

2020

Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de plantas del género Piper frente a Pseudomonas aeruginosa y Chromobacterium violaceum

Diana Laritza Vanegas Arevalo
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Vanegas Arevalo, D. L. (2020). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de plantas del género Piper frente a Pseudomonas aeruginosa y Chromobacterium violaceum. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/81>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PLANTAS
DEL GÉNERO *Piper* FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* Y *Chromobacterium violaceum***

DIANA LARITZA VANEGAS AREVALO

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2020

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PLANTAS
DEL GÉNERO *Piper* FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* Y *Chromobacterium violaceum***

DIANA LARITZA VANEGAS ARÉVALO

Trabajo de Tesis para Optar por el Título de Bióloga

TUTORA

FRANCY JANETH MÉNDEZ CASALLAS

Microbióloga

MSc. Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

BOGOTÁ, D.C.

2020

Nota de aceptación:

Firma del Tutor
Francy Janeth Méndez Casallas

Firma del jurado
Lucia Cristina Lozano Ardila

Firma del jurado
María Camila Orozco Martínez

Resumen

Con el surgimiento de los primeros antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos, se fortalece el interés frente a los mecanismos de resistencia presentes en éstos. En los últimos años, han aumentado las patologías ocasionadas por bacterias en ambientes intrahospitalarios, debido al uso indiscriminado de antibióticos que fortalecen los mecanismos de ataque y permanencia de los microorganismos en los huéspedes enfermos. *Pseudomonas aeruginosa* es considerada como el principal agente nosocomial causante de más de 35.000 muertes al año en todo el mundo, el tratamiento médico conlleva a altos costos de que oscilan entre 13-15 millones de pesos por paciente, es por ello, que la necesidad de adelantar estudios enfocados a encontrar nuevos agentes que inhiban el crecimiento de bacterias patógenas multirresistentes se ha convertido en tema de interés. En cuanto a *Chromobacterium violaceum* aparece como una bacteria importante en diferentes aplicaciones biotecnológicas y principalmente en aspectos relacionados con la producción de violaceína, además de su uso como cepa biosensora para la identificación de mecanismos de comunicación bacteriana como *Quorum sensing* (QS). La búsqueda de sustancias naturales que puedan ser sintetizadas por las plantas como mecanismos de defensa contra microorganismos y otros factores ambientales es el principal interés del presente estudio cuyo objetivo fue identificar extractos de plantas del género *Piper* que generen inhibición de crecimiento frente a *P. aeruginosa* y anti QS en *C. violaceum*. Para ello, se evaluaron 48 extractos etanólicos provenientes de 22 morfoespecies de *Piper* mediante el método de siembra en pozo frente a *P. aeruginosa* ATCC BAA 047, ATCC 27853 y *C. violaceum* ATCC 12472. Como resultados se encontró que las morfoespecies pertenecientes al género *Piper* identificadas como sp 1, sp 3, sp 5, sp 8, sp 11, sp 13, sp 15, sp 16, sp 17, sp 18, sp 19 y sp 22 presentaron actividad antimicrobiana frente a una o todas las cepas evaluadas, de las cuales, sólo los morfoespecies sp 1, sp 5 y sp 13 mostraron actividad anti QS estableciendo que *Piper* sp 1 y sp 19 son candidatas para continuar estudios relacionados con la búsqueda de moléculas y/o metabolitos secundarios potenciales para actividad antimicrobiana en *P. aeruginosa* y anti QS en *C. violaceum*.

Palabras Claves: Actividad antimicrobiana, *Piper*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum*

Abstract

With the emergence of the first antibiotics for the treatment of diseases caused by infectious microorganisms, interest in the resistance mechanisms present in them is strengthened; In recent years, pathologies caused by bacteria have increased in hospital settings, due to the indiscriminate use of antibiotics that strengthen the mechanisms of attack and permanence of microorganisms in sick hosts. *Pseudomonas aeruginosa* is considered the main nosocomial agent causing more than 35,000 deaths a year worldwide, medical treatment leads to high costs ranging from 13-15 million pesos per patient, which is why the need to advancing studies focused on finding new agents that inhibit the growth of multidrug resistant pathogenic bacteria has become a topic of interest. As for *Chromobacterium violaceum*, it appears as an important bacterium in different biotechnological applications and mainly in aspects related to the production of violacein, in addition to its use as a biosensing strain for the identification of bacterial communication mechanisms such as *Quorum sensing* (QS). The search for natural substances that can be synthesized by plants as defense mechanisms against microorganisms and other environmental factors is the main interest of the present study, the objective of which was to identify plant extracts of the *Piper* genus that generate growth inhibition against *P. aeruginosa* and anti QS in *C. violaceum*. To do this, 48 ethanolic extracts from 22 *Piper* morphospecies were evaluated by the well seeding method against *P. aeruginosa* ATCC BAA 047, ATCC 27853 and *C. violaceum* ATCC 12472. As results, it was found that morphospecies belonging to the genus *Piper* identified as sp 1, sp 3, sp 5, sp 8, sp 11, sp 13, sp 15, sp 16, sp 17, sp 18, sp 19 and sp 22 presented antimicrobial activity against one or all of the strains evaluated, of which, only sp 1, sp 5 and sp 13 morphotypes showed anti QS activity, establishing that *Piper* sp 1 and sp 19 are candidates to continue studies related to the search for potential secondary molecules and / or metabolites for antimicrobial activity in *P. aeruginosa* and anti QS in *C. violaceum*.

Keywords: Antimicrobial activity, *Piper*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum*.

CONTENIDO

I. Introducción.....	10
II. Materiales y métodos.....	14
Preparación de los extractos	14
Cepas de trabajo.....	15
Mantenimiento de las cepas.....	15
Curva de crecimiento y producción de violaceína para <i>C. violaceum</i>	15
Preparación de inóculos para determinación de actividad antimicrobiana	16
Técnica de siembra en pozo para determinación de actividad antimicrobiana y anti QS.....	16
Determinación de actividad antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i>	16
Determinación de actividad antimicrobiana e inhibición de QS en <i>C. violaceum</i>	16
Análisis estadístico.....	17
III. Resultados	18
Curva de crecimiento y producción de violaceína para <i>C. violaceum</i>	18
Resultados técnica de siembra en pozo	19
Determinación de actividad antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i>	20
Determinación de actividad antimicrobiana e inhibición de QS en <i>C. violaceum</i>	21
Análisis actividad antimicrobiana frente a <i>P. aeruginosa</i> y <i>C. violaceum</i>	22
IV. Discusión de resultados.....	25
V. Conclusiones	29

VI. Recomendaciones 29

VII. Literatura Citada 30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de morfoespecies, extractos y partes de las plantas del género <i>Piper</i> utilizadas en el estudio.	14
Tabla 2. Resultados de la actividad antimicrobiana y anti QS para las morfoespecies evaluadas	20
Tabla 3. Actividad antimicrobiana mostrada por extractos vegetales de <i>Piper</i> frente a las cepas <i>P. aeruginosa</i> BAA 047 y 27853 evaluadas.	21
Tabla 4. Actividad de inhibición del QS frente a <i>C. violaceum</i> 12472 de los extractos etanólicos de las morfoespecies de <i>Piper</i> evaluadas.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A. Curva de crecimiento de <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 B. Curva de producción de violaceína por <i>C. violaceum</i> ATCC 12472	18
Figura 2. A. Extracto de tallos de <i>Piper</i> sp 19 activo frente a <i>P. aeruginosa</i> 27853 con un halo de 11 mm B. Extracto de tallos de <i>Piper</i> sp 19 activo frente a <i>P. aeruginosa</i> BAA047 con un halo de 10 mm (B).....	19
Figura 3. Halos de actividad antimicrobiana en color azul y halo de inhibición de QS halo rojo para el extracto de inflorescencias de Sp 19.	19
Figura 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano de los diferentes extractos activos frente a <i>P. aeruginosa</i> ATCC BAA 047 y ATCC v27853 y <i>C. violaceum</i> ATCC 12472	23

I. Introducción

La resistencia bacteriana ha sido desde la aparición de los primeros antibióticos, un tema de gran interés debido a que cada vez se hace más difícil el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas multirresistentes. Una de las principales causas de la resistencia en bacterias, es el uso indiscriminado de los antibióticos que logran acelerar sus procesos evolutivos (Arora, *et al.*, 2017) que se origina cuando la bacteria, al estar expuesta a un agente antimicrobiano, logra sobrevivir y multiplicarse. Cuanto más tiempo de exposición tenga el microorganismo con el agente antimicrobiano en concentraciones subletales, la capacidad de adquisición de mecanismos de resistencia, aumenta, independientemente de la naturaleza infecciosa del microorganismo (Odonkor y Addo, 2011).

Se ha demostrado que uno de los principales mecanismos que contribuye al desarrollo de resistencia en las bacterias Gram-negativas es el *quorum sensing* (QS) que funciona como lenguaje de comando para coordinar el comportamiento de la población bacteriana y así permite activar la expresión de genes relacionados con los mecanismos de resistencia (Morten *et al.*, 2003) El mecanismo de QS es de gran importancia para adquirir resistencia frente a los antimicrobianos y su producción es inducida por la molécula N-acil Homoserina Lactona (AHL) muy relacionada con los genes de resistencia en bacterias Gram-negativas (Steindler *et al.*, 2009) y como sistema de comunicación a través de la producción de moléculas auto inductoras las cuales en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* regulan la expresión de los genes que controlan la producción de factores de virulencia (Luo *et al.*, 2017), tales como una matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas, biopelículas, flagelos y pili (Lujan, 2014). De hecho, la regulación de la transcripción de la mayoría de los genes de virulencia en *P. aeruginosa*, está controlada por dos sistemas de QS dependientes de AHL conocidos como LasI y RhlII (Pearson *et al.*, 2000; Steindler, *et al.*, 2009). Estos dos sistemas a la vez están controlados por diferentes moléculas reguladoras que permite la respuesta del QS y su modulación a través de estímulos ambientales (Steindler, *et al.*, 2009). Es importante considerar, además, que el control de las infecciones microbianas por inhibición del crecimiento o formación de QS es la base actual de la quimioterapia antimicrobiana. Sin embargo, se debe tener precaución con el desarrollo de multirresistencia (Duran *et al.*, 2010).

