



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Efecto inhibitorio de sustancias
provenientes de especies del género
Piper sobre Quorum Sensing de
*Pseudomonas aeruginosa***

Lida Vanessa Hernández Moreno

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Efecto inhibitorio de sustancias provenientes de especies del género *Piper* sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

Lida Vanessa Hernández Moreno

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Ph.D., Oscar Javier Patiño Ladino

Grupo de Investigación:

Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) - Universidad
Nacional de Colombia

Codirectora:

Msc. Ludy Cristina Pabón Baquero

Grupo de Investigación

Biología Molecular e inmunogenética (BIOMIGEN) – Universidad de La Salle

Línea de Investigación Química de Productos Naturales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2022

(Dedicatoria o lema)

A ti abuela, por la fortaleza y gran amor que nos dejaste.

Nuestra mente es capaz de pasar más allá de la línea divisoria que hemos trazado para ella. Más allá de los pares de opuestos en que consiste el mundo, otras percepciones nuevas comienzan.

Hermann Hesse

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Vanessa Hernández M.

Nombre: Lida Vanessa Hernández Moreno

Fecha 7/10/2022

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y a la Universidad de La Salle por la financiación y por su contribución en mi formación académica.

A mi director, el profesor Oscar Javier Patiño por la guía en el desarrollo de este trabajo, su paciencia, confianza, dedicación, por su amistad, por brindarme todo su conocimiento e introducirme en el área de productos naturales, por transmitir su amor a la ciencia y acogerme en el grupo de investigación QuiProNaB.,

A mi codirectora Ludy Pabón, muchas gracias por seguir guiándome en este camino de la investigación durante tantos años, por siempre hacerme ver lo maravillosa que es la ciencia. Por compartir sus conocimientos, por la confianza puesta en mí, por motivarme siempre a ser mejor y nunca desistir, por esta amistad tan bonita que se creó y la oportunidad de trabajar en el semillero (SIES).

A las profesoras Patricia Hernández, Vanessa Gómez, Juliet Prieto, y Tatiana Jiménez por siempre apoyarme en mi formación investigativa, por brindarme sus conocimientos y dinamismo científico en la realización de este proyecto, cada una me brindo conocimientos muy valiosos que me ayudaron a forjarme como investigadora.

Al profesor Luis Enrique Cuca, por su apoyo incondicional, por todo su conocimiento y por dejarme ser parte de esta familia llamada QuiProNaB, donde se forjan los conocimientos y donde se aprende a amar el mundo de los productos naturales. A los profesores del Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB), por darme la oportunidad de compartir su espacio. A todos los integrantes de esta familia, quienes me dejaron grandes enseñanzas.

A mis compañeros y amigos del grupo de investigación, Haritol, Andrés, Juan, Dani, Leidy, Diego Silva, Cristóbal, Stephanie, Estefania, Yohum y todos los integrantes del grupo, quienes siempre estuvieron apoyándome cuando lo necesité, por todos los momentos compartidos, anécdotas y experiencias vividas, de cada uno me llevó una gran enseñanza y el cariño brindado.

Al Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de La Salle y el programa de Biología (mi alma mater), por la colaboración en los bioensayos realizados. A los laboratoristas, Máximo, Julia, Giovanni y Sara por todo el apoyo y paciencia en el desarrollo experimental. A Ricardo por toda su colaboración en este proceso. Al Semillero Interdisciplinar de Investigación SIES, por hacer parte de mi proceso de formación y a todos los integrantes con quienes tuve buenas experiencias (Wendy, Luisa, Laura, Mafe).

A mis padres Eliana y Kees, por darme su apoyo y amor incondicional en todo lo que he hecho en mi vida, por hacerme fuerte cada día y enseñarme a vivir esta vida con alegría. A mi hermanita por todo su amor, paciencia, apoyo incondicional, consejos y estar para mí siempre. A mi familia por ser el motor de vida y por todo el amor que me brindan cada día.

A mis amigos y amigas de la Universidad de La Salle por todo su apoyo y por hacer que mis días difíciles fueran más llevaderos durante todo este proceso y a mis amigos del colegio, por su amistad incondicional y por la paciencia de todos estos años de amistad.

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Colombia, la Universidad de La Salle y MinCiencias, a través del contrato 835-2017 y código 110177758105, derivado de la convocatoria para proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud-2017.

Agradezco a minciencias por el apoyo recibido como Joven Talento a través del contrato 907-2019, proveniente de la convocatoria 850-2019 para el fortalecimiento de proyectos de investigación de CTel en ciencias médicas y de la salud con talento joven e impacto regional.

X Efecto inhibitorio de sustancias provenientes de especies del género *Piper* sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

Este trabajo se desarrolló bajo el contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados No. 121 de 22/01/2016, con OTROSÍ No. 21 celebrado entre la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, y en el marco de amnistía establecido en el artículo 6° de la ley de 1955 de 2019.

