Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó, Colombia

Jaramillo-Colorado BE[1*], Duarte-Restrepo E[1], Pino-Benítez Nayive[2]

[1]*Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Programa de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia.*

[2]*Grupo de Productos Naturales, Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Chocó, Colombia.*

Resumen: El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química volátil del aceite esencial de varias especies de Piperáceas (*Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis)* y la actividad repelente de ellos contra el gorgojo de granos almacenados *Tribolium castaneum* Herbst. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación, la separación e identificación de los componentes volátiles se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y para la evaluación de la actividad repelente se empleó el método de área de preferencia. Los compuestos mayoritarios encontrados en *Piper dilatatum* fueron el apiol 89,0% y *trans*-cariofileno (3,5%); en *Piper divaricatum,* eugenol (37,5%) y metil eugenol (36,3%); *Piper sp,* α-gurjuneno (o guaieno) (24,9%) y elemol (14,2%); *Piper sanctifelicis,* δ-3-careno (35,3%) y limoneno (27,1%); *Piper aduncum*, dilapiol (48,2%) y 1,8 cineol (11,4%). Los porcentajes de repelencia de los aceites esenciales a una concentración de 1 μL/cm^2, a un tiempo de exposición de 2 horas frente al *T. castaneum* fueron: *Piper aduncum (99%), Piper sp (96%), Piper dilatatum (82%), Piper divaricatum (76%), Piper santifelicis* (33%).

Palabras clave: *Piperaceae,* aceite esencial, actividad repelente, biocida, *Tribolium castaneum.*

Abstract: Evaluation of repellent activity of essential oils obtained from *Piperacea* plants from Choco department, Colombia. The aim of this work was to study the volatile chemical composition of essential oil from various species of *Piperaceae* (*Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, sp Piper, Piper sanctifelicis)* and their repellent activity against stored grain beetle *Tribolium castaneum* Herbst. Essential oils are obtained by hydrodistillation, the separation and identification of volatile components was conducted by gas chromatography and mass spectrometry for the determination of the repellent activity, the preferred area method was used. The main compounds found in *Piper dilatatum* were apiole 89,0% and *trans*-caryophyllene (3,5%); in *Piper divaricatum,* eugenol (37,5%) and methyl eugenol (36,3%); *Piper sp,* α-gurjunene (or guaiene) (24,9%) and elemol (14,2%); *Piper sanctifelicis,* δ-3-carene (35,3%) and limonene (27,1%); *Piper aduncum*, dillapiole (48,2%) and 1,8 cineole (11,4%). Percentages repellency of essential oils at a concentration of 1 μL/cm^2, at an exposure time of 2 hours against *T. castaneum* were: *Piper aduncum* (99%), *Piper* sp (96%), *Piper dilatatum* (82 %), *Piper divaricatum* (76%), *Piper santifelicis* (33%).

Keywords: *Piperaceae,* essential oil, repellent activity, biocide, *Tribolium castaneum*

Introducción

En Colombia, uno de los departamentos con mayor biodiversidad a nivel de flora, es el departamento del Chocó, ubicado entre el océano Pacífico y la cordillera Occidental. Se estima que posee más de 8000 especies de plantas superiores [1]. En esta región se encuentra un nivel alto de especies endémicas y potencialmente útiles, con importancia cultural y socio-económica, ya que están directamente relacionadas con el suplemento de las diferentes necesidades de su comunidad, tales como alimento, medicina, vivienda, etc. [2,3]. En la flora Pacifica colombiana, la familia *Piperaceae* es el cuarto grupo mejor representado en plantas con flores, el departamento del Chocó cuenta con 93 de las 183 especies registradas en el pacifico Colombiano [4,5].

Desde el punto de vista económico el género más importante de esta familia es el *Piper*. Las plantas de este género son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional [6] por las variadas propiedades biológicas que presentan [7], entre ellas, diuréticas [8], antiparasitarias [9,10], antimicrobianas [7,11], antioxidantes [11,12], antiinflamatorias [13], antiviral [14], contra mordidas de serpiente [15], insecticida [7, 16], etc. Sus aceites esenciales en particular inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos [17-19] que causan infecciones importantes en el hombre, las plantas y los animales, presentando además, diversos tipos de actividades como citotóxica, antifúngica, antioxidante, insecticida, larvicida, antinociceptivo, antiinflamatoria, entre otras [17-22]. Numerosas investigaciones han mostrado que existe diversidad química en la composición de los aceites esenciales según las condiciones geobotánicas de cultivo, ambiente, etc, los cual influye directamente en la respuesta a las actividades que se desean evaluar [23, 24]. La fumigación juega un importante papel en la eliminación de plagas de insectos en productos almacenados. Actualmente, la fosfina y el bromuro de metilo (disponible en botellas y latas de metal) son los dos fumigantes comunes utilizados para proteger los granos almacenados de las plagas.