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo que posee gran versatilidad metabólica, está catalogado como el principal agente nosocomial en la actualidad, es patógeno oportunista, causante del aumento de morbilidad y mortalidad de pacientes inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas a nivel mundial (Hancock y Speert, 2000). En Europa, se ha detectado su presencia en ambientes intrahospitalarios, principalmente en unidades de cuidados intensivos (UCI) además, en pacientes que adquieren neumonía o infecciones en el tracto urinario, durante la atención médica (ECDC, 2018). *P. aeruginosa* se encuentra en el listado “patógenos prioritarios” publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2017 junto con otras enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores como *Acinetobacter baumannii*. El listado incluye las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, con el fin de promover la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos además de alertar al mundo acerca de la amenaza que las bacterias Gram negativas tienen gracias a su multirresistencia.

En febrero de 2019, la OMS informó sobre un brote epidémico, asociado al turismo médico en centros de salud en Tijuana, México, allí, se realizaron procedimientos quirúrgicos invasivos donde se notificaron 20 casos de pacientes infectados con *P. aeruginosa* multirresistente, de los cuales,

16 de ellos fueron confirmados y 4 sospechosos (OMS, 2019). En Colombia, según el estudio realizado por el sistema de vigilancia para el control de resistencia bacteriana de Bogotá (GREBO), *P. aeruginosa* ha presentado resistencia mayor al 30% frente a varios grupos de antibióticos y una frecuencia de cepas multirresistentes entre 16-24%; además de la identificación de esta bacteria en 9.905 aislamientos en pacientes que se encontraban en unidades de cuidado intensivo (UCI) (Álvarez *et al.*, 2006). La principal preocupación es la amplia gama de antimicrobianos a los cuales es resistente, debido a la baja permeabilidad de la membrana externa de la célula, haciendo que la velocidad con la que ingresan las moléculas antibióticas sea limitada, retardando la acción biocida (Breidenstein *et al.*, 2011). Entre los grupos de antibióticos a los cuales presentan mayor resistencia están los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y β -lactámicos. Para el periodo 2005-2009, *P. aeruginosa* mostró una resistencia general a aztreonam, cefepima, ceftazidima, imipenem, meropenem y piperacilina/tazobactam de 31.8%, 23.9%, 23.8%, 24.8%, 22.5%, 20.3% y 22.3%, respectivamente (Villa *et al.*, 2013). Ovalle *et al.* (2017) en su estudio de vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en infecciones asociadas a la atención de salud en Colombia para el periodo 2012-2014, reportaron que la resistencia a carbapenémicos en unidades de cuidados intensivos para *P. aeruginosa* presentaron porcentajes bajos (38,8 %) en comparación con la resistencia de bacterias como *Acinetobacter baumannii* que superó el 50%. Gómez y Sánchez, (2018) describieron el perfil microbiológico y de resistencia bacteriana para muestras cultivadas provenientes de pacientes de cuidado intensivo en la ciudad de Pereira, encontrando que *P. aeruginosa* presentó sensibilidades mayores al 70% para carbapenémicos y tobramicina, así como una alta prevalencia en la resistencia para ceftazidima, cefepima y piperacilina/tazobactam con 60%, 60% y 50% respectivamente.

Chromobacterium violaceum (Taganna *et al.*, 2011) es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, produce un metabolito secundario con acción antibiótica que se relaciona con el aumento en la producción de exopolisacáridos (Duran *et al.*, 2010), los cuales confieren mayor resistencia y por ende, un aumento en la capacidad de sobrevivencia. El pigmento producido por este microorganismo es conocido como violaceína, el cual, confiere a la colonia una pigmentación violeta o morado (Pitlovanciv *et al.*, 2006) y, a pesar de no ser esencial para el crecimiento y supervivencia de la bacteria se ha encontrado un gran potencial no sólo para estudios de QS, sino también, como cepa biosensora por la variedad de actividades biológicas que posee (Kothari *et al.*, 2017).

Se ha reportado la actividad anti proliferativa de la violaceína contra líneas celulares de cáncer y la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus* (Hashimi *et al.*, 2015) e inclusive una gran capacidad antioxidante que podría aumentar el factor de protección solar (FPS) en los protectores solares comerciales (Suryawanshi, *et al.* 2015) además del gran interés del uso biotecnológico de este pigmento para aplicaciones en medicina, agricultura y descontaminación ambiental (Carepo *et al.*, 2014). Perpetuo *et al.*, (2009) y Narayanan *et al.*, (2012) han relacionado esta especie con la biodegradación de fenoles, tema de gran importancia en la investigación ambiental debido al riesgo que representa para el medio ambiente y la salud humana. Las investigaciones actuales se han enfocado en estudiar la regulación del mecanismo QS mediante pruebas con organismos biosensores como *C. violaceum* (Taganna *et al.*, 2011)

Las plantas presentan una extraordinaria habilidad de sintetizar compuestos químicos como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros (Castillo *et al.*, 2014), lo

que ha permitido su uso terapéutico durante miles de años, guiando al descubrimiento de nuevos medicamentos (Saleh y Van, 2018). Frente al uso de las plantas es importante destacar que, desde finales del siglo XVIII la botánica científica sentó las bases de la terapéutica farmacológica, estableciendo que, para encontrar sustancias en las plantas, optimizar sus propiedades y rendimiento terapéutico es necesario caracterizar muy bien la especie botánica, identificar sus principios activos y extraerlos para modificarlos químicamente hasta la obtención de moléculas terapéuticas en el laboratorio. En cuanto al uso de plantas para combatir la resistencia a los antimicrobianos Araruna *et al.* (2013) propusieron que los productos naturales derivados de plantas pueden ser una alternativa debido a la compleja composición química de los metabolitos secundarios que éstos poseen, así como en el estudio de Azuero *et. al* (2016), donde evaluaron el potencial antibacteriano de doce plantas medicinales de uso ancestral frente a una cepa ATCC de *P. aeruginosa* con genes de resistencia a antibacterianos y cepas certificadas ATCC de *Escherichia coli* y *S. aureus*, encontrando que diez de los doce extractos evaluados poseen una acción bactericida frente a todas las cepas evaluadas.

Las Piperáceas son plantas con relevancia etnofarmacológica, debido a su gran cantidad de usos en medicina tradicional, ya que se les atribuye capacidad antibacteriana, (Saleh y Van, 2018; Azuero *et al.*, 2016; Mgbeahuruike *et al.*, 2017) anticancerígena, antiinflamatoria, antimicótica, antidiabética, antiulcerosa, anti protozoaria e insecticida, entre otras (Durant *et al.*, 2018). Esta familia de plantas comprende hierbas, arbustos e incluso árboles, distribuidas principalmente en las zonas tropicales, con 12 géneros y alrededor de 1300 especies, de las cuales 700 corresponden al género *Piper* (Novara, 2000). Se caracterizan por tener valiosos compuestos naturales a partir de los cuales se han logrado obtener hidrocarburos, fenilpropanos, lignanos, flavonas, isobutilamidas, alcaloides, epóxidos y aceites esenciales con actividad no solo antimicrobiana, sino también como anticonceptivas y oxitócicas (Calle, 1983).

En Colombia, el género *Piper* cuenta 415 especies reportadas las cuales se encuentran desde el nivel del mar hasta 3000 m.s.n.m. (Bernal *et al.*, 2019). Se ha estudiado el potencial fito farmacológico de estas plantas, dando resultados positivos para microorganismos como bacterias, hongos y parásitos. En cuanto a la actividad antibacteriana y antifúngica Sanabria *et al.* (1998) encontraron que *Piper aduncum* y *Piper bogotensis* CDC inhiben el crecimiento de cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Bacillus subtilis* a una concentración de 3 mg/mL de extractos etanólicos así como también en el estudio de López *et al*, (2001) determinaron que *P. lanceaefolium* presenta actividad antimicrobiana frente a cepas de *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *B. subtilis* y *S. aureus*.

En el estudio de Mesa *et al*, (2007) encontraron que 10 aceites esenciales provenientes de *Piper sanctifelisis*, *Piper auritum* Kunth, *P. auduncum*, *Piper spp*, *Piper bogotense*, *Piper michita*, *Piper friedestalina*, y *Piper brachypodom* presentaron actividad in vitro anti-*Candida* y anti-*Aspergillus* donde el aceite esencial con mayor actividad fue el de *P. sanctifelisis* para *Candida krusei* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/mL. En el estudio de Pino, (2008) se evaluó la actividad antimicrobiana de 6 especies del género *Piper*, frente a microorganismos de interés clínico humano encontrando que los extractos etanólicos de las hojas de *P. tricuspe*, *P. gorgonillense* y *P. hispidum* causaron la mayor inhibición frente a *B. subtilis* y *S. aureus*. Para el caso de la evaluación antimicrobiana para *P. aeruginosa* ATCC 27853, Vallejo *et al*, (2014) encontraron que los extractos dicloro metánicos de *Piper pesaresanum*, *Piper daniel-gonzalezii*, *Piper glanduligerum*, *Piper crassinervium*, *Piper umbellatum*, *Piper crassinervium*, *Peperomia*

acuminata, inhibieron su crecimiento, además relacionaron la presencia de alcaloides y flavonoides en estas plantas como los principales responsables de la actividad antibacteriana de dichas especies.

Patiño *et al.*, (2018) establecieron que *Piper asperiusculum* y *Piper pertomentellum* poseen actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum f. sp. Passiflorae* y *Colletotrichum tamarilloi*, asociada a la presencia de flavonoides, fenoles, terpenos y esteroides en los perfiles fitoquímicos de los extractos. Frente a la actividad antiparasitaria por parte de extractos de plantas se encontraron los estudios de Garavito *et al.* (2006) donde reportaron actividad de extractos etanólicos de *Piper cumanense kunth* y *Piper holtoni* C.D.C. frente a *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina (FcB2), resultado de importancia para la lucha contra la malaria y García, *et al.* (2018) determinaron que los extractos y fracciones de *P. jericuense* tienen una alta actividad contra *Trypanosoma cruzi*.

Es importante además considerar las interacciones sinérgicas que algunos antimicrobianos a base de extractos de plantas con antibióticos desarrollan para evitar la resistencia bacteriana (Ayaza *et al.*, 2019). Un ejemplo de esto, es la acción que tienen el Conessine, un fitoquímico presente principalmente en extractos de plantas de la familia Apocynaceae, en la inhibición de las bombas de flujo que se encuentran en la membrana de *P. aeruginosa* multirresistente y que no permiten el ingreso de los agentes antibióticos, gracias a su acción se restableció la acción antibiótica de agentes como la cefotaxima, novobiocina, eritromicina, entre otros (Siriyoung *et al.*, 2017).