Resumen

Efecto inhibitorio de sustancias provenientes de especies del género *Piper* sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria oportunista catalogada como de prioridad crítica por la OMS y está asociada a una amplia gama de infecciones principalmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI). La patogenicidad de esta bacteria está regulada principalmente por el sistema de comunicación denominado Quorum Sensing (QS) que le permite controlar sus factores de virulencia. Este sistema ha sido relacionado con la resistencia a los antibióticos y por ende se ha planteado su inhibición a partir de sustancias provenientes de plantas como una estrategia para el control de microorganismos resistentes. Las plantas del género *Piper* se han caracterizado por tener propiedades antibacterianas, antifúngicas, insecticidas, antioxidantes y citotóxicas, sin embargo, son pocos los estudios enfocados a la inhibición del QS. Por lo tanto, en el presente estudio se determinó el potencial de las sustancias provenientes de especies del género *Piper* como inhibidores del QS de *P. aeruginosa*. La metodología que se llevó a cabo comprendió la identificación de algunas especies pertenecientes al género *Piper* con potencial de inhibición de QS y la formación de biopelícula. Posteriormente se realizó el estudio fitoquímico sobre una de las especies con mayor potencial de inhibición de QS (*P. pertomentellum*) para aislar e identificar algunos constituyentes químicos bioactivos. Finalmente, se determinó la acción de constituyentes químicos presentes en especies del género *Piper* sobre la formación de biopelículas y la producción de algunos factores de virulencia (elastasas, proteasas y pirocianina) asociados al QS de *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos permitieron identificar especies pertenecientes al género *Piper* con potencial de inhibición de QS, destacándose *P. asperiusculum*, *P. cumanense*, *P. pertomentellum*, *P. bogotense*, *P. sucrense* y *P. grande* por presentar porcentajes de producción menores o igual al 50% en los ensayos de

formación de biopelícula o producción de violaceína. El estudio fitoquímico realizado sobre la parte aérea de *P. pertomentellum* permitió aislar e identificar una nueva piperamida (etiltembamida **(C1)**), junto con cuatro amidas conocidas (tembamida **(C2)**, cefaradiona B **(C3)**, benzamida **(C4)** y tembamida **(C5)**). Los compuestos identificados se reportan por primera vez para la especie y sus estructuras están de acuerdo con la quimiotaxonomía del género *Piper*. Por último, en este estudio se destaca el potencial inhibitorio de los factores de virulencia y en la formación de biopelícula de los compuestos con potencial multidiana que correspondieron a amidas **(C9 y C10)**, hidroquinonas **(C8, C18 y C19)** y derivados de ácido benzoico **(C16)**. presentes en especies del género *Piper*. Adicionalmente, con los resultados obtenidos se establecieron algunas relaciones de estructura-actividad preliminar sobre los compuestos más activos. Esta investigación contribuye a la búsqueda de inhibidores de origen natural que pueden servir como alternativa de control del QS en *P. aeruginosa* para reducir la resistencia bacteriana, mediante la caracterización del potencial inhibitorio de sustancias provenientes de algunas especies del género *Piper*.

Palabras clave:

Piper pertomentellum, piperamidas, *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum Sensing. *Piper*, factores de virulencia.

Abstract

Inhibitory effect of substances from *Piper* species on Quorum Sensing of *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium classified as a critical priority by the WHO and is associated with a wide range of infections mainly in intensive care units (ICU). The pathogenicity of this bacterium is mainly regulated by a communication system called Quorum Sensing (QS) that allows it to control its virulence factors. This system has been related to antibiotic resistance and therefore its inhibition by plant-derived substances has been proposed as a strategy for the control of resistant microorganisms. Plants of the genus *Piper* have been characterized for having antibacterial, antifungal, insecticidal, antioxidant and cytotoxic properties, however, few studies have focused on the inhibition of the QS. Therefore, in the present study, the potential of substances from *Piper* species as QS inhibitors of *P. aeruginosa* was determined. The methodology carried out involved the identification of some species belonging to the genus *Piper* with potential for QS inhibition and biofilm formation. Subsequently, a phytochemical study was carried out on one of the species with the greatest potential for QS inhibition (*P. pertomentellum*) to isolate and identify some bioactive chemical constituents. Finally, the action of chemical constituents presents in *Piper* species on biofilm formation and the production of some virulence factors (elastases, proteases and pyocyanin) associated with QS of *P. aeruginosa* was determined. The results obtained allowed the identification of species belonging to the genus *Piper* with QS inhibition potential, with *P. asperiusculum*, *P. cumanense*, *P. pertomentellum*, *P. bogotense*, *P. sucrense* and *P. grande* standing out for presenting production percentages of less than or equal to 50% in the biofilm formation or violacein production assays. The phytochemical study carried out on the aerial part of *P. pertomentellum* allowed the isolation and identification of a new piperamide (ethyltembamide (**C1**)), together with four known amides (tembamide

(**C2**), cefaradione B (**C3**), benzamide (**C4**) and tembamide (**C5**). The identified compounds are reported for the first time for the species and their structures are in agreement with the chemotaxonomy of the genus *Piper*. Finally, this study highlights the inhibitory potential on virulence factors and biofilm formation of compounds with multidiana potential that corresponded to amides (**C9** and **C10**), hydroquinones (**C8**, **C18** and **C19**) and benzoic acid derivatives (**C16**). present in species of the genus *Piper*. Additionally, with the results obtained, some preliminary structure-activity relationships on the most active compounds were established. This research contributes to the search for inhibitors of natural origin that can serve as an alternative for the control of QS in *P. aeruginosa* to reduce bacterial resistance, through the characterization of the inhibitory potential of substances from some species of the *Piper* genus.

Keywords: *Piper pertomentellum*, piperamides, *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum Sensing. *Piper*, virulence factors.

