Shiao M.S.** 2002. Anti-lipid-peroxidative principles from *Tournefortia sarmentosa*. J. Nat. Prod. 65:745-747.
- Lin Y.L., Tsai Y.L., Kuo Y.H., Lui Y.H. y Shiao M.S.** 1999. Phenolic compounds from *Tournefortia sarmentosa*. J. Nat Prod. 63: 1500-1503.
- Mahajan R., Singh P. y Bajaj K.** 1985. Nematicidal activity of some phenolic compounds against *Meloidigyne incognita*. Rev Nematol 8:161-164.
- Main G., Franco J.F., y Ortuño N.** 2001. Protección de Semilla de papa infectada con *Nacobbus aberrans*, mediante nematocidas blandos. Manejo Integrado de Plagas.59:52-57.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserra, P. S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, and K. Evans.** 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda:Pratylenchidae):Systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32:149-227.
- Meira M., Pereira da Silva E., David J.M. y David J.P.** 2012. Review of the genus *Ipomoea*: tradicional uses, chemistry and biological activities. Braz. J. Pharmacogn 22:682-713.
- Mila-Arango R.** 2013. Identificación de dos spp de *Ipomoea* y evaluación in vitro del extracto metanólico como problema de intoxicación en cabras.COLPOS tesis Estado de México. 138 p.

- Mirón, E. C. E.** 2005. Estudio químico preliminar de “*Acalypha cuspidata*, *Baccharis conferta* y *Vernonanthura oaxacana*”. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México.
- Nivsarkar M., Cherian B. y Padh H.** 2001. Alpha-terthienyl: a plant-derived new generation insecticide. *Current Science*. 8: 667-672.
- Noumedem J.A.K., Tamokou J.D., Teke G.N., Momo R.C.D., Kuete V. y Kuate J.R.** 2013. Phytochemical analysis, antimicrobial and radical-scavenging properties of *Acalypha manniana* leaves. *Springerplus* 2:1-6.
- Ntalli N.G. y Caboni P.** 2012 Botanical Nematicides: A review. *J. Nat Prod*, 60:9929-9940.
- Ntalli N.G., Menkissoglu-Spiroudi U. y Giannakou I.** 2010. Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azadarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology*. 156: 309-317.
- Oka Y.** 2012 Nematicidal activity of *Verbesina encelioides* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and effects on plant growth. *Plant Soil*. 355:311-322.
- Oka Y., Nacar S., Putiesky E., Ravid U., Yaniv Z., y Spiegel Y.,** 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 7: 710-715.
- Pavaraj M., Bakavathiappan G. y Baskaran S.** 2012 Evaluation of some plant extracts for their nematicidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J Biopest* 5:106-110.
- Pérez M.P., Navas-Cortés J.A., Pascual-Villalobos M.J. y Castillo P.** 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathology* 52: 395-401.
- Pérez-López E.** 2012. Plaguicidas botánicos: Una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, 16: 51-59.
- Pérez-Rodríguez I., Franco-Navarro F., Cid del Prado-Vera I., y Zavaleta-Mejía E.** 2011. Control de *Nacobbus aberrans* en chile ancho (*Capsicum annum* L.) mediante el uso combiando de enmiendas orgánicas, hongos nematófagos y nematicidas. *Nematropica*. 41:122-129.