Algunos de los medicamentos clásicos derivados de plantas, son la digoxina (para el corazón), la vinca (antitumoral), la ergotamina (frente a la migraña), la pilocarpina (para el glaucoma), la efedrina (indicada en problemas respiratorios) y la atropina (en anestesia) (Domínguez-Gil, A. y Martín A., 2004).

El presente estudio se enfoca en la búsqueda de actividad de inhibición en bacterias patógenas multirresistentes por parte de extractos de plantas del género *Piper*. Se determinó cuales de los 48 extractos etanólicos provenientes de diferentes partes de plantas (raíz, hojas, tallos e inflorescencias) pertenecientes a 22 morfoespecies del género *Piper* presentan actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA 047 y ATCC 27853 y anti QS en *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.

II. Materiales y métodos

El estudio determinó la actividad antimicrobiana y anti QS en 48 extractos etanólicos obtenidos a partir de diferentes partes como: tallos, hojas, cristal presente en las hojas, raíces e inflorescencias provenientes de 22 morfoespecies vegetales del género *Piper*. La tabla 1 incluye el listado de las morfoespecies evaluadas y la parte de la planta a la que corresponde cada uno.

Tabla 1. Listado de morfoespecies, extractos y partes de las plantas del género *Piper* utilizadas en el estudio.

Morfoespecie	Extracto							
	H	I	F	T	C	S	R	TD
<i>Piper sp 1</i>	x	x		x				
<i>Piper sp 2</i>	x							
<i>Piper sp 3</i>	x	x		x				x
<i>Piper sp 4</i>	x	x						
<i>Piper sp 5</i>	x			x				
<i>Piper sp 6</i>		x						
<i>Piper sp 7</i>	x	x		x				
<i>Piper sp 8</i>	x		x					
<i>Piper sp 9</i>	x	x		x				
<i>Piper sp 10</i>	x							
<i>Piper sp 11</i>	x	x						
<i>Piper sp 12</i>	x							
<i>Piper sp 13</i>	x	x		x				
<i>Piper sp 14</i>	x							
<i>Piper sp 15</i>	x	x	x	x				
<i>Piper sp 16</i>	x			x			x	
<i>Piper sp 17</i>		x			x	x		
<i>Piper sp 18</i>		x		x				
<i>Piper sp 19</i>	x	x		x				
<i>Piper sp 20</i>	x							
<i>Piper sp 21</i>				x				
<i>Piper sp 22</i>				x				x

H: hojas, **I:** inflorescencia, **F:** flor, **T:** tallo, **C:** cristal de las hojas, **S:** semilla, **R:** raíz, **TD:** toda (hojas, inflorescencia y tallo)

Preparación de los extractos

El método de extracción se realizó a partir de la percolación del material vegetal seco y molido cubierto con etanol al 96% para posteriormente concentrar la solución en un rotavapor IKA RV10 (González, 2004; Sanabria, 1983). Para el método de siembra en pozo se preparó una concentración de 60 mg/mL de cada extracto disuelto en Dimetil sulfóxido (DMSO).

Cepas de trabajo

Las cepas de trabajo utilizadas para la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos, así como la inhibición de QS fueron *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA 047 debido a su capacidad metabólica y a la presencia de plásmidos de resistencia (Crabbe *et al*, 2010) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la cual también posee características de multirresistencia y es utilizada comercialmente para pruebas de inhibición (Ficha técnica ATCC,2018). *C. violaceum* ATCC 12472 se ha empleado como modelo biológico para estudios de QS, debido a que la producción de violaceína es fácilmente detectable y cuantificable (Kothari *et al.*, 2017).

Mantenimiento de las cepas.

La reactivación de las bacterias se realizó a partir de viales comerciales certificados como cepas ATCC, los cuales fueron mantenidos a -20°C según las recomendaciones del fabricante. El banco de trabajo se mantuvo a 4°C con glicerol al 1% utilizando caldo Brain Heart Infusion (BHI) para *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* ATCC BAA 047 y caldo Luria Bertani para *C. violaceum* ATCC 12472. Las cepas se cultivaron en cajas de Petri con agar cetrimide para el caso de las dos cepas de *P. aeruginosa* a 37 °C y agar Luria Bertani a 30°C para *C. violaceum*.

Curva de crecimiento y producción de violaceína para *C. violaceum*

Con el fin de determinar la curva de crecimiento y el tiempo de inicio para la producción de violaceína en *C. violaceum*, se partió de una colonia separada incubada previamente durante 4 horas a 30°C en agar LB. La lectura inicial de células presentes (T_0) se determinó por densidad óptica a 600 nm; se sembraron 108 tubos en caldo LB, se incubaron a 30°C en agitación constante a 180 rpm midiendo absorbancias a 600 nm para la determinación del crecimiento celular y a 585 nm para producción de violaceína durante 36 horas. Las lecturas se realizaron cada hora determinando la cantidad de células presentes y la violaceína producida. Todas las mediciones se realizaron por triplicado leyendo en un espectrofotómetro Mapada UV-3200PCS® y descartando los tubos después de las mediciones para evitar contaminaciones cruzadas.

Para la extracción de la violaceína, se centrifugó 1 mL del cultivo a 10 000 rpm durante 15 min en una microcentrífuga SCIOLOGEX D2012® plus y se desechó el sobrenadante. Luego se solubilizó la violaceína en 1 mL de DMSO y se sometió a agitación en un vórtex durante 2 min, dejando reposar durante 30 min y se centrifugó nuevamente (10 000 rpm durante 15 min). Se tomaron 500 µL del sobrenadante y se midió la absorbancia a 585 nm (Taganna *et al.*, 2011).

Preparación de inóculos para determinación de actividad antimicrobiana

Para *P. aeruginosa* ATCC BAA 047 y ATCC 27853 se partió de cultivos en agar cetrímide previamente incubados a 37 °C y para *C. violaceum* ATCC 12472 se tomó el inóculo a partir de un cultivo en agar LB incubado previamente a 30 °C. Se realizaron suspensiones en solución salina ajustando la absorbancia entre 0.08-0.1 a 625 nm para *P. aeruginosa* y 600 nm para *C. violaceum*. Los valores de absorbancia equivalen a 1×10^8 UFC/mL (Sánchez, L. & Corrales L., 2005; Okafor, N., 1911)

Técnica de siembra en pozo para determinación de actividad antimicrobiana y anti QS

Las determinaciones de actividad antimicrobiana y anti QS se realizaron usando la técnica de siembra en pozo. Las perforaciones de los pozos se realizaron en cajas de Petri en medio sólido, con ayuda de una pipeta Pasteur previamente esterilizada y con ayuda de una microespátula se realizó la remoción del agar sobrante. Posteriormente, se adicionaron 15 µL del medio en cada perforación y se dejó solidificar, para luego sembrar el inóculo previamente preparado a una concentración de 1×10^8 UFC/mL con un hisopo estéril. Pasados 5 minutos de la siembra se agregó 20 µL de cada extracto en los pozos y se dejó por media hora hasta su completa difusión. Posterior a la incubación, se midieron los halos de actividad antimicrobiana y anti QS. El halo de actividad antimicrobiana corresponde a aquel donde no se presenta crecimiento bacteriano y es considerado como positivo un valor \geq a 10 mm.

El halo anti QS se observa únicamente cuando hay producción de pigmento violeta por parte de la cepa biosensora *C. violaceum* y corresponde a aquel donde se presenta crecimiento bacteriano, pero no se visualiza la producción de violaceína. Para considerarse positivo el halo debe ser \geq a 10 mm (Rahman, *et al*, 2015). Todos los ensayos de actividad antimicrobiana y anti QS se realizaron por triplicado empleando como control positivo gentamicina 2 mg/mL y control negativo DMSO (CLSI, 2017).

Determinación de actividad antimicrobiana en *P. aeruginosa*

Para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos frente a *P. aeruginosa* ATCC BAA 047 y ATCC 27853 se utilizó la técnica de siembra en pozo descrita anteriormente utilizando agar Mueller Hunton (MH) a 37 °C midiendo los halos a las 24 h.

Determinación de actividad antimicrobiana e inhibición de QS en *C. violaceum*

En el caso de *C. violaceum* también se utilizó la técnica de siembra en pozo (CLSI, 2017) en agar Luria Bertani (LB) incubando a 30°C durante 24 horas para medir halos de actividad antimicrobiana y durante el tiempo determinado para la producción máxima de violaceína para la medición de actividad anti QS de acuerdo con lo descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Para el procesamiento de datos se utilizó el software estadístico R y para el diseño de gráficas Graphpad Prism 5. Para determinar el porcentaje de inhibición de cada extracto se utilizó la fórmula 1.

$$\%Inhibición = \left(\frac{\varnothing \text{ halo extracto} - \varnothing \text{ halo control negativo}}{\varnothing \text{ halo control positivo} - \varnothing \text{ halo control negativo}} \right) \times 100$$

\varnothing : diámetro del halo

Fórmula 1. Fuente: Corzo, 2012

III. Resultados

Curva de crecimiento y producción de violaceína para *C. violaceum*

En la curva de crecimiento de *C. violaceum* ATCC 12472 (figura 1A), muestra que la fase de acondicionamiento de la bacteria prolongó hasta la hora 2, donde inmediatamente se inició la fase exponencial hasta la hora 18; a partir de este momento la bacteria entró fase estacionaria, la cual se mantuvo durante 10 horas. En la hora 28 comenzó fase de muerte. Estos resultados coinciden con los reportados por Pitlovanciv *et. al.*, (2006) quienes estudiaron las condiciones de cultivo y producción de pigmentos de *C. violaceum*.