La resistencia de los insectos a la fosfina es un problema mundial, mientras que el bromuro de metilo, un fumigante de amplio espectro, ha sido declarado una sustancia que agota el ozono y por lo tanto, se está eliminando por completo [25,26]. En vista de los problemas con los fumigantes actuales (es decir, compuestos que actúan sobre insectos diana en fase gaseosa), hay un interés mundial en estrategias alternativas, incluyendo el desarrollo de sustitutos químicos y productos vegetales. Sobre éstos últimos, existe una creciente inclinación por los aceites esenciales y sus componentes por su acción fumigante, ya que éstos pueden tener ventaja sobre los convencionales en términos rápida degradación, disponibilidad local [27] y baja toxicidad para los mamíferos (no es cierto en todos los casos), *ie*, Llana *et al* reportaron la ausencia de citotoxicidad de compuestos azufrados obtenidos del aceite esencial de *Allium* spp, en células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 [28].

Numerosas investigaciones han sido realizadas sobre los aceites esenciales y sus componentes como fumigantes, contra insectos de productos almacenados. Las pruebas de toxicidad realizadas con aceites esenciales (principalmente extraídos de plantas pertenecientes a las familias Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae y Myrtaceae) y sus componentes (cianohidrinas, monoterpenoides, compuestos azufrados, tiocianatos, entre otros) se han centrado en gran medida en las plagas de escarabajos como el *Tribolium castaneum* [29-31].

El objetivo de esta investigación fue evaluar la composición química volátil del aceite esencial de 5 plantas Piperáceas recolectadas en el departamento del Chocó: *Piper aduncum, Piper sp, Piper dilatatum, Piper divaricatum* y *Piper santifelicis* y evaluar su actividad repelente contra el gorgojo de la harina *Tribolium Castaneum* Herbst.

*e-mail: beatrizjaramilloc@yahoo.com

Material y métodos

Material vegetal

Las hojas frescas de Piperáceas, fueron recolectadas en el departamento de Chocó, Colombia. La identificación taxonómica se llevó a cabo en el Herbario Nacional de Colombia (COL), los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en dicho Herbario. En la Tabla 1 se muestran la identificación y número de *voucher* de las especies estudiadas.

Tabla 1. *Identificación taxonómica de las Piperáceas estudiadas.*

Especie	No voucher
Piper dilatatum L. Rich	COL 519976
Piper divaricatum G. Mey	Col 519991
Piper aduncum L.	COL 522554
Piper sp	COL 519969
Piper sanctifelicis	COL 519979

Hidrodestilación (HD)

Esta fue realizada en un equipo de destilación tipo Clevenger, según los procedimientos descritos por Jaramillo et al., [32,33]. Se usaron 500 g de hojas y tallos frescos, finamente picados, sumergidos en agua, la duración de la hidrodestilación fue de 2 horas. El aceite esencial se separó del agua por decantación y se le adicionó Na_2SO_4 anhidro. Una alícuota del aceite (30 µL) se diluyó en 1 mL de diclorometano para el análisis cromatográfico.

Análisis Cromatográfico

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un GC Hewlett-Packard (HP) 5890A Series II, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 ºC, relación de *split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250 ºC). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5973, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* de 1:30), un inyector automático *Agilent* 7863, un sistema de datos (HP *ChemStation* 1.05), incluyendo las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K y NIST 98. Se usó una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS de 50 m x 0.25 mm D.I., con fase estacionaria de 5 %-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 µm de grosor. El gas de arrastre fue helio (99.995 %, *Aga Fano, S.A.)*, con una velocidad lineal de 35 $cm.s^{-1}$. La temperatura del horno fue programada de 40 ºC (15 min) hasta 250 ºC (15 min) @ 5 °C min^{-1} [25]. Para la identificación de los compuestos se usaron algunos terpenos estándar, analizados bajo las mismas condiciones instrumentales que las muestras, espectros de masas e índices de retención de *Kováts* de componentes, que se compararon con los reportados en la literatura [34,35].