Contenido

| | |
|--|-------------|
| Agradecimientos | VIII |
| Resumen | XI |
| Abstract..... | XIII |
| Lista de figuras..... | XVII |
| Lista de tablas | XIX |
| Lista de Símbolos y abreviaturas..... | XXI |
| Introducción | 24 |
| Objetivos..... | 28 |
| 1. Estado actual del tema..... | 29 |
| 1.1 Importancia de las enfermedades infecciosas a nivel mundial y en Colombia | 29 |
| 1.2 Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 31 |
| 1.2.1 Métodos de control para <i>P. aeruginosa</i> | 33 |
| 1.2.2 Mecanismos de resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 34 |
| 1.3 Importancia del Quorum sensing..... | 37 |
| 1.3.1 Sistemas Quorum Sensing, mecanismos y moléculas autoinductoras..... | 37 |
| 1.3.2 Blancos específicos para la inhibición de QS..... | 41 |
| 1.3.3 Métodos de detección de inhibidores de QS..... | 44 |
| 1.3.4 Quorum sensing en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 46 |
| 1.3.5 Biofilm y factores de virulencia..... | 47 |
| 1.3.6 Plantas como fuente de inhibidores de QS | 50 |
| 1.4 Generalidades del género <i>Piper</i> | 57 |
| 1.4.1 Distribución a nivel mundial y en Colombia..... | 57 |
| 1.4.2 Aspectos morfológicos y taxonómicos | 58 |
| 1.4.3 Usos etnobotánicos de especies del género <i>Piper</i> | 60 |
| 1.4.4 Estudios fitoquímicos en el género <i>Piper</i> | 64 |
| 1.4.5 Actividad antibacteriana e inhibitoria del QS de especies del género <i>Piper</i> 65 | |
| 1.4.6 Generalidades de <i>P. pertomentellum</i> | 71 |
| 2. Metodología | 73 |
| 2.1 Identificación de especies del género <i>Piper</i> con potencial anti-QS..... | 73 |
| 2.1.1 Procedimientos generales | 73 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 2.1.2 | Mantenimiento y preparación de la suspensión bacteriana para los ensayos:..... | 74 |
| 2.1.3 | Colecta de material vegetal y preparación de extractos etanólicos | 74 |
| 2.1.4 | Ensayo de susceptibilidad bacteriana en <i>P. aeruginosa</i> | 76 |
| 2.1.5 | Ensayo de formación de biopelículas en <i>P. aeruginosa</i> | 76 |
| 2.1.6 | Ensayo de cuantificación de la producción de violaceína..... | 77 |
| 2.1.7 | Criterio de selección de extractos con potencial de inhibición de quorum sensing..... | 78 |
| 2.1.8 | Análisis estadístico | 79 |
| 2.2 | Estudio fitoquímico de la parte aérea de <i>P. pertomentellum</i> | 80 |
| 2.2.1 | Procedimientos generales | 80 |
| 2.2.2 | Extracción y fraccionamiento de la parte aérea de <i>Piper pertomentellum</i> | 81 |
| 2.2.3 | Evaluación del potencial de inhibición de quorum sensing de las fracciones de <i>P. pertomentellum</i> | 82 |
| 2.2.4 | Purificación de la fracción de DCM proveniente de la parte aérea de <i>P. pertomentellum</i> | 82 |
| 2.2.5 | Purificación de la fracción de AcOEt proveniente de <i>P. pertomentellum</i> | 83 |
| 2.3 | Evaluación del potencial de metabolitos presentes en especies del género <i>Piper</i> sobre algunos factores de virulencia asociados al QS de <i>P. aeruginosa</i> | 84 |
| 2.3.1 | Procedimientos generales | 84 |
| 2.3.2 | Compuestos químicos de <i>Piper</i> para la evaluación de los factores de virulencia y formación de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> | 85 |
| 2.3.3 | Ensayo de formación de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> | 86 |
| 2.3.4 | Ensayos sobre los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> | 87 |
| 2.3.5 | Análisis estadístico | 88 |
| 3. | Resultados y Discusión | 89 |
| 3.1 | Identificación de especies del género <i>Piper</i> con potencial de inhibición de quorum sensing | 89 |
| 3.2 | Estudio fitoquímico realizado de la parte aérea de <i>P. pertomentellum</i> | 94 |
| 3.3 | Determinación del potencial de compuestos provenientes de especies de <i>Piper</i> sobre algunos factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> | 103 |
| 4. | Conclusiones y Recomendaciones..... | 114 |
| 4.1 | Conclusiones..... | 114 |
| 4.2 | Recomendaciones y proyecciones | 115 |
| 5. | Anexos:..... | 119 |
| 5.1 | Potencial de los extractos de <i>Piper</i> en la susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i> | 119 |
| 5.2 | Potencial de los extractos de <i>Piper</i> en la susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i> | 120 |
| 5.3 | Datos espectroscópicos y constantes físicas de los compuestos provenientes de <i>P. pertomentellum</i> | 121 |
| 5.4 | Potencial de los compuestos de <i>Piper</i> en la producción de factores de virulencia y formación de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> | 133 |
| 6. | Bibliografía | 139 |