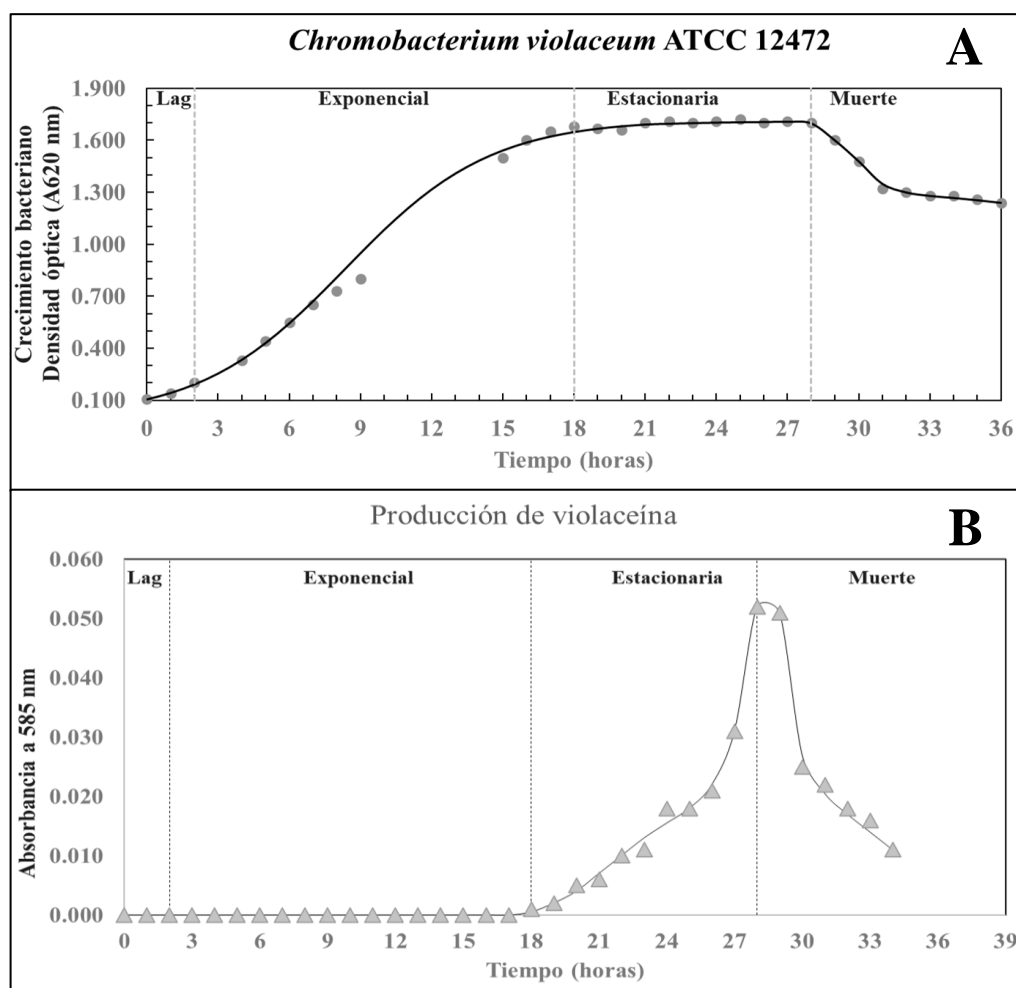


Figura 1. A. Curva de crecimiento de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 **B.** Curva de producción de violaceína por *C. violaceum* ATCC 12472

Teniendo en cuenta que la determinación de la inhibición del QS por parte de *C. violaceum*, está directamente relacionada con la producción del pigmento violaceína (Durán et al., 2016), se cuantificó la producción de este metabolito, encontrando que su síntesis inicia cuando la bacteria se encuentra arrancando su fase estacionaria, en la hora 18, donde además, alcanza la mayor

densidad poblacional; el pico de producción para la violaceína se presenta al inicio de la fase de muerte, es decir entre la hora 28-29 (figura 1b).

Resultados técnica de siembra en pozo

La figura 2 evidencia la actividad antimicrobiana de *Piper* sp 19 (tallos) frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 (figura 2A) y *P. aeruginosa* ATCC BAA 047 (figura 2B) El círculo azul indica el halo obtenido en cada uno de los casos.

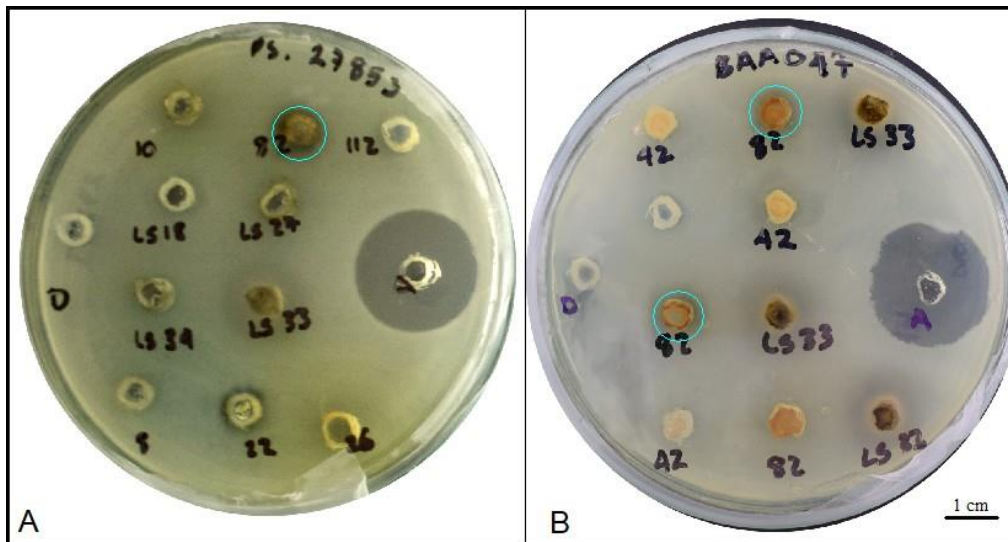


Figura 2. A. Extracto de tallos de *Piper* sp 19 activo frente a *P. aeruginosa* 27853 con un halo de 11 mm B. Extracto de tallos de *Piper* sp 19 activo frente a *P. aeruginosa* BAA047 con un halo de 10 mm (B).

La figura 3 visualiza los halos producidos por *Piper* sp 19 frente a *C. violaceum* ATCC 12472 en cuanto a la actividad antimicrobiana (azul) y actividad de inhibición del mecanismo QS (color rojo).

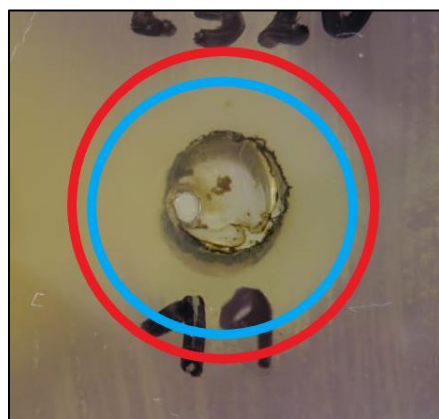


Figura 3. Halos de actividad antimicrobiana en color azul y halo de inhibición de QS halo rojo para el extracto de inflorescencias de Sp 19.

La tabla 2 muestra el consolidado de las pruebas de actividad antimicrobiana por parte de los morfoespecies y extractos evaluados frente a *P. aeruginosa* ATCC BAA 047 y *P. aeruginosa*

ATCC 27853. En el caso de *C. violaceum* ATCC 12472 se indican la inhibición microbiana y la inhibición en la formación de QS.

Tabla 2. Resultados de la actividad antimicrobiana y anti QS para las morfoespecies evaluadas

Morfoespecie	Extracto	<i>P. aeruginosa</i> BAA 047	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>C. violaceum</i> 12472. Inhibición de Crecimiento	<i>C. violaceum</i> 12472. Inhibición de QS
Piper sp 1	Hojas	No activo	No activo	Activo	Activo
	Inflorescencias	Activo	Activo	Activo	Activo
	Tallos	Activo	Activo	Activo	Activo
Piper sp 3	Inflorescencias	No activo	Activo	Activo	Activo
Piper sp 4	Inflorescencia	No activo	No activo	Activo	Activo
Piper sp 5	Hojas	Activo	Activo	No activo	Activo
	Tallos	Activo	No activo	No activo	Activo
Piper sp 6	Inflorescencias	No activo	No activo	No activo	Activo
Piper sp 8	Hojas	Activo	No activo	Activo	Activo
Piper sp 9	Hojas	No activo	No activo	Activo	Activo
	Inflorescencia	No activo	No activo	No activo	Activo
Piper sp 11	Hojas	No activo	Activo	No activo	No activo
	Inflorescencias	No activo	No activo	Activo	Activo
Piper sp 12	Hojas	No activo	No activo	Activo	Activo
Piper sp 13	Hojas	No activo	No activo	Activo	Activo
	Tallos	Activo	No activo	No activo	Activo
	Inflorescencia	Activo	Activo	No activo	Activo
Piper sp 15	Tallos	No activo	Activo	No activo	No activo
	Inflorescencia	Activo	No activo	No activo	No activo
Piper sp 16	Flores	No activo	No activo	Activo	Activo
	Hojas	No activo	No activo	No activo	Activo
	Tallos	No activo	Activo	Activo	Activo
Piper sp 17	Cristal de hojas	Activo	No activo	No activo	No activo
Piper sp 18	Tallos	No activo	Activo	No activo	No activo
Piper sp 19	Inflorescencia	Activo	Activo	Activo	Activo
	Tallos	Activo	Activo	No activo	No activo
Piper sp 22	Toda	Activo	No activo	Activo	Activo

Activo corresponde al valor promedio de los halos ≥ 10 mm y para la actividad anti QS la visualización del halo

Determinación de actividad antimicrobiana en *P. aeruginosa*

De las 22 morfoespecies evaluadas únicamente *Piper* sp 1 con extractos provenientes de inflorescencias y tallos y *Piper* sp 19 con extracto proveniente de inflorescencias, presentaron inhibición de crecimiento frente a *P. aeruginosa* BAA 047 y ATCC-27853 e inhibición de crecimiento y anti QS para *C. violaceum* ATCC 12472. La tabla 3 muestra los promedios y desviación estándar calculados a partir de los resultados obtenidos para los extractos que presentaron inhibición de crecimiento frente a las cepas de *P. aeruginosa* BAA 047 y 27853.

Cabe destacar que *Piper* sp 1 (inflorescencias y tallos), *Piper* sp 5 (hojas), *Piper* sp 13 (inflorescencias) y *Piper* sp 19 (tallos) presentaron inhibición de crecimiento frente a las dos cepas de *P. aeruginosa* ATCC-BAA047 y ATCC-27853.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana mostrada por extractos vegetales de *Piper* frente a las cepas *P. aeruginosa* BAA 047 y 27853 evaluadas.