Insectos

Para los experimentos se utilizaron adultos de *Tribolium Castaneum* Herbts. (*Coleóptera:* Curculionidae), los cuales se mantuvieron sobre un sustrato de granos de harina de maíz. Los cultivos de insectos se mantuvieron en la oscuridad a 25 ± 1 °C y 70 ± 5 % de humedad relativa.

Actividad repelente

Este ensayo se realizó usando la técnica de área de preferencia [32,36]. Para realizar el ensayo se colocaron un total de 20 insectos adultos de *T. castaneum* Herbts en el interior de una caja de *Petri* con papel filtro cortado a la mitad, resultando dos áreas de trabajo, una tratada con volúmenes iguales de diferentes concentraciones de aceite esencial disuelto en acetona (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 y 1,0 $\mu L/cm^2$), y la otra con acetona únicamente. Para identificar el área tratada con el aceite del área no tratada, fue colocado un punto en el centro de una de las mitades del papel filtro, luego de esto, se contaron los organismos presentes en cada mitad del papel filtro después de dos y cuatro horas de exposición.

El porcentaje de repelencia (PR) en los diferentes tiempos de exposición fue hallado utilizando la formula PR= [(ANT-AT)/(AT+ANT)*100], donde ANT Y AT corresponden al número de insectos de las áreas no tratadas con el aceite y tratadas con el mismo, respectivamente. Cada concentración fue evaluada 5 veces y el ensayo se realizó por duplicado. Durante el ensayo se tuvo en cuenta que el diámetro del papel filtro coincidiera con el tamaño de las cajas de *Petri* y hacer las mediciones en oscuridad absoluta con el fin de obtener resultados veraces.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media ± error estándar. La significación estadística fue determinada por los test de *Duncan* y *Tukey*. El análisis de varianza determinó si los resultados obtenidos para los ensayos de actividad repelente son estadísticamente diferentes. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

Resultados

Composición química volátil

La Tabla 2 muestra los principales componentes hallados en los aceites esenciales de las Piperáceas trabajadas. Fueron identificados metabolitos secundarios en concentraciones superiores al 0,1 %. Los compuestos mayoritarios encontrados en *Piper dilatatum* fueron el apiol 89,0% y *trans*-cariofileno (3,5%), cubebeno (0,8%); en *Piper divaricatum,* Eugenol (37,5%), Metil eugenol (36,3%) y β-elemeno (10,7%); *Piper sp,* α-gurjuneno (o guaieno) (24,9%), elemol (14,2), δ-3-careno (11,4%);, *Piper sanctifelicis* δ-3-careno (35,3%), limoneno (27,1%), β-pineno (6,9%); *Piper aduncum*, dilapiol (48,2%), 1,8 cineol (11,4%), cariofileno (8,3%), espatulenol (4,2%).

Actividad repelente

Los resultados de la actividad repelente del aceite esencial de *Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis* son presentados en la Tabla 3. Los valores positivos representan actividad repelente y los negativos atrayente.

Los aceites esenciales de *Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divericatum* y *Piper sp* presentaron actividad repelente, respectivamente de 65,6%, 89%, 73% y 96%; a una concentración del aceite esencial de $1 \mu L/cm^2$.

Discusión

A través del tiempo, especies de la familia *Piperaceae*, han sido consideradas de importancia económica por su uso condimentario [7]. Además, porque han demostrado significativas propiedades medicinales, etnofarmacológicas [6] y como fuente de insecticidas naturales [37], lo cual justifica la bioprospección de estas especies.

En este trabajo de evaluó la composición química volátil de los aceites esenciales de *Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis*, procedentes del departamento del Chocó, Colombia. Estos aceites mostraron variación cualitativa y cuantitativa comparada con la encontrada en especies de otras regiones. Por ejemplo mientras que los compuestos mayoritarios encontrados en el *P dilatatum* del Chocó fueron apiol (89%) y cariofileno (8,3%), en las del estado de Ceará, Brasil fueron felandreno (22,5%), Δ-3-careno (10,2%), biciclogermacreno (25,0%), cariofileno (10,2%) y E-nerolidol (6,2%) [38]. En otro estudio, reportado por Andrade *et al*., se recolectaron especímenes de 12 regiones diferentes de Brasil y se obtuvieron 7 grupos de acuerdo con los compuestos mayoritarios tenidos de la siguiente manera: grupo A (E-cariofileno, α-cadinol, germacreno D), Grupo B (espatulenol, biciclogermacreno y (*Z*)-β-ocimeno), grupo C (espatulenol, germacreno D y (*E*)-nerolidol, Grupo D (germacreno D, limoneno, α-felandreno and biciclogermacrene; Grupo E (β-elemeno, germacreno D y β-pineno; Grupo F (curzereno, *p*-cymeno y α-eudesmol) y Grupo G ((*Z*)-α-bisaboleno,