Lista de figuras

| | |
|---|-----|
| Figura 1-1. Etapas del quórum sensing. | 38 |
| Figura 1-2. Diversidad estructural de moléculas autoinducidas y receptores del QS en bacterias Gram negativas. | 40 |
| Figura 1-3. Moléculas homólogas a SAM que inhiben el QS. | 41 |
| Figura 1-4. Moléculas antagonistas para el receptor LuxR. | 43 |
| Figura 1-5. Esquema del circuito de detección de Quorum Sensing mediado por cuatro tipos de sistemas que regulan los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> | 47 |
| Figura 1-6. Etapas de la formación de la biopelícula. | 49 |
| Figura 1-7. Distribución mundial del género <i>Piper</i> | 58 |
| Figura 1-10. Metabolitos representativos del género <i>Piper</i> | 65 |
| Figura 1-11. Espécimen de <i>Piper pertomentellum</i> Trel. & Yunk. | 72 |
| Figura 2-1. Diagrama metodológico realizado para la identificación de especies del género <i>Piper</i> con potencial anti-QS. | 79 |
| Figura 2-2. Esquema general de extracción y fraccionamiento de la parte aérea de <i>P. pertomentellum</i> | 81 |
| Figura 2-3. Diagrama general de purificación de la fracción DCM de la parte aérea de <i>P. pertomentellum</i> | 83 |
| Figura 2-4. Diagrama general de purificación de la fracción AcOEt de la parte aérea de <i>P. pertomentellum</i> | 84 |
| Figura 3-1. Porcentaje de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en presencia de extractos de especies del género <i>Piper</i> | 90 |
| Figura 3-2. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> frente a diferentes concentraciones del extracto etanólico (EE) y fracciones (DCM, AcOEt, IPA, EtOH:H ₂ O) de <i>P. pertomentellum</i> | 95 |
| Figura 3-3. Compuestos aislados e identificados de la fracción de DCM y AcOEt provenientes de la parte aérea de <i>P. pertomentellum</i> | 97 |
| Figura 5-1. Espectro IR de compuesto C1 | 123 |
| Figura 5-2. Espectro RMN ¹ H de compuesto C1 (CDCl ₃ , 400 MHz). | 124 |
| Figura 5-3. Espectro APT de compuesto C1 (CDCl ₃ , 100 MHz). | 124 |
| Figura 5-4. Espectro COSY de compuesto C1 (CDCl ₃). | 125 |
| Figura 5-5. Espectro HMQC de compuesto C1 (CDCl ₃). | 125 |
| Figura 5-6. Espectro HMBC de compuesto C1 (CDCl ₃ , 100 MHz). | 126 |
| Figura 5-7. Principales correlaciones en HMBC para el compuesto C1 | 126 |
| Figura 5-8. Espectro RMN ¹ H de compuesto C2 (CDCl ₃ , 400 MHz). | 127 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5-9. Espectro APT de compuesto C2 (CDCl ₃ , 100 MHz)..... | 128 |
| Figura 5-10. Espectro RMN ¹ H de compuesto C3 (400MHz, CDCl ₃)..... | 129 |
| Figura 5-11. Espectro de APT compuesto C3 (CDCl ₃ , 100 MHz)..... | 129 |
| Figura 5-12. Espectro RMN ¹ H de compuesto C4 (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 130 |
| Figura 5-13. Espectro APT de compuesto C4 (CDCl ₃ , 100 MHz)..... | 131 |
| Figura 5-14. Espectro RMN ¹ H de compuesto C5 (Metanol-d ₄ , 400 MHz)..... | 132 |
| Figura 5-15. Espectro APT de compuesto C5 (Metanol-d ₄ , 100 MHz)..... | 132 |

Lista de tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 1-1. Reportes de actividad anti-QS de extractos de plantas sobre <i>P. aeruginosa</i> . | 52 |
| Tabla 1-2. Compuestos naturales con actividad inhibitoria del QS de <i>P. aeruginosa</i> | 55 |
| Tabla 1-3. Usos etnobotánicos de especies del género <i>Piper</i> . | 61 |
| Tabla 1-4. Actividades biológicas de especies de <i>Piper</i> . | 63 |
| Tabla 1-5. Estudios de actividad antimicrobiana de extractos de especies del género <i>Piper</i> . | 66 |
| Tabla 1-6. Estudios de actividad antimicrobiana de aceites esenciales de especies del género <i>Piper</i> . | 67 |
| Tabla 1-7. Estudios de actividad antimicrobiana en el ensayo de microdilución para compuestos aislados de especies del género <i>Piper</i> . | 68 |
| Tabla 1-8. Estudios de QS de extractos de especies del género <i>Piper</i> . | 69 |
| Tabla 1-9. Estudios de QS de aceites esenciales de especies del género <i>Piper</i> ... | 70 |
| Tabla 1-10. Estudios de QS de compuestos aislados de especies del género <i>Piper</i> . | 71 |
| Tabla 2-1. Extractos provenientes de especies de <i>Piper</i> sometidos a la evaluación del potencial inhibitorio sobre el QS y la formación de biopelícula. | 75 |
| Tabla 2-2. Compuestos de <i>Piper</i> empleados para evaluar la formación de biopelícula y de algunos factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> . | 85 |
| Tabla 3-1. Efecto inhibitorio de extractos etanólicos de <i>Piper</i> sobre la formación de la biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> y la producción de violaceína de <i>C. violaceum</i> | 91 |
| Tabla 3-2. Resultados del potencial de inhibición de algunas especies del género <i>Piper</i> sobre la formación de biopelícula en <i>P. aeruginosa</i> y sobre la producción de violaceína en <i>C. violaceum</i> | 93 |
| Tabla 3-3. Potencial de inhibición de QS para el extracto etanólico y fracciones provenientes de <i>P. pertomentellum</i> . | 95 |
| Tabla 3-4. Comparación de los datos espectroscópicos para los compuestos C1 , C2 y C5 | 100 |
| Tabla 3-5. Efecto de compuestos aislados de especies de <i>Piper</i> en la producción de factores de virulencia y formación de biopelícula en <i>P. aeruginosa</i> . | 104 |
| Tabla 3-6. Efecto en la formación de la biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> de extractos y compuestos de especies de <i>Piper</i> . | 108 |
| Tabla 5-1. Efecto de los extractos provenientes de especies de <i>Piper</i> en el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> | 119 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 5-2. Efecto del extracto y fracciones provenientes de especies de <i>Piper</i> en el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> | 120 |
| Tabla 5-3. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto C1 | 123 |
| Tabla 5-4. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto C2 | 127 |
| Tabla 5-5. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto C3 | 128 |
| Tabla 5-6. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto C4 | 129 |
| Tabla 5-7. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto C5 | 131 |
| Tabla 5-8. Efecto de los compuestos provenientes de especies de <i>Piper</i> en la formación de biopelícula y producción de los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> | 133 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