Morfoespecie	Extracto	<i>P. aeruginosa</i> BAA 047 (halos en mm)	<i>P. aeruginosa</i> 27853 (halos en mm)
<i>Piper</i> sp 1	Inflorescencias	10 ± 2	10 ± 1
	Tallos	11.5 ± 1.5	10.1 ± 0.2
<i>Piper</i> sp 3	Inflorescencias	-	10.5 ± 0.7
<i>Piper</i> sp 5	Hojas	13.2 ± 0.5	10.3 ± 0.5
	Tallos	12.8 ± 1.7	-
<i>Piper</i> sp 8	Hojas	11 ± 0	8.2 ± 0.8
<i>Piper</i> sp 11	Hojas	7.3 ± 1	10 ± 1
<i>Piper</i> sp 13	Tallos	10 ± 2	-
	Inflorescencia	10 ± 0.5	10 ± 0.7
<i>Piper</i> sp 15	Tallos	-	10 ± 2
	Inflorescencia	10.3 ± 2	-
<i>Piper</i> sp 16	Tallos	-	10.6 ± 0.5
<i>Piper</i> sp 17	Cristal	10 ± 2	-
<i>Piper</i> sp 18	Tallos	9 ± 0	10.3 ± 0.5
<i>Piper</i> sp 19	Inflorescencia	10 ± 1.5	10.6 ± 0.5
	Tallos	12.1 ± 1	11.3 ± 1
<i>Piper</i> sp 22	Toda	11.2 ± 1	8.6 ± 0.5
Gentamicina	2 mg/mL	29 ± 0	28 ± 0.5
DMSO	Puro	-	-

DMSO: Dimetilsulfóxido. Promedio de diámetro del halo de inhibición, mm y desviación estándar. * Los valores resaltados corresponden a las morfoespecies con resultados positivos para las dos cepas bacterianas evaluadas.

Para *P. aeruginosa* ATCC-BAA047 los extractos que presentaron actividad antimicrobiana fueron: *Piper* sp 5 (Tallos), *Piper* sp 8 (hojas), *Piper* sp 13 (tallos), *Piper* sp 15 (inflorescencias) *Piper* sp 17 (Cristal de las hojas) y *Piper* sp 22 (toda la planta). En cuanto a la actividad antimicrobiana frente a la cepa *P. aeruginosa* ATCC-27853 (tabla 2), *Piper* sp 11 (hojas), *Piper* sp 16 (tallos) y *Piper* sp 18 (tallos) generando halos \geq a 10 mm.

Determinación de actividad antimicrobiana e inhibición de QS en *C. violaceum*

La inhibición del crecimiento y anti QS para la cepa biosensora *C. violaceum* ATCC-12472 se muestra en la tabla 4. Las morfoespecies que inhibieron el crecimiento bacteriano y el sistema de QS fueron *Piper* sp 1 (tallos, inflorescencias y hojas), *Piper* sp 3 (inflorescencias), *Piper* sp 4 (inflorescencias), *Piper* sp 8 (hojas), *Piper* sp 9 (hojas), *Piper* sp 11 (inflorescencias), *Piper* sp 12 (hojas), *Piper* sp 13 (hojas), *Piper* sp 15 (flores), *Piper* sp 16 (tallos), *Piper* sp 19 (inflorescencias) y *Piper* sp 22 (toda la planta).

Tabla 4. Actividad de inhibición del QS frente a *C. violaceum* 12472 de los extractos etanólicos de las morfoespecies de *Piper* evaluadas

Morfoespecie	Partes	Inhibición de Crecimiento (halos en mm)	Inhibición de QS (halos en mm)
<i>Piper</i> sp 1	Hojas	12 ± 2	14 ± 2
	Inflorescencias	14 ± 2	17 ± 2
	Tallos	17 ± 1	19 ± 2
<i>Piper</i> sp 3	Inflorescencias	11 ± 2	14 ± 1
<i>Piper</i> sp 4	Inflorescencia	10 ± 1	19 ± 2
<i>Piper</i> sp 5	Hojas	9 ± 1	11 ± 0
	Tallos	9 ± 1	11 ± 1
<i>Piper</i> sp 6	Inflorescencias	9 ± 1	10 ± 1
<i>Piper</i> sp 8	Hojas	10 ± 1	10 ± 1
<i>Piper</i> sp 9	Hojas	10 ± 1	12 ± 1
	Inflorescencia	9 ± 1	10 ± 1
<i>Piper</i> sp 11	Inflorescencias	10 ± 1	12 ± 0
<i>Piper</i> sp 12	Hojas	10 ± 2	12 ± 0
<i>Piper</i> sp 13	Hojas	10 ± 0	21 ± 1
	Tallos	9 ± 3	11 ± 3
	Inflorescencia	9 ± 2	14 ± 1
<i>Piper</i> sp 15	Flores	19 ± 1	21 ± 0
<i>Piper</i> sp 16	Hojas	8 ± 1	13 ± 2
	Tallos	10 ± 1	11 ± 2
<i>Piper</i> sp 19	Inflorescencias	13 ± 2	14 ± 1
<i>Piper</i> sp 22	Toda	16 ± 1	19 ± 1
Gentamicina	2 mg/mL	26.5 ± 0.5	-
DMSO	Puro	-	-

DMSO: Dimetilsulfóxido. Promedio de diámetro del halo de inhibición, mm y desviación estándar. * Los valores resaltados corresponden a las morfoespecies con resultados positivos para inhibición de crecimiento y QS.

En cuanto a inhibición de la actividad de QS únicamente *Piper* sp 5 (hojas y tallos), *Piper* sp 9 (inflorescencias), *Piper* sp 13 (inflorescencias y tallos) y *Piper* sp 16 (hojas) presentaron halos externos.

Análisis actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* y *C. violaceum*

La figura 4 consolida los resultados para los porcentajes de inhibición de crecimiento de las morfoespecies con respecto al extracto y las cepas evaluadas. La 4A corresponde a *P. aeruginosa* ATCC- BAA 047, la 4B a *P. aeruginosa* ATCC-27853 y la 4C frente a *C. violaceum* ATCC 12472.

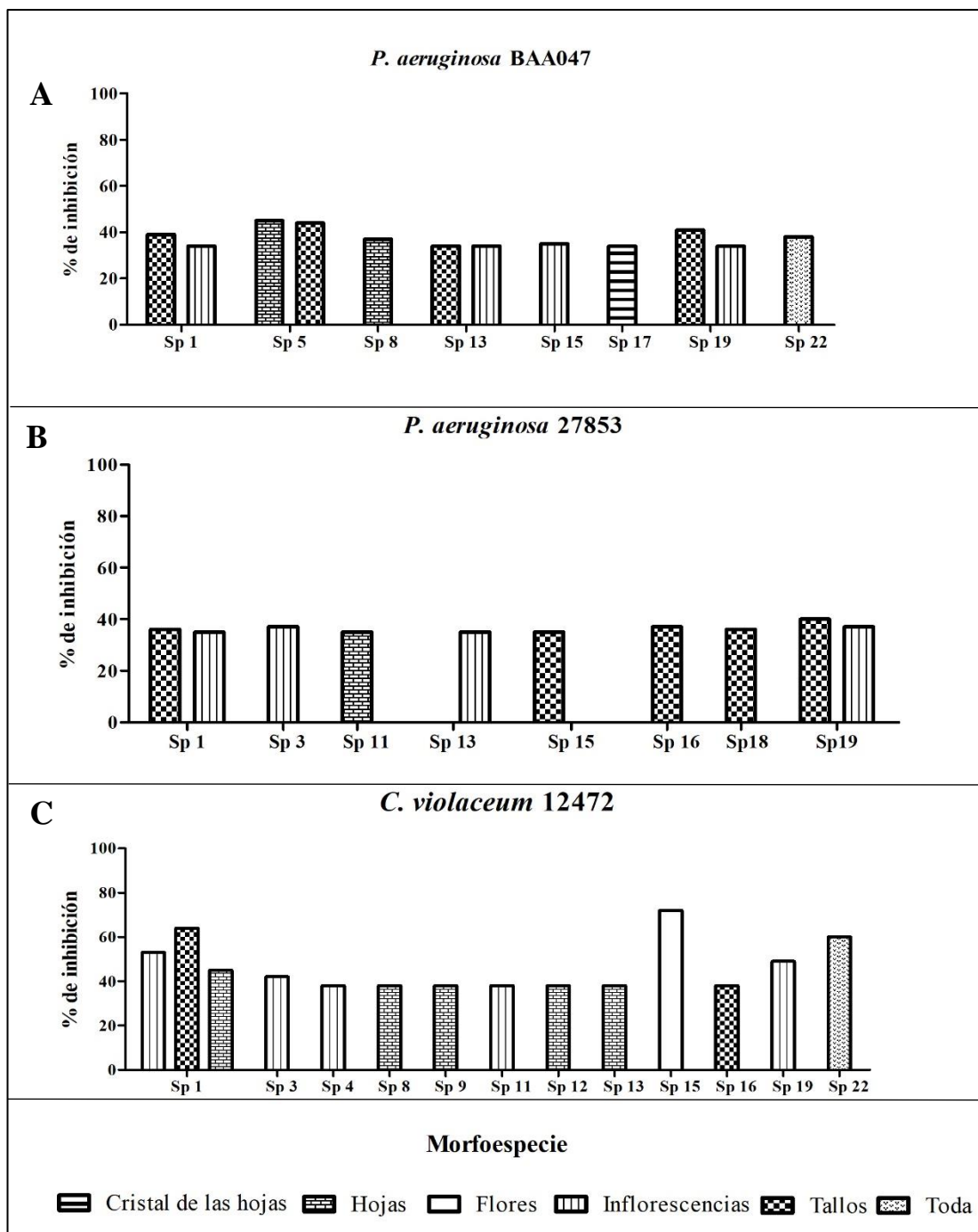


Figura 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano de los diferentes extractos activos frente a *P. aeruginosa* ATCC BAA 047 y ATCC v27853 y *C. violaceum* ATCC 12472

Para *P. aeruginosa* BAA 047 los extractos de tallos y hojas de Sp 5 presentaron una inhibición de 44% y 45% respectivamente, seguido por los tallos e inflorescencias de Sp 19 cuya inhibición fue de 41% y 34%. En cuanto a los demás extractos se obtuvieron porcentaje del 39% para sp 1, sp 22 con 38%, sp 8 con 37%, sp 15 con 35% y los demás extractos (sp 1 (inflorescencias), sp 13 (tallos

e inflorescencias), sp 17 (cristal de hojas) sp 19 (inflorescencias)) con porcentajes del 34% que equivale a halos de 10 mm.

Frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 los extractos de tallos e inflorescencias de Sp 19 presentaron valores de 40% y 37% respectivamente, sp 3 (inflorescencias) y sp 16 (tallos) con un 37% en los dos casos; los valores obtenidos para los tallos e inflorescencias de Sp 1 estuvieron entre 35-36%.