Tabla 2. *Compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis, obtenidos por HD.*

No	Compuesto	Ik[a] HP-5	Porcentaje de área[b], %				
			P. dilatatum	*P. aduncum*	*P. divaricatum*	*Piper sp*	*P. sanctifelicis*
1	α-Pineno	938	0,4	0,5	-	1,1	4,4
2	β-Pineno	982	0,6	-	-	1,9	6,9
3	δ-3-Careno	1014	-	-	-	11,4	35,3
4	*p*-Cimeno	1024	-	0,8	-	-	4,9
5	Limoneno	1028	-	-	-	2,4	27,1
6	1,8-Cineol	1035	-	11,4	-	-	-
7	Linalool	1096	-	-	-	-	2,3
8	Eugenol	1356	-	-	37,5	-	-
9	β - Cubebeno	1390	0,8	-	0,8	-	-
10	Metileugenol	1401	-	-	36,3	-	-
11	*trans*-Cariofileno	1418	8,3	6,0	3,0		-
12	γ -Elemen	1433	1,6	-	10,7	7,3	-
13	γ -Gurjuneno	1473	-	-	-	24,9	-
14	β -Selineno	1485	0,4	-	0,5	2,8	-
15	γ -Cadineno	1513	1,7	-	-	1,9	-
16	Acetato de eugenilo	1524	-	-	3,2	-	-
17	Isómero Nerolidol	1540	-	-	-	-	5,8
18	Dilapiol	1622	-	48,2	0,8	-	-
19	Apiol	1680	89,0	0,6	1,8	-	-
20	Elemol	1549	-	-	-	14,1	-
21	Elemicina	1556	-	-	3,4	-	-
22	Espatulenol	1576	4,2	-	-	1,8	-
23	Asarona	1624	-	-	-	-	-
24	β -Eudesmol	1632	-	-	2,0	5,7	-

[a]Indices de *Kováts* determinados experimentalmente en Columna HP-5.
[b]Promedio de tres extracciones ± ts/√*n* (*n* = 4, 95% confidencia).
HD: hidrodestilación.

curzereno y germacreno D) [23].

De otra parte, los compuestos mayoritarios encontrados en los aceites esenciales de *P. divaricatum*, *P.aduncum y P. sanctifelicis* difieren de los reportados por otros investigadores. De acuerdo con Barbosa et al., el compuesto principal encontrado en *P. divaricatum* fue el safrol en hojas, tallos y frutos (83-98%) [39]. Mientras que Almeida *et al*., reportó linalool (23,4–29,7%), β-pineno (19,9–25,3%) y α-pineno (9,0–18,8%) [40]. Da silva presentó en su investigación como compuestos mayoritarios el metileugenol (63,8%) y el eugenol (23,6%) [41], similares a los encontrados en éste trabajo. El compuesto mayoritario encontrado en *P. aduncum* en Chocó, Colombia fue el dilapiol, este también fue reportado como mayoritario en el AE de plantas recolectadas en áreas deforestadas del amazonas al norte de Brasil [42, 43], en Manaos [44] y Ecuador [17]. Pero en los aceites esenciales de *P. aduncum* obtenidos de plantas de poblaciones *Brazlândia y Parque do Guará* (Brasil) los componentes mayoritarios fueron 4-terpineol y piperitona [45].

La toxicidad de los aceites esenciales sobre los insectos de productos almacenados es influenciada por la composición química del aceite, lo que a su vez depende de la fuente, la temporada y condiciones geobotánicas, influencia del medio ambiente, el método y tiempo de extracción, parte de la planta utilizada. La variabilidad química puede tener importancia ecológica y taxonómica en la gestión y la utilización económica de la especie [24,45].