| | |
|-------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| AHL | Acilhomoserin lactona |
| APT | Attached Proton Test |
| ATC | Ácido tricloroacético |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BIC | Concentración inhibitoria de biopelícula |
| CC | Cromatografía en columna |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado |
| CHCl ₃ | Cloroformo |
| CF | Cromatografía flash |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| CLSI | Clinical & Laboratory Standards Institute |
| CLV | Cromatografía líquida al vacío |
| COSY | Homonuclear Correlation Spectroscopy |
| d | Doblete |
| dd | Doble doblete |
| DANE | Departamento Administrativo Nacional de Estadística |
| DCM | Diclorometano |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |

| Abreviatura | Término |
|--------------------|--|
| DE | Desviación estándar |
| DO | Densidad óptica |
| EtOH | Etanol |
| EE | Extracto etanólico |
| EI | Enfermedades infecciosas |
| EMAR | Espectrometría de masas de alta resolución |
| EPS | Exopolisacáridos |
| ERC | Elastina rojo congo |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| HMBC | ¹ H-Detected Multiple Bond Heteronuclear Multiple Quantum |
| HMQC | ¹ H-Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence |
| H ₂ O | Agua |
| Hz | Hertz |
| IPA | Isopropanol |
| IQS | Inhibidores de quorum sensing |
| IR | Infrarojo |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| LB | Luria bertani |
| m | Multiplete |
| MeOD | Metanol deuterado |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramos |
| MHz | Megahercio |
| mL | Mililitros |
| mM | Mili molar |

Abreviatura Término

| | |
|--------------------|---|
| OMS | Organización mundial de la salud |
| OPS | Organización panamericana de la salud |
| ppm | Partes por millón |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| QS | Quorum sensing |
| RAM | Resistencia antimicrobiana |
| RMN ¹ H | Resonancia magnética nuclear de hidrogeno |
| RPM | Revoluciones por minuto |
| s | singlete |
| t | Triplete |
| UCI | Unidad de cuidados intensivos |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| μg | Microgramo |
| μM | Micromolar |
| UV | Ultravioleta |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |
| δC | Desplazamiento de carbono |
| δH | Desplazamiento de hidrógeno |

Introducción

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias resistentes se encuentran como uno de los problemas de salud pública que requiere de mayor atención y se ha convertido en uno de los desafíos más importantes para los sistemas de salud. La Organización Mundial de la Salud OMS declaró que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una de las 10 principales amenazas mundiales y se estima que para el año 2050 causará 10 millones de muertes cada año (OMS, 2021). La disminución en la efectividad de los antibióticos se ha generado como consecuencia diversos factores como mutaciones de los microorganismos, fácil propagación de patógenos resistentes, la automedicación, y el uso excesivo, indiscriminado e irresponsable de los antibióticos (Tillotson & Zinner, 2017; Weldon et al., 2022). De esta manera, muchas entidades gubernamentales y grupos de investigación a nivel mundial están de acuerdo en que se requiere de un plan global que permita contrarrestar el incremento en los índices de morbilidad por este tipo de enfermedades (Chaired By Jim O'Neill, 2016; OMS, 2021; Choudhury et al., 2022; Murray et al., 2022).

Dentro de los microorganismos multirresistentes de interés a nivel mundial se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria patógena y oportunista, agente causal de una amplia gama de infecciones que van desde la bacteriemia, del tracto urinario, pulmonares y en heridas por quemaduras. A nivel clínico, es uno de los patógenos Gram negativo más comunes en las infecciones observadas en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y responsable de una alta mortalidad (Høiby et al., 2010; Aguilar et al., 2016; Luo et al., 2017; Karakonstantis et al., 2020). En un estudio reciente sobre bacterias Gram negativas realizado en 25 países de los cinco continentes, se encontró que, de 526 aislamientos de pacientes de UCI, 175 correspondían a *P. aeruginosa* multidrogorresistente y la mortalidad asociada a este microorganismo estaba alrededor del 50% con respecto al total de pacientes infectados (Karakonstantis et al., 2020). En este sentido se ha

encontrado en los perfiles de resistencia que ha aumentado el número de aislados de *P. aeruginosa* resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados para el control de infecciones, reportándose frecuencias superiores al 50% para imipenem (68,8%), meropenem (70,4%), gentamicina (73,2%), ciprofloxacina (72,7%), ceftazidima (69,2%) y aztreonam (51,2%) (A. Leal et al., 2017; Germen, 2019). También se ha implementado el uso de diversos biocidas (antisépticos y desinfectantes) para su control en entornos clínicos y se ha identificado que esta bacteria presenta resistencia hacia varios de estos productos (Ignak et al., 2017; Vásquez-Giraldo et al., 2017; Namaki et al., 2022). Dentro de los mecanismos de resistencia que ha presentado esta bacteria están relacionados con la capacidad de formar biopelículas, degradación enzimática, modificación del sitio activo, impermeabilidad de la membrana y la presencia de bombas de expulsión (Pang et al., 2019a; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022).