En cuanto a la actividad antimicrobiana para *C violaceum* las morfoespecies que inhibieron el crecimiento fueron: *Piper* sp 15 (72% flores), *Piper* sp 1 (tallos 64%, inflorescencias 53% y hojas 45%), *Piper* sp 19 (49% inflorescencias), *Piper* sp 3 (inflorescencias 42%). Para *Piper* sp 16 (tallos), *Piper* sp 13 (hojas), *Piper* sp 12 (hojas), *Piper* sp 11 (inflorescencias), *Piper* sp 9 (hojas), *Piper* sp 8 (hojas) y *Piper* sp 4 (inflorescencias) corresponden al 38%.

Frente a la actividad de inhibición de QS para *C violaceum* ATCC 12472 los extractos que formaron halo de inhibición fueron: *Piper* sp 1 (tallos, inflorescencias y hojas), *Piper* sp 3 (inflorescencias), *Piper* sp 4 (inflorescencias), *Piper* sp 5 (hojas y tallos), *Piper* sp 6 (inflorescencias), *Piper* sp 8 (hojas), *Piper* sp 9 (hojas e inflorescencias), *Piper* sp 11 (inflorescencias), *Piper* sp 12 (hojas), *Piper* sp 13 (hojas, tallos e inflorescencias), *Piper* sp 15 (flores), *Piper* sp 16 (tallos y hojas), *Piper* sp 19 (inflorescencias) y *Piper* sp 22 (toda la planta).

IV. Discusión de resultados

Desde el conocimiento ancestral, la medicina popular ha utilizado las plantas y sus propiedades curativas para el tratamiento de diversas infecciones y procesos inflamatorios que se presentan en países intertropicales (Durant et al., 2018) desencadenando investigaciones enfocadas al desarrollo de medicamentos comerciales, entre los que se destacan ciertos antibióticos, corticoides y antitumorales, además de la aspirina y la morfina (Gil Hurlé & Martín, 2019) los cuales, han sido distribuidos de manera efectiva mundialmente.

Los mecanismos de acción de los extractos de plantas sobre los microorganismos, se asocian con la sobrecarga de compuestos químicos en la membrana celular de éstos y determina la pérdida de control e integridad de la célula (Shiva, C., 2007); la presencia de compuestos como alcaloides, flavonoides, taninos, y otros de naturaleza fenólica son los encargados de la actividad antimicrobiana en las plantas superiores (Rodríguez *et al.*, 2017 Mahomoodally *et al.*, 2005). La principal preocupación es la amplia gama de antimicrobianos a los cuales los microorganismos son resistentes, debido a la baja permeabilidad de la membrana externa de la célula, haciendo que la velocidad con la que ingresan las moléculas antibióticas sea limitada, retardando la acción biocida (Breidenstein *et al.*, 2011).

En cuanto a los mecanismos de comunicación poblacional presentes en las bacterias, el sistema QS funciona de forma similar independientemente de que la bacteria sea Gram positiva o Gram negativa (NG & Bassler, 2009). Para *P. aeruginosa* los genes inductores de dicho mecanismo son LasI/R y RhlI/R, los cuales se activan a través de enzimas que poseen moléculas auto inductoras AHL y compuestos tales como L/D-S-adenosilhomocisteína, sinefungina y butiril-SAM han demostrado ser capaces de inactivar dichos genes al sustituir estas moléculas (Rasmussen & Givskov, 2006). En el caso de *C. violaceum* se activa mediante la expresión de los genes *cvrI* y *cvrII*, que regulan la producción de AHL y violaceína (Durán et al., 2016) además de la relación directa con la densidad celular (DC) (Kothari et al., 2017); cuando aumenta la DC, la producción de AHL también aumenta y se acumula gracias a la formación del complejo AHL: *cvrI* (Kothari et al., 2017). En este caso, para la cepa *C. violaceum* 12472, en la fase estacionaria (desde la hora 18 hasta la hora 28), se observó la mayor DC activando el sistema de QS gracias a la expresión de los genes ya mencionados y que se refleja en la presencia de la violaceína en el pico presentado en la hora 28.

En el presente estudio se evaluaron 48 extractos provenientes de 22 morfoespecies encontrando que *Piper* sp1 (inflorescencias y tallos) y *Piper* sp 19 (inflorescencias) son las únicas que presentaron actividad antimicrobiana para *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC BAA 047 y evidenciaron formación de halo para QS frente a *C. violaceum* ATCC 12472 generando un interés fitoquímico que permita realizar la búsqueda de moléculas y/o metabolitos secundarios como potenciales inhibidores asociados a QS en *P. aeruginosa*.

Vallejo *et al.* (2014) en su estudio sobre la acción antimicrobiana de extractos vegetales contra bacilos gramnegativos, destacaron el efecto de los extractos del género *Piper* en la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853, en este estudio se encontró actividad en extractos de

tallos e inflorescencias de Sp 19, sp 3 (inflorescencias) sp 16 (tallos) y tallos e inflorescencias de Sp 1. Se ha reportado que la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en las plantas se asocia con la interrupción de la producción de factores de virulencia, como en el caso de *P. aeruginosa*, la producción de picrocianina (Vandeputte, *et al.* 2010). Otras morfoespecies de interés para continuar con su evaluación de actividad antimicrobiana y anti-QS que se lograron seleccionar en este estudio son: *Piper* sp 5, sp 13 y sp 19 .

Frente a *C. violaceum* ATCC 12472, en el estudio de Rahman *et al.*, (2015) se utilizó dicha cepa biosensora para determinar la actividad inhibitoria de QS del extracto de *Amomum tsaoko* (Zingiberaceae) a diferentes concentraciones y evaluando la actividad antimicrobiana de la concentración que tuvo mayor inhibición de QS frente a cepas *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, encontrando que la concentración de 4 mg/mL del extracto mostró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento para las tres bacterias. En este estudio la concentración utilizada para las pruebas experimentales fue de 60 mg/mL para todos los extractos, encontrando actividad anti QS para las morfoespecies de: *Piper* sp5, específicamente los extractos provenientes de hojas y tallos presentaron halos promedio de 9 mm para actividad antimicrobiana y formación de halo externo para QS; en el caso de sp 13, se evaluaron 3 extractos provenientes de: hojas, tallos e inflorescencias obteniendo halos de inhibición de 10 mm, 9 mm y 9 mm respectivamente y, en todos los casos, se observaron halos externos para QS. Para el extracto de las inflorescencias de sp 19 se observaron halos de 13 mm para actividad antimicrobiana y formación de halo para inhibición para QS.

Es importante destacar que uno de los principales metabolitos presentes en plantas de la familia Piperaceae (Guerrini, *et al.*, 2009) es el dillapiol, compuesto de la familia de los benzodioxoles, asociado con la inhibición de genes reguladores de factores de virulencia (Razzaghi-Abyaneh, *et al.*, 2007) y como encargado de la activación del QS. En cuanto a los resultados de inhibición de QS obtenidos en el presente estudio se encontraron: *Piper* sp 1 (tallos, inflorescencias y hojas), *Piper* sp 3 (inflorescencias), *Piper* sp 4 (inflorescencias), *Piper* sp 5 (hojas y tallos), *Piper* sp 6 (inflorescencias), *Piper* sp 8 (hojas), *Piper* sp 9 (hojas e inflorescencias), *Piper* sp 11 (inflorescencias), *Piper* sp 12 (hojas), *Piper* sp 13 (hojas, tallos e inflorescencias), *Piper* sp 15 (flores), *Piper* sp 16 (tallos y hojas), *Piper* sp 19 (inflorescencias) y *Piper* sp 22 (toda la planta)

Frente a las características antimicrobianas de las plantas del género *Piper* se tiene conocimiento que, en la medicina amazónica peruana tradicional *P. aduncum* posee amplias cualidades medicinales, insecticidas y antifúngicas (Kloucek *et al.*, 2005; Mesa *et al.*, 2007), sus propiedades antimicrobianas ya han sido reportadas por Lemos *et al.*, (2000) y Kloucek *et al.*, (2005) encontrando que dicha especie inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *P. aeruginosa*. Su actividad fue asociada con la presencia de ácido benzoico y derivados del benceno presentes en la parte aérea de la planta (Lemos *et al.*, 2000). En el estudio de Santos *et al.* (2016), determinaron que el aceite esencial de hojas de *Piper amalago* L., posee actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* y *E.coli*; adicionalmente el perfil fitoquímico mostró que los principales compuestos químicos presentes en esta planta y a los cuales se les atribuye el efecto inhibitorio en las bacterias fueron β -felandreno,

E-nerolidol, α -muuruleno, δ -elemeno, germacreno D-4-ol, β -cedreno y α -cadinol; en cuanto a los resultados obtenidos para las dos cepas de *P. aeruginosa* evaluadas se encontró que *Piper* sp 1 muestra actividad lo cual podría inferir que dicha morfoespecie posee dichas cualidades medicinales.

Sánchez, *et al* (2009), realizaron el estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* (Caisimón de anís) y determinaron que el componente mayoritario identificado fue el monoterpeno oxigenado safrol, el cual ha sido asociado con la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas. En el 2013 Sánchez *et al*, confirmaron que el safrol está presente como componente en el aceite de *Piper auritum*, el safrol se encuentra asociado al efecto antibacteriano frente a bacilos Gram negativos patógenos y mostró una fuerte actividad antibacteriana con CMI y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 0,12 mg.ml⁻¹ y 0,25 mg.ml⁻¹ frente a *Xanthomonas albilineans* y *Xanthomonas campestris*, respectivamente. También se han descrito las propiedades antifúngicas (Mesa *et al.*, 2007) de *Piper auritum*. Según Amado & Chocontá. (2016), *Piper bogotense* es una especie de interés en el estudio de sustancias con potencial antimicrobiano, ya que presenta en sus hojas taninos, saporinas, flavonoides y alcaloides; en sus ramas quinonas, compuestos asociados a la inhibición del crecimiento bacteriano. Callejas (1997) le ha atribuido a *P. bogotense* propiedades medicinales para el tratamiento de úlceras e infecciones renales, Mesa *et al.* (2007) reportó su actividad antifúngica y Olivero, *et al.* (2011) determinó la actividad anti-QS de esta especie, donde el aceite esencial de hojas de *P. bogotense*, inhibió el mecanismo de quórum sensing en *C. violaceum* a concentraciones hasta 1000 μ g/mL, produciendo una baja interrupción del crecimiento celular en la cepa biosensora, ésta actividad anti-QS se asoció a la presencia de hidrato de transsabina y α -felandreno tal como se evidenció en la actividad obtenida por parte de *Piper* sp 5.