La composición química de los aceites esenciales, también determina la actividad biológica que estos ejercen. Por ejemplo, extractos y aceites esenciales de diferentes especies del género *Piper* incluyendo sus metabolitos secundarios han sido usados como preservativos, bactericidas, antifúngicos insecticidas, larvicidas, entre otros [7-22]. *P. dilatatum, P divaricatum, P. aduncum* y *P. sanctifelicis* han mostrado actividad antibacterial y antifungica [40-46]. Los aceites esenciales de *P. aduncum* y *P. divaricatum* hna mostrado actividad antimicrobial [10], larvicida, insecticida y repelente [43, 47].

Poco se conoce acerca del mecanismo de acción de los repelentes, se cree que interfieren con los receptores olfatorios de atracción hacia la fuente de alimento del insecto. Las propiedades repelentes de los aceites esenciales parecen estar asociadas a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos en su composición química volátil.

Tabla 3. *Actividad repelente de los aceites esenciales de Piper dilatatum, Piper aduncum, Piper divaricatum, Piper sp, Piper sanctifelicis contra el Tribolium castaneum Herbst.*

Aceite esencial	Porcentaje de repelencia según el tiempo de exposición, %									
	2 horas de exposición					4 horas de exposición				
	0,0001 µL/cm²	0,001 µL/cm²	0,01 µL/cm²	0,1 µL/cm²	1,0 µL/cm²	0,0001 µL/cm²	0,001 µL/cm²	0,01 µL/cm²	0,1 µL/cm²	1,0 µL/cm²
P. sanctifelicis	38±9	35±8	25±10	17±9	33±5	33±8	36±8	22±10	20±9	40±5
P. dilatatum	36±7	45±6	51±4	65±6	82±5	16±9	43±9	58±5	65±9	82±4
P. aduncum	2±6	39±8	74±6[a]	89±5[b]	99±1[b]	14±8	38±8	71±6[b]	86±6[b]	100±0[b]
P. divaricatum	28±14	29±8	35±7	73±6	76±4	21±17	36±7	39±11	75±6	75±3[a]
Piper sp.	21±7	33±7	43±10	63±10[a]	96±2[b]	-2±14	5±15	31±15	70±8[a]	86±5[b]
Control	5±9	31±9	44±4	65±12	85±5	21±7	24±8	38±13	45±6	48±11

[a]*Existe diferencia significativa entre el aceite esencial y el repelente comercial (P>0,05)*
[b]*Existe diferencia significativa entre el aceite esencial y el repelente comercial (P>0,01)*

Algunos monoterpenos tales como α-pineno, cineol, eugenol, limoneno, terpinoleno, citronelol, citronelal, alcanfor, timol, dilapiol, entre otros; y sesquiterpenos como el nerolidol, α-humuleno and β-cariofileno son componentes comunes de un número de aceites esenciales descritos en la literatura, con actividad repelente [36, 47-49].

Los aceites esenciales o sus componentes que muestran actividad fumigante, generalmente tienen baja toxicidad para los mamíferos. Por ejemplo, los valores de la DL_{50} oral (mg/kg de peso corporal) para ratas de algunos aceites esenciales son: cálamo (0,78), alcaravea (3,50), eucalipto (4,44), tomillo (2,84), menta (4,41) y el de los principales constituyentes son: anetol (2,09), carvacrol (0.81), 1,8-cineol (2.48), p-cimeno (4,75), limoneno (4,60), linalol (2.79) y terpineol (4.3) [26, 50]. Al mismo tiempo, debe tenerse en cuenta que no todos los compuestos que se encuentran en aceites esenciales de plantas son inocuos. Por ejemplo, los compuestos estragol y (+)-fenchona presentes en el aceite esencial de *Foeniculum vulgare* (son altamente eficaces contra *Sitophilus oryzae, Callosobruchus chinensis* y *Lasioderma serricorne*) son conocidos por ser cancerígenos [51].

Conclusión

Los aceites esenciales de especies del género *Piper* pueden ser una alternativa atractiva de origen natural para el control de insectos como el *Tribolium castaneum* en productos alimenticios almacenados (postcosecha).

Agradecimientos

A la Universidad de Cartagena y su Grupo de Investigaciones Agroquímicas. Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Tecnológica del Chocó. A Rosa Cuadro y María González.