Como alternativa de control para reducir la RAM, se encuentra la inhibición en la detección de quorum sensing (QS), un sistema que permite la comunicación entre bacterias a través de moléculas autoinducidas y que se encuentra regulado en función de la densidad poblacional. El QS de *P. aeruginosa* comprende cuatro redes que se interconectan entre sí, los cuales tienen la capacidad de regular genes asociados a la producción de factores de virulencia como elastasas, proteasas piocianina y la formación de biopelículas, procesos que favorecen la infección en el huésped y reducen la acción de los antibióticos (Antunes et al., 2010; El-Mowafy et al., 2017). La importancia de controlar este sistema radica en disminuir la presión evolutiva que se genera en las bacterias al ser tratadas con antibióticos, prolongar la vida útil de los mismos mediante el uso de terapias combinadas y el control de los factores de virulencia asociados al QS (Santhakumari & Ravi, 2019; Saeki et al., 2020; Vadakkan, 2020). Por lo tanto, inhibir el sistema QS permite reducir los procesos de virulencia como la formación de biopelículas, la producción de elastasas, proteasas y piocianina, los cuales se encuentran altamente relacionados con la patogenicidad que produce esta bacteria al actuar como una barrera de entrada a los antibióticos y causar daños citotóxicos en el huésped (Rasko & Sperandio, 2010; Lu et al., 2022). Es por esto que en los últimos años las investigaciones se han centrado en la búsqueda de este tipo de inhibidores para poder restaurar la eficacia de los antibióticos y potenciar la

respuesta de defensa del huésped como ventaja inicial sobre bacterias invasoras (Haque et al., 2018; Lu et al., 2022).

En este sentido las plantas han sido consideradas como una fuente importante para la búsqueda de inhibidores de QS, debido a que suelen producir una gran diversidad de metabolitos secundarios y a que varios de ellos han demostrado tener propiedades antimicrobianas frente a bacterias asociadas a enfermedades infecciosas (Carlson, 2002; Bouyahya et al., 2017; Mahavy et al., 2020). En la literatura hay varios estudios que describen el potencial anti QS de extractos proveniente de especies vegetales, sin embargo, cabe destacar que en la mayoría de estos no se ha incluido la identificación de los compuestos bioactivos (Adonizio et al., 2006; Zahin et al., 2010; Muñoz et al., 2018). Dentro de los tipos de metabolitos que más se ha reportado su potencial anti-QS, se encuentran los, flavonoides, derivados de ácido benzoico y cinámico, fenilpropanoides, cumarinas, diarilheptanoides, terpenos, taninos y alcaloides, entre otros (Bouyahya et al., 2017; Deryabin et al., 2019; Carette et al., 2020; Q. Li et al., 2022).

Entre las especies de plantas que podrían tener actividad sobre el QS de *P. aeruginosa* se encuentran las del género *Piper*, por sus usos etnobotánicos y muchas de las cuales se les han determinado su actividad, como antimicrobianas, antiparasitarias, antioxidantes, insecticidas, anticancerígenas y antifúngicas, entre otras (Chakraborty & Shah, 2011; Parra et al., 2011; Trivedi et al., 2011; Muñoz et al., 2018; Patiño et al., 2018; Parra Amin et al., 2019; Patiño-Bayona et al., 2021). En la literatura, aunque se reportan algunos estudios de actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* de extractos (*P. betel*, *P. nigrum*, *P. longum* y *P. umbellatum*), y de aceites esenciales (*P. nigrum*, *P. bogotense*, *P. eriopodon*, *P. brachypodom* y *P. bredemeyeri*) provenientes de especies del género *Piper*, son escasas las investigaciones sobre sus constituyentes químicos (Calderón et al., 2010a; Chakraborty & Shah, 2011; Vallejo et al., 2014).

A pesar del diverso potencial antimicrobiano que han presentado las especies del género *Piper* frente a bacterias patógenas, son limitados los estudios orientados a evaluar su efecto en el QS, particularmente sobre *P. aeruginosa*. Algunas de las especies que tienen potencial para inhibir el QS de bacterias Gram negativas son

el extracto de *P. betle* que inhibe la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* (75%) (Ratridewi et al., 2021), el extracto de *P. nigrum* que inhibe la producción de violaceína de *C. violaceum* (95%) (Vázquez-Martínez et al., 2020), los aceites de *P. bogotense*, *P. brachypodon* y *P. bredemeyeri* que inhiben la producción de violaceína de *C. violaceum* (CI₅₀ 513, 93 y 45 ppm) (Olivero V et al., 2011) y el aceite de *P. nigrum* que inhibe la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* (26%) (Amrutha et al., 2017). Es importante destacar que son limitados los reportes para las especies de *Piper* sobre la evaluación de los factores de virulencia y la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa*. En este sentido el objetivo de este trabajo contempló la identificación de sustancias naturales inhibidores del sistema QS provenientes de especies del género *Piper*. Esto contempló, la primera fase de investigación que consistió en la evaluación del potencial anti-QS de extractos de especies de *Piper*. Seguido se realizó el estudio fitoquímico de una de las especies con mayor potencial anti-QS. Por último, se evaluó el potencial de compuestos aislados e identificados en especies de *Piper* sobre algunos factores de virulencia y la formación de biopelícula de *P. aeruginosa*.

Objetivos

Objetivo general

Establecer el efecto de sustancias provenientes de algunas especies del género *Piper* como inhibidores del sistema Quorum Sensing.