La especie *Piper caninum*, por su parte tiene propiedades antimicrobianas frente a *P. aeruginosa*, asociadas a la presencia de fenilpropanoide y safrol en altas proporciones en los aceites esenciales de hojas frescas y tallos (Salleh *et al*, 2011). *Piper crassinervium*, *Piper glanduligerum*, *Piper pesaresanum* y *Piper umbellatum*, también son especies reportadas con actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* debido a la presencia de alcaloides y flavonoides (Vallejo *et al.*, 2014).

Khan y Siddiqui, (2007), encontraron que los extractos de los frutos de *Piper chaba* Hunter non Bume, *Piper cubeba* Linn. f., *Piper longum* Linn, *Piper nigrum* Linn y *Piper retrofractum* Vahl syn., en diferentes solventes (tetracloruro de carbono, benceno, cloroformo, acetato de etilo y etanol), son activas frente a *P. aeruginosa* y que esta actividad está asociada a la presencia de residuos de alcaloides y terpenoides en los extractos de los frutos. En el caso de este estudio, los extractos fueron preparados en etanol lo que permitió una buena visualización de la actividad antimicrobiana y anti QS de los 48 extractos provenientes de las 22 morfoespecies evaluadas.

Por otra parte, *Piper lineatum* es una especie que posee taninos y compuestos fenólicos entre sus principales constituyentes, los cuales, según Ruíz y Roque, (2009) son responsables de la actividad antibacteriana frente a cepas de *B. subtilis*, *S. aureus* *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporium canis*. En el estudio de Trivedi, *et al* en el 2011 determinaron que los extractos acuosos y metanólicos de los frutos de *Piper longum* y *P. nigrum* tuvieron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A.*

niger y *C. albicans*, asociada a la presencia de compuestos de alcaloides, taninos, fenoles y cumarinas.

Se conoce que *Piper marequitense* posee propiedades medicinales que se relacionan con el tratamiento de malestares digestivos, infecciones cutáneas y disenterías; el perfil fitoquímico de las hojas de *P. marequitense* fue determinado por Calle (1983) encontrando la presencia de flavonoides, fenoles, alcaloides y esteroides, compuestos asociados a la actividad antimicrobiana. Puntualmente, la presencia de flavonoides, está asociada con la regulación de genes y señalización molecular, también son moléculas capaces de alterar sistemas de QS a través de la delección de genes *nod*; por ejemplo, la quercetina es un flavonoide que activa factores de virulencia en *Pseudomonas syringae* pero, si hay presencia de un homólogo de este compuesto, el sistema de QS se bloquea (Brencic & Winans, 2005).

Sánchez, *et al* (2011), determinaron la composición química del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y evaluaron su actividad antibacteriana frente a diferentes cepas de *Pseudomonas* spp, encontrando que el aceite esencial, constituido fundamentalmente por compuestos oxigenados y dentro de ellos los componentes mayoritarios fueron el isosafrol y el notosmirnol inhibe el crecimiento de estas bacterias.

Patiño y colaboradores en el año 2018 encontraron que *Piper pertomentellum*, posee una cantidad abundante de compuestos de tipo terpénico o esteroide, flavonoides, fenoles y esteroides en inflorescencias y hojas, que, al evaluar su actividad antifúngica e inhibición enzimática dieron un resultado positivo permitiendo relacionar los resultados de la actividad y los tipos de metabolitos determinados. La mayor concentración de metabolitos con actividad antibacteriana se encuentra en sus tallos y en menor proporción en hojas e inflorescencias. Ahmad, *et al* (2010), encontraron que los extractos y compuestos aislados de *Piper porphyrophyllum* tuvieron una alta actividad frente a *P. aeruginosa* donde los compuestos aislados 5-hidroxy-7metoxiflavona y 4',5-dihidroxi-3',7-dimetoxyflavona tuvieron valores de CMI de 125 µg/mL. Los resultados del estudio permiten relacionar dicha especie con los resultados obtenidos para la morfoespecie *Piper* sp 19.

En el 2012 Salleh *et al*, estudiaron el perfil fitoquímico y actividad antimicrobiana de aceites esenciales de hojas y tallos de *Piper officinarum*, encontrando que los componentes más abundantes tanto en el aceite de la hoja como en el de tallos, fueron β-cariofileno, α-pineno y limoneno; ambos aceites mostraron actividad antimicrobiana débil contra *P. aeruginosa* y *E. coli*. Finalmente, se ha reportado que los extractos vegetales de especies como *P. tricuspe*, *P. gorgonillense* y *P. hispidum* inhiben el crecimiento bacteriano de bacterias patógenas como *B. subtilis* y *S. aureus* (Pino, 2008).

En cuanto a la multirresistencia de las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas en el presente estudio, es importante destacar que la producción de metalo-β-lactamasas (MBLs) es uno de los principales mecanismos de resistencia que presentan (Guevara *et al*, 2012), los resultados obtenidos muestran una similitud en la actividad antimicrobiana por parte de los extractos frente a *P. aeruginosa* BAA 047 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Existen pocos estudios científicos publicados donde se realice la confirmación molecular de las betalactamasas presentes en las *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones nosocomiales lo que limita la detección de las diferencias en las resistencias de las cepas (Guevara *et al*, 2012).

V. Conclusiones

Las morfoespecies *Piper* sp1 y sp 19 son candidatas para continuar estudios fitoquímicos y realizar la búsqueda de moléculas y/o metabolitos secundarios potenciales inhibidores multirresistente a factores transcripcionales LasR, RhIR y TraR asociados a QS en *P. aeruginosa* multirresistente debido a la formación de halos de inhibición bacteriana en las pruebas realizadas frente a los tres microorganismos evaluados *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA047, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 y formación de halos para inhibición de QS en *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.

Con respecto a los resultados obtenidos frente a las dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* evaluadas se puede decir que *P. aeruginosa* 27853 presenta mayor resistencia al efecto ocasionado por las morfoespecies del género *Piper* evaluadas lo que infiere una mayor resistencia.

VI. Recomendaciones

Para futuros estudios es importante contar con la identificación taxonómica a nivel de especie, lo que permite ampliar la información técnica y científica frente a las cualidades medicinales, insecticidas y antifúngicas del género *Piper*. También se sugieren estudios enfocados en la determinación de la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos como dillapiol y compuestos químicos asociados al efecto inhibitorio en bacterias como β -felandreno, E-nerolidol, α -muuruleno, δ -elemeno, germacreno D-4-ol, β -cedreno y α -cadinol. También estudios que determinen la presencia de safrol ya que ha sido asociado con la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas, como es el caso de *P. aeruginosa*.

VII. Literatura Citada

- Álvarez, C., Cortes, J., Arango, A., Correa, C., & Leal, A. (2006). Resistencia Antimicrobiana en Unidades de Cuidado Intensivo de Bogotá, Colombia, 2001-2003. *Revista de Salud Pública*, 8(1), 86-101.
- Ahmad, F., Emrizal, Sirat, H., Jamaludin, F., Mustapha, N., Ali, R., Arbain, D. & Aboul-Enein, H. (2010). Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Piper porphyrophyllum* (Fam. Piperaceae). *Arabian Journal of Chemistry*. 7: 1031-1033
- Amado, S. & Chocontá, A. (2016). Análisis fitoquímico de cinco especies nativas de las zonas rurales de Bogotá D.C. (Colombia). *Boletín Semillas Ambientales*. 10 (1): 15 – 20
- Araruna, M., Santos, K., da Costa, J., Coutinho, H., Boligon, A., Stefanello, S., Athayde, M., Saraiva, R., da Rocha, J., Kerntopf, M. & de Menezes, I. (2013). Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. *European Journal of Integrative Medicine*, 5(2): 178-183. Doi: 10.1016/j.eujim.2012.11.007
- Arora, G., Kulshreshtha, A., Arora, K., Talwar, P., Raj, R., Grewal, G., Sajid, A. & Kukreti, R. (2017). Emerging Themes in Drug Resistance en Arora, G., Sajid, A. & Chandra, V. (Eds.). Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer. Delhi. India. Springer. 1-24
- Ayaza, M., Ullaha, F., Sadiqa, A., Ullahb, F., Ovaisc, M., Ahmedd, J. & Prasad, H. (2019). Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chemico-Biological Interactions*. 308: 294-303. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.050>
- Azuero A., Jaramillo C., San Martín D., & D'Armas H. (2016). Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*. 9 (20): 11-18.
- Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (eds.). (2019). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. *Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá*. Recuperado de: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Breidenstein, E., De la Fuente, C. & Hancock, R. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*. 19(8): 419-426.
- Brencic, A. & Winans, S. C. (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69 (1):155–194.
- Calle, J. (1983). Contribución al estudio de algunas especies de la familia Piperaceae. *Revista Colombiana de ciencias químico-farmacéuticas*. 4(1): 47-57. Doi: 10.15446/rcciquifa
- Callejas, R. (1997) *Piper bogotense*. Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada XIII: 59, lámina LIV (670). Madrid: Ed. Cultura Hispánica.
- Carepo, M. S., Nina, J. S., Porto, J. I., Bentes, A. R., da Silva, J., da Silva, A. L., & Schneider, M. P. (2004). Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. *Genetics and Molecular Research*. 3 (1): 181-194
- Crabbé A, Pycke, Benny V, Rob M, Pieter N, Cheryl L. & Cornelis N (2010) Response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to low shear modelled microgravity involves AlgU regulation, *Environmental microbiology*. 12(6):1545-64
- Castillo, A., Pascual, Y.M., Cunha Nune, L.C., de la Paz, C. & Cañete, F. (2014). Evaluación de