- Pérez, G.S., Vargas S.R., Zavala, S.M.A., Pérez-G., C., Pérez, G.R.M.** 1993. Hypoglycemic effect of *Salpianthus arenarius* root. Médicaments et Aliments: L'approche Ethnopharmacologique. 309-310. Actes du 2e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars 1993.
- Rampone W.M., McCullough J.L., Weinstein G.D., Towers G.H. Berns M.W. y Abeysekera B.** 1986. Characterization of cutaneous phototoxicity induced by topical alpha-terthienyl an ultraviolet A radiation. J. Invest Dermatol. 87: 354-357
- Reyes, R., Merchant-Larios, H., Ortega-Hernández, A., Delgado, N.M.** 2002. Male contraception, IV: Hypotonic -like effect from *Echeveria gibbiflora* on human sperm. Arch. Androl. 48: 443-449.
- Rosquete, P. C.** 2002. Estudio fitoquímico y bioactividad de plantas medicinales de los Andes Venezolanos. Tesis de doctorado. Universidad de Salamanca.
- Salawu E.O. y Darabidan I.A.** 2010. Screening of selected ornamental plants to *Meloidogyne incognita* in Nigeria. Pakistan Journal Nematology. 28:353-358.
- Sánchez-Portillo J.F.** 2010. Efecto de Quitina y Quitosano sobre huevos y juveniles de nematodos formadores de nódulos radiculares, *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*. Bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Tesis del Colegio de Postgraduados, Montecillo Estado de México
- Shaukat S.S., Siddiqui I.A., Ali N.I., Ali S.A. y Khan G.H.** 2003. Nematicidal and allelopathic responses of *Lantana camara* root extract. Phytopathol. Mediterr. 42:71-78.
- Sousa E.O. y Costa J.GM.** 2012. Genus *Lantana*: Chemical aspects and biological activities. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 25: 1155-1180.
- Stevens, J.F., Hart, H., Van Ham, R.C.H.J., Elema, E.T., Van Den Ent, M.M.V.X., Wildeboer, M., Zwaving, J.H.** 1995. Distribution of alkaloids and tannins in the Crassulaceae. Biochem Biochem. Syst. Ecol. 23: 157-65.
- Sultana N., Akhter M., Saleem M., y Al Y.** 2011. Nematicidal effect of *Acacia nilotica* and *Gymnema sylvestris* against second stage juvenile of *Meloidogyne incognita*. J. Entomol. Nematol 3: 025-29.

- Taba S., Sawada J. y Morimazato Z.** 2008. Nematicidal activity of Okinawa island plants on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and white) Chitwood. *Plant Soil*, 303:207-216.
- Tovar Gijón, C., Hernández-Carlos, B., Burgueño Tapia, E., Cedillo Portugal, E., Joseph Nathan, P.** 2006 A new C-Glycosylflavone from *Encyclia michuacana*. *Journal of Molecular Structure*, **783**: 96-100.
- Tovar-Soto, A., Medina-Canales, M.G., y Torres-Coronel R.** 2012. Distribución, incidencia y alteraciones histológicas de una nueva enfermedad en betabel (*Beta vulgaris L.*) causada por el falso agallador *Nacobbus aberrans*, en el valle de Tepeaca, Puebla, México. *Nematropica*. 42: 191-197.
- Velásquez-Valle R.** 2001 Nematodos agalladores afectando hortalizas y otros cultivos en el norte centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19:107-109.
- Villa-Briones A., Zavaleta-Mejía E., Vargas-Hernández A., Gómez-Rodríguez O., y S. Ramírez-Alarcón.** 2008. Incorporación de vermicomposta para el manejo de *Nacobbus aberrans* en Jitomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14:249-255.
- Wen Y., Meyer S.L., Masler E.P., Zhang F., Liao J., Wei X. y Chitwood D.J.** 2013. Nematotoxicity of drupacine and cephalotaxus alkaloid preparation against the plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Bursaphelenchus xilophilus*. *Pest Manag Sci*. 69: 1026-1033.
- Wiratno D., Taniwiryono H., Van der Berg J.A.G., Risken I.M.C.M., Rietjens S.R., Dijiwanti, Kammenga J.E. y Murk A.J.** 2009. Nematicidal activity of plants extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *The Open Natural Products Journal*. 2:77-85.
- Zamudio G.V.** 1987. Evaluación de la resistencia de colecciones y variedades comerciales de tomate (*Lycopersicon spp*) a *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo Edo. México. 159 pp
- Zia Ul Haq M., Ahmad M. y Akhter Mussarat** 2010. Nematicidal activity of selected flora of Pakistan. *Pak. J. Bot.* 42:2119-2123.