Objetivos específicos

- Identificar algunas especies del género *Piper* con potencial de inhibición sobre el sistema Quorum Sensing
- Realizar el estudio fitoquímico dirigido sobre una de las especies con mayor potencial de inhibición de Quorum Sensing para el aislamiento e identificación de los metabolitos bioactivos.
- Determinar el potencial de los constituyentes químicos presentes en especies del género *Piper* sobre algunos factores de virulencia asociados al sistema QS de *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Estado actual del tema

1.1 Importancia de las enfermedades infecciosas a nivel mundial y en Colombia

Una de las principales causas de mortalidad y morbilidad son las enfermedades infecciosas (EI), las cuales tienen un gran impacto en países que se encuentran en el trópico, ya que las condiciones climáticas favorecen la adaptación y la aparición de patógenos, el origen de nuevas infecciones y el incremento de bacterias patógenas multirresistentes (González, 2019; Hidalgo & Woc-Colburn, 2020; Hortal, 2015). Algunos aspectos importantes que favorecen la aparición de estas enfermedades son el cambio climático, demográfico, tecnológico y antropogénico (Tillotson & Zinner, 2017). En cuanto al cambio climático este desempeña un papel importante en el riesgo de propagación de patógenos, ya que las condiciones ambientales pueden llegar a alterar el rango y la densidad de las especies promoviendo su interacción y aumentando el riesgo de zoonosis. También es importante considerar que el cambio climático, afecta el reservorio ambiental y el comportamiento de los agentes patógenos. En el aspecto demográfico es importante tener en cuenta que entre los aspectos que permiten un aumento en la propagación de patógenos está el aumento en las tasas de urbanización en zonas densas y altamente conectadas y el rápido crecimiento de la población en países de bajos y medianos ingresos que viven en condiciones de hacinamiento. Entre otros aspectos, los viajes internacionales han permitido que haya un movimiento cada vez más rápido de personas y con ello la exposición a los agentes patógenos (Tillotson & Zinner, 2017; Baker et al., 2021).

Las infecciones son causadas por un agente infeccioso (virus, hongos, helmintos, protozoos, bacterias, etc.) o por productos tóxicos de los mismos, a un huésped que es susceptible (Straif-Bourgeois et al., 2014). Dentro de las estadísticas a nivel mundial de transmisión y control de las EI, se destaca que el VIH/SIDA, coronavirus, influenza, malaria y tuberculosis son las más investigadas por su alta frecuencia de incidencia (Wang et al., 2020; Sweileh, 2022). En un estudio sobre la frecuencia de brotes de estas enfermedades en todo el mundo entre el año 1980-2013 se identificaron 12.102 brotes para 215 enfermedades infecciosas humanas

que ocurrieron en 219 países, así mismo que las bacterias y los virus correspondían al agente etiológico del 70% de las enfermedades y los que causaron el 88% de los brotes a lo largo del tiempo (Smith et al., 2014). Para el año 2019, al menos 7 millones de personas en el mundo murieron por alguna EI, lo cual representa aproximadamente el 12% de todas las muertes a nivel mundial y ubicándose dentro las 10 principales causas de muerte (Wang et al., 2020; OMS, 2020; Bhattarai et al., 2021).

Las infecciones de tipo bacteriano representan una mortalidad de por lo menos 700.000 casos al año en todo el mundo, debido a la resistencia que presentan los microorganismos a los medicamentos. Se estima que para el año 2050 si no se toman medidas preventivas esta cifra puede llegar a alcanzar los 10 millones de casos (O'Neill, 2016; Bhattarai et al., 2021). Este tipo de infecciones han sido de gran importancia debido al aumento de cepas multirresistentes y la inefectividad de los tratamientos hacia las mismas. Las bacterias que más requieren atención y que han sido catalogadas como de prioridad crítica por la OMS son: *K. pneumoniae*, *Acinetobacter spp*, *P. aeruginosa*, especies de *Enterobacter*, *Enterococcus faecium* y *S. aureus*, ya que están asociadas a las principales causas de morbilidad y mortalidad. Estas bacterias han presentado resistencia frente a medicamentos de tipo carbapenémicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, glicopéptidos, betalactámicos, macrólidos, entre otros (OMS, 2017; Niewiadomska et al., 2019; Bhattarai et al., 2021).

En Colombia para los últimos tres años (2019 – 2022) las EI y parasitarias son la segunda causa de mortalidad en hombres y mujeres, según el reporte del Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE (Dane, 2022). El Instituto Nacional de Salud (INS) ha reportado que dentro de las enfermedades con mayor frecuencia entre los años 2016 a 2022 fueron la infección respiratoria aguda grave, tos ferina y sífilis gestacional. Adicionalmente, cabe resaltar que las infecciones asociadas a dispositivos (IAD) han aumentado en los últimos años, lo que puede estar relacionado con el aumento de contagios de COVID-19, siendo las UCI el lugar en donde se presentaron los mayores casos de afectación y cuyos

principales microorganismos relacionados con estas infecciones son *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis* (INS, 2022).

Esta es una problemática de importancia de salud pública a nivel mundial, ya que muchos de los tratamientos terapéuticos para contrarrestar los microorganismos resistentes ya no son eficaces, trayendo como consecuencias periodos prolongados de tratamiento, aumentando los costos hospitalarios y la muerte de los pacientes (Serra-Valdés, 2017). En este sentido la OMS ha establecido un plan de acción mundial con objetivos estratégicos que permitan tomar medidas para prevenir y controlar la resistencia bacteriana. Dentro de estas estrategias se incluye la implementación de políticas de restricción para optimizar el uso de los antibióticos, reforzar la investigación para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y concientizar a las personas sobre las consecuencias de esta problemática (Camou et al., 2017; Mendoza et al., 2019).