- la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 19(4): 374-382
- Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC). (4 de mayo de 2018). Healthcare associated infections in intensive care units - Annual Epidemiological Report for 2016. *European Centre for Disease Prevention and Control*. Recuperado de: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-epidemiological-0>
- CLSI. (2017) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*. 43 (3): 81-86
- Durán, N., Justo, G., Durán M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasica, L., Castro, G. & Nakazato G. (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*. 34 (5): 1030-1045.
- Durant-Archibold, A.I., Santana, A., & Gupta, M.P. (2018). Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 217: 63-82. Doi: 10.1016/j.jep.2018.02.008
- Garavito, G., Rincón, J., Arteaga, L., Hata, Y., Bourdy, G., Gimenez, A., Pinzón, R., & Deharo, E. (2006). Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*. 107(3): 460–462. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.033>
- García, P., Olmo, F., Sanchez, M., Dominguez, J., Chahboun, R. & Triana, O. (2018). Activity in vitro and in vivo against *Trypanosoma cruzi* of a furofuran lignan isolated from *Piper jericense*. *Experimental Parasitology*. 189: 34-42
- Gómez, J. & Sánchez (2018). Perfil microbiológico y resistencia bacteriana en una unidad de cuidados intensivos de Pereira, Colombia, 2015. *Médicas UIS*. 31(2):9-15. Doi: 10.18273/revmed.v31n2-2018001
- González, A. (2004) Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Dissertation. Universidad Nacional de Colombia.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi D., Paganetto, G., Muzzoli M., Andreotti E., Tognolini M., Maldonado, M. & Bruni, R. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 27: 39–48
- Guevara, Armando, Sierra R, Carmen I, & de Waard, Jacobus. (2012). Caracterización molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales de Venezuela. *Revista chilena de infectología*, 29(6), 614-621. Doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000700005>
- Hancock, R. & Speert, D. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*. 3(4): 247-255
- Hashimi, S., Xu, T. & Wei, M. (2015). Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. *Oncology Reports*. 33: 1731-1736
- Khan, M. & Siddiqui, M. (2007). Antimicrobial activity of *Piper* fruits. *Natural product radiance*. 6 (2): 111-113
- Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E. & Kokoska, L. (2005). Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Caller'ia District. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 309-3012
- Kothari, V., Sharma, S. & Padia, D. (2017). Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 10 (8): 744-752

- Lemos, G.C.S., Oliveira, L.O., Eberli, B.B., Motta, O.V. & Folly, M.M. (2000) Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.) and jaborandi-falso (*Piper aduncum* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 3: 67–72.
- López, A., Hudson, J. & Towers, G. (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 77: 189-196
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: a dangerous adversary. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 48 (4): 465-74.
- Luo, J., Dong, B., Wang, K., Cai, S., Liu, T., Cheng, X., Lei, D. Chen Y., Li, Y. Kong, J. & Chen, Y. (2017). Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model. *PLoS One*. 12(4): 1-32. doi: 10.1371 / journal.pone.0176883.
- Mahomoodally, M., Gurib-Fakim, A. & Hussein, A. (2005) Antimicrobial Activities and Phytochemical Profiles of Endemic Medicinal Plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology*. 43(3): 237-242, doi: 10.1080/13880200590928825
- Mgbeahuruike E., Yrjönen T., Vuorela H., & Holm Y. (2017). Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South African Journal of Botany*. 112: 54-69. Doi: 10.1016/j.sajb.2017.05.007
- Mesa, A., Montiel, J., Martínez, C., Zapatina, B., Pino, N., Bueno, J. & Stashenko, E. (2007). Actividad *in vitro* anti-*Candida* y anti-*Aspergillus* de aceites esenciales de plantas de la familia Piperaceae. *Scientia et Technica* Año XIII. 1(33): 247-249. Doi: <http://dx.doi.org/10.22517/23447214.6089>
- Morten Hentzer, Hong Wu, Jens Bo Andersen, Kathrin Riedel, Thomas B. Rasmussen, Niels Bagge, Naresh Kumar, Mark A. Schembri, Zhijun Song, Peter Kristoffersen, Mike Manefield, John W. Costerton, John W. Costerton, Søren Molin, Leo Eberl, Peter Steinberg, Staffan Kjelleberg, Niels Hoiby & Michael Givskov (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal*. 22 (15): 3803-3815.
- Narayanan, S., Prasad, T., Nair, I. C., & Jayachandran, K. (2012). A novel exploitable feature of *Chromobacterium violaceum*: experimental evidence for Phenol degradation. *Novus International Journal of Bio-technology & Bioscience*. 1(3): 1–11.
- Novara, L. (2000). Piperaceae. Flora del Valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta. Herbario MCNS. Universidad Nacional de Salta*. 5 (1): 1-24
- Odonkor, S. & Addo, K. (2011). Bacteria Resistance to Antibiotics: Recent Trends and Challenges. *International Journal of Biological & Medical Research*. 2(4): 1204 – 1210
- Okafor N (1911) Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. 3 (12) doi:10.1021/ie50036a053
- Olivero, J., Pájaro, N. & Stashenko, E. (2011). Actividad anti-quorum sensing de aceites esenciales aislados de diferentes especies del género *Piper*. *Vitae*. 18(1): 77-82
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (27 de febrero de 2017). Comunicado de prensa: La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. *World Health Organization*. Recuperado de: <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (5 de marzo de 2019). Comunicado de prensa:

- Infección por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos – México. *World Health Organization*. Recuperado de: <https://www.who.int/csr/don/5-march-2019-carbapenem-resistant-p-aeruginosa-mex/es/>
- Ovalle, M., Saavedra, S., González, M., Hidalgo, A., Duarte, & Beltrán, M. (2017). Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Biomédica*. 37(4): 473-485. DOI:10.7705/biomedica.v34i2.3432
- Patiño, W., Prieto, J., Cuca, L., Ávila, M. & Patiño, O. (2018). Chemical and biological characterization of ethanolic extracts obtained from *Piper asperiusculum* and *Piper pertomentellum*. *Revista cubana de plantas medicinales*. 23 (1), 1-18.
- Pearson, J., Feldman, M., Iglewski, B. & Prince, A. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signaling Is Required for Virulence in a Model of Acute Pulmonary Infection. *Infection and Immunity*. 68(7): 4331-4334. Doi: 10.1128/IAI.68.7.4331-4334.2000
- Perpetuo, E. A., Marques, R. C. P., Mendes, M. A., de Lima, W. C., Menck, C. F. M., & Nascimento, C. A. O. do. (2009). Characterization of the phenol monooxygenase gene from *Chromobacterium violaceum*: Potential use for phenol biodegradation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14(6): 694-701. Doi:10.1007/s12257-008-0266-2
- Pino, N. (2008). Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género *Piper* L. (Piperaceae). *Revista institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*. 27(1): 67-75
- Pitlovanciv, A., Caris, M., Marques, L., Curi, R. & Vasconcellos R. (2006). Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*. *Biotemas*. 19(1): 13-18
- Rahman, M. R. T., Lou, Z., Yu, F., Wang, P., & Wang, H. (2015). Anti-quorum sensing and antibiofilm activity of *Amomum tsaoko* (*Amomum tsaoko* Crevost et Lemarie) on foodborne pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24(2): 324-330
- Rasmussen T. & Givskov M. (2006). Quorum sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*. 296 (2-3):149-161.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Yoshinari, T., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M., Nagasawa, H. & Sakuda, H. (2007). Dillapiol and Apiol as Specific Inhibitors of the Biosynthesis of Aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71 (9): 2329–2332. Doi: 10.1271 / bbb.70264
- Rodríguez, C., Zarate, A. & Sánchez, L. (2017). Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical significance in Colombia. *Nova*. 15 (27): 119-129
- Ruíz, J. & Roqué, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-oriente peruano. *Ciencia e Investigación. Facultad de farmacia y bioquímica. UNMSM*. 12(1): 41-47
- Saleh, M. & Van, J. (2018). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Arctotis arctotoides* (L.f.) O. Hoffm.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 220: 294-320. Doi: 10.1016/j.jep.2018.01.011
- Salleh, W.M.N.H.W.; Ahmad, F.; Yen, K.H. & Sirat, H.M. (2011) Chemical Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Piper caninum* Blume. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(11): 7720-7731. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms12117720>
- Salleh, W.M.N.H.W., Ahmad, F., Yen, K.H. & Sirat, H.M (2012). Chemical Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Piper officinarum* (Piperaceae). *Natural product communications*. 7(12):1659-1662

- Sanabria, A. (1983) Análisis Fitoquímico Preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Bogotá, Colombia. Editorial UN.
- Sanabria, A., Mendoza, A. & Moreno, A. (1998). Actividad antimicrobiana *In vitro* de angiospermas colombianas. *Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas*. 27: 47-51
- Sánchez L. & Corrales, L. (2005) Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova Publicación Científica en Ciencias Biolómicas*. 3(4):21–29.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E. & Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). *Revista protección vegetal*. 24 (1): 39-46.
- Sánchez, Y., Correa, T., Abreu, Y. Martínez, B., Duarte, Y. & Pino, O. (2011). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Revista protección vegetal*. 26 (3): 170-176.
- Sánchez, Y., Correa, T., Abreu, Y. & Pino, O. (2013). Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Pammel) Dowson. *Revista protección vegetal*. 28 (3): 204-210
- Santos, V., Lima, C., Campos, R., Ribeiro, C., Marques, F., Budel, J. & Messias-Reason, I. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity Of Volatile Oils of *Piper amalago* L. *Latin American Journal of Pharmacy*. 35 (8): 1883-1889
- Siriyong T., Srimanote P., Chusri S., Yingyongnarongkul B.-e., Suaisom C., Tipmanee V. & Voravuthikunchai S.P. (2017). Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17: 405-411. Doi: 10.1186/s12906-017-1913-y
- Steindler, L., Bertani, I., De Sordi, L., Schwager, S., Eberl, L. & Venturi, V. (2009). LasI/R and RhlI/R Quorum Sensing in a Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Beneficial to Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(15): 5131-5140. Doi: 10.1128/AEM.02914-08
- Suryawanshi, R., Patil, C., Borase, H., Narkhede, C., Stevenson, A., Hallsworth, J. & Patil, S. (2015). Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*. 37 (1): 98-107
- Taganna, J. C., Quánico, J. P., Perono, R. M. G., Amor, E. C., & Rivera, W. L. (2011). Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylolytic activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3): 865-871.
- Trivedi, M., Khemani, A., Vachhani U., Shah, C. & Santani, D. (2011). Pharmacognostic, phytochemical analysis and antimicrobial activity of two piper species. *Pharmacie Globale (IJCP)*, 2 (7): 1-4
- Vandeputte, O. M.; Kiendrebeogo, M.; Rajaonson, S.; Diallo, B.; Mol, A.; El Jaziri, M. & Baucher, M. (2010). Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(1):243–253.
- Vallejo A, Feitosa A, Goullart AE, Pires LL & Mosquera OM. (2014). Tamizaje de acción

antimicrobiana de 34 extractos vegetales contra bacilos gramnegativos. *Salud & Sociedad Uptc.* 1(1):34-39

Villa, L., Cortés, J., Leal, A., Meneses, A. & Meléndez, M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. *Revista Chilena de Infectología.* 30(6): 605-610