Bibliografía

1. Pino-Benitez N (2008) Plantas Útiles en el departamento del Chocó Parte I: Extractos. Uryco Ltda. Medellín, Colombia. pp.312.
2. Mosquera LJ, Robledo D, Asprilla A (2007) Diversidad florística de dos zonas de bosque tropical húmedo en el municipio de alto Baudó, Chocó colombia. *Acta Biol Colomb* 12: 75-90.
3. Nayive-Pino B, Yurgaky-Espinosa T, Cuesta-Nagles J (2005) Aspectos Botánicos y Química Preliminar de Seis Especies del Género *Piper* Usadas como Medicinales en el Municipio de Quibdó-Chocó. Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo 23: 20-25.
4. Rangel JO (2004) Diversidad y riqueza de espermatofitos en el Chocó biogeográfico. En: Rangel JO Colombia diversidad biótica IV. El Choco biogeográfico/Costa Pacífica. Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá, 83-99.
5. Pino-Benítez N (2008) Actividad Antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del genero *Piper* L. (*Piperaceae*). Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo 27:65-75.
6. Roersch CMFB (2010) *Piper umbellatum* L.: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. Review. J Ethnopharmacol 131: 522-537.
7. Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Farooq S, Ali M, Khan MA (2012) Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. Asian Pac J Trop Biomed 2: S1945-S1953.
8. Da Silva-Novaes A, Da Silva-Mota J, Barison A, Veber CL, Negrao FJ, Leite Kasuya CA, De Barros ME (2014) Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). Phytomedicine 21: 523-528.
9. Dal Picolo CR, Bezerra MP, Gomes KS, Passero LF, Laurenti MD, Martins EG,
10. Sartorelli P, Lago JHG (2014) Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. Fitoterapia 97: 28-33.
11. Adate PS, Parmesawaran S, Chauhan Y (2012) in vitro Anthelmintic Activity of Stem Extracts of *Piper betle* Linn Against *Pheritima Posthuma*. Phcog J 4: 61-65.
12. Zarai Z, Boujelbene E, Ben Salem N, Gargouri Y, Sayari A (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. LWT-Food Sci Technol 50: 634-641.
13. Hernández LA, Guerrero-Beltrán JA (2014) Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. Food Chem 142: 455-460.
14. Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LFS, Martín-Calero MJ, Vidari G (2010) Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from Piper carpunya Ruiz & Pav. J Ethnopharmacol 128: 583-589.
15. Jiang ZY, Liu WF, Zhang XM, Luo J, Ma YB, Chen JJ (2013) Anti-HBV active constituents from *Piper longum*. Bioorg Med Chem Lett 23: 2123-2127.
16. Shenoy PA, Nipate SS, Sonpetkar JM, Salvi NC, Waghmare AB, Chaudhari PD (2013) Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (*Piperaceae*) against Russell's viper venom: Characterization of piperine as active principle. J Ethnopharmacol 147: 373-382.
17. Kanis LA, Rabelo BD, Moterle D, Machado Nogaretti R, Nunes T, Santos da Silva O, Somariva Prophiro J (2013) Standardized extract of *Piper ovatum* (*Piperaceae*) to control *Aedes aegypti* larvae *(Diptera*: *Culicidae*). Ind Crop Prod 50: 816-820.
18. Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli M, Andreotti ME, Tognolini M, Maldonado ME, Bruni R (2009) Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (*Piperaceae*) essential oils from Eastern Ecuador. Environ Toxicol Phar 27: 39-48.
19. Da Silva JKR, Pinto LC, Burbano RMR, Montenegro RC, Guimarães EF, Andrade EHA, Maia JGS (2014) Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. Ind Crop Prod 58: 55-60.
20. Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Kumar-Mishra P, Kishore Dubey N(2010) Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. Int J Food Microbiol 142: 114-119
21. Qin W, Huang S, Li Ch, Chen S, Peng Z (2010) (Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum Roxb. (Piperaceae*) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (*Coleoptera*: Hispidae). Pestic Biochem Phys 96 132–139.
22. Matasyoh JC, Wathuta EM, Kariuki ST, Chepkorir R (2011) Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. J Asia Pac Entomol 14: 26-28.
23. Lima DKS, Ballico LJ, Roch- Lapa F, et al (2012) Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. J Ethnopharmacol 142: 274-282.
24. Andrade EH, Alves CN, Guimarães EF, Carreira LMM, Maia JGS (2011) Variability in essential oil composition of *Piper*

dilatatum L.C. Rich. Biochem Syst Ecol 39: 669–675.