1.2 Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae) es considerada un patógeno oportunista que favorece el desarrollo de infecciones de tipo nosocomial en pacientes inmunodeprimidos, con cáncer, quemaduras o que presentan algún tipo de infección respiratoria. Adicionalmente, puede llegar a causar infecciones del tracto urinario, neumonías, bacteriemias, fibrosis quística, meningitis y endocarditis (Ochoa et al., 2013; Bru et al., 2019). Esto se debe a su amplia distribución en el ambiente (suelo, agua, animales y plantas), a que puede sobrevivir en niveles bajos de nutrientes, soportar temperaturas de 42 °C y a su capacidad para formar biopelículas (Ochoa et al., 2013; Luján Roca, 2014). Esta capacidad de acondicionamiento le permite crear un reservorio de infección para las personas hospitalizadas, ya que facilita su supervivencia en superficies hospitalarias y equipos médicos (respiradores, humidificadores, y catéteres urinarios) (OMS, 2003; Samame & Samalvides, 2014; Smith & Hunter, 2008; Zúñiga Carrasco & Caro Lozano, 2017).

De esta manera *P. aeruginosa* ha sido reportado como uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en países desarrollados con una prevalencia del 3-12% (Europa 7%) y en los países subdesarrollados entre

el 5-19% con predisposición a ser multi-resistente (Silva et al., 2020) En este sentido, varios estudios a nivel mundial se ha documentado la prevalencia de *P. aeruginosa* en ámbitos hospitalarios, por ejemplo, en el Hospital de Geneva en Suiza se reportó que el 20% de los pacientes hospitalizados adquieren alguna infección causada por *P. aeruginosa* y su mortalidad puede llegar a representar más del 30% (Eggimann & Pittet, 2001). Así mismo en otros estudios se determinó que *P. aeruginosa* corresponde a uno de los patógenos con mayor frecuencia en infecciones en UCI con valores de prevalencia que varían entre un 10% al 27% en muestras poblacionales entre 600 a 8000 pacientes (Vincent et al., 2009; Molina et al., 2011; Denisuik et al., 2019; Salmanov et al., 2019)

De esta manera, muchas de las infecciones en ámbitos hospitalarios, específicamente en las UCI, corresponde a *P. aeruginosa* multirresistentes de ahí su importancia clínica (Duijn et al., 2022).. Con respecto a su epidemiología, en un estudio previo se analizó su distribución, frecuencia y mortalidad para 25 países de los cinco continentes, encontrándose que, de 526 aislamientos de pacientes de UCI, 175 correspondían a *P. aeruginosa* multidrogoresistente y la mortalidad estaba alrededor del 50% con respecto al total de pacientes infectados. También encontraron que el continente Europeo fue el que presentó el mayor número de casos donde la mayoría correspondían para España, seguido de Asia, Australia y Américas (Karakonstantis et al., 2020). Otro ejemplo, es un estudio donde se analizó la presencia de cepas resistentes asociada a neumonía adquirida en 54 países del mundo con una muestra poblacional de 3193 pacientes, encontrándose que la región Sudamérica ocupó el tercer lugar con mayor prevalencia y el segundo en infecciones resistentes a antibióticos, y Colombia como el país en el que se presentó el 10% de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos (Restrepo et al., 2018). La región de Latinoamérica no es ajena a este panorama, por ejemplo, en un estudio realizado en la UCI de un hospital de Ecuador con 100 pacientes, se encontró que el 13% de estos estaban contagiados con *P. aeruginosa* multirresistente (Farfan & Paladines, 2019). De la misma manera se presentó para Perú donde de 150 pacientes hospitalizados por infección del tracto urinario se reportó que el 33% de los aislados correspondían a *P. aeruginosa* multirresistentes (Paniagua, 2019).

La multirresistencia de *P. aeruginosa* se ha considerado una amenaza importante en la última década, los centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDD) en Estados Unidos, han reportado 2700 muertes aproximadamente y se estima que los costos asociados a atención médica pueden llegar a incrementarse hasta 100 billones de dólares del producto interno bruto mundial (PIB) (Solomon & Oliver, 2014; Tabak et al., 2019). En este sentido, estas cifras reflejan la importancia de adelantar estudios orientados a la búsqueda de nuevos métodos para el control de este tipo de microorganismos

1.2.1 Métodos de control para *P. aeruginosa*

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* normalmente son controladas con antibióticos de tipo carbapenémicos (imipenem, meropenem y doripenem), quinolonas, beta-lactámicos y aminoglucósidos (Botelho et al., 2019). Sin embargo, en los últimos años ha sido difícil su control, ya que este patógeno ha mostrado tener la capacidad de ser resistente a varios de ellos. Por ejemplo, se ha reportado que de 106 aislamientos de este patógeno el 88,7% presenta resistencia antibióticos como las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos limitando así las opciones de tratamiento (Alikhani et al., 2014; Corehtash et al., 2015). Incluso el hecho de que esta bacteria sea resistente a varios tratamientos terapéuticos ha llevado a replantear el uso de otros antibióticos como la colistina, que ya habían salido del mercado por su alta toxicidad (Barrio-Tofiño et al., 2019; López-Causapé et al., 2018; Salinas et al., 2010).

En Colombia se ha documentado los perfiles de resistencia de *P. aeruginosa* desde el año 2008 hasta 2017, encontrándose un aumento en el porcentaje de resistencia de este patógeno a carbapenémicos de 39% en 2013 a 41% en el 2016. Además, supera el 50% para otros antibióticos como: imipenem (68,8%), meropenem (70,4%), gentamicina (73,2%), ciprofloxacina (72,7%), ceftazidima (69,2%) y aztreonam (51,2%) (Leal et al., 2014; Leal et al., 2017; Germen, 2019).

Como estrategias para contrarrestar la resistencia, se ha propuesto la combinación entre los antibióticos