25. Oliveira GL, Moreira D, Mendes ADR, et al (2013) Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. Rev Bras Farmacogn 23:743-753.
26. Taylor RWD (1989) Phosphine a major fumigant at risk. Int Pest Control 31: 10–14.
27. Rajendran S, Sriranjini V (2008) Plant products as fumigants for stored-product insect control. J Stored Prod Res 44: 126–135.
28. Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Ann Rev Entomol 51: 45–66.
29. Llana Ruiz-Cabello M, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, Cameán AM (2013) Estudio in vitro de la viabilidad de células Caco-2 en presencia de componentes del aceite esencial de *Allium* spp. Rev Toxicol 30: 144-148.
30. Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E (2002) Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. Pest Manag Sci 58: 1101–1106.
31. Koul O (2004) Biological activity of volatile di-n-propyl disulfide from seeds of neem, *Azadirachta indica* (Meliaceae), to two species of stored grain pests, *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). J Econ Entomol 97: 1142–1147.
32. Erler F (2005) Fumigant activity of six monoterpenoids from aromatic plants in Turkey against the two stored-product pests confused flour beetle, *Tribolium confusum*, and Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. J Plant Dis Protect 112: 602–611.
33. Jaramillo-Colorado BE, Martelo IP, Duarte E (2012) Antioxidant and repellent activities of the essential oil from Colombian *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson. J. Agric Food Chem 60: 6364-6368.
34. Jaramillo Colorado BE, Martelo IP, Delgado W (2012) Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. Rev Cubana de Plant Med 17:54-64.
35. Adams RP (1995) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream (Illinois), USA. pp. 469.
36. Davies NW (1990) Gas chromatography retention indices of monoterpenos and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. J Chromatogr A 503:1-24.
37. Tapondjou A, Adler C, Fontem D, Bouda H, Reichmuth C (2005) Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens and Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. J. Stored Prod Res 41: 91–102.
38. Celis A, Mendoza C, Pachón M, Cardona J, Delgado W, Cuca LE (2008) Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. Rev Agron Colomb 26: 97-106.
39. Cysne JB, Canuto KM, Pessoa ODL, Nunes EP, Silveira ER (2005) Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. J Brazil Chem Soc 16: 1378-1381.
40. Barbosa QPS, da Câmara CAG, Ramos CS (2012) Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of Piper divaricatum: a new source of safrole. Quim Nova 35: 1806-1808.
41. De Almeida JGL, Silveira ER, Pessoa ODL, Nuñes EP (2009) Essential oil composition from leaves and fruits of *Piper divaricatum* G. Mey. J Essent Oil Res 21: 228-230.
42. Da Silva JK, Andrade EH, Guimarães EF, Maia JG (2010) Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. Nat Prod Commun 5: 477-480.
43. De Almeida RR, Souto RN, Bastos CN, da Silva MH, Maia JG (2009) Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. Chem Biodivers 6: 1427-1434.
44. Souto RN, Harada AY, Andrade EH, Maia JG (2012) Insecticidal activity of Piper essential oils from the Amazon against the fire ant Solenopsis saevissima (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). Neotrop Entomol 41: 510-517.
45. Silva AL, Chaves FCM, Lameira RC, Bizzo HR (2013) Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. Rev Bras Plantas Med 15: 670-674.
46. Potzernheim MCL, Bizzo R, Silva JP, Vieira RF (2012) Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. Biochem Syst Ecol 42: 25–31.
47. Tangarife-Castaño V, Correa-Royero JB, Roa-Linares VC, Pino-Benitez N, Betancur-Galvis LA, Durán DC, Stashenko EE, Mesa-Arango AC (2014) Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. J Essent Oil Res 26: 221-227.
48. Araujo MJC, Camara CAG, Born FS, Moraes M (2012) Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. Exp Appl Acarol 57: 139-155.
49. Ukeh DA, Umoetok SBA (2011) Repellent effects of five monoterpenoid odours against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in Calabar, Nigeria. Crop Prot 30:1351−1355.
50. Aciole EH, Guimarães NN, Silva AS, Amorim EM, Nunomura SM, Garcia AC, Cunha KS, Rohde C (2014) Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of Drosophila melanogaster. Pest Manag Sci 70:559-565.
51. Lee S, Peterson CJ, Coats JR (2003) Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. J Stored Prod Res 39: 77–85.
52. Kim DH, Ahn YJ (2001) Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. Pest Manag Sci 57: 301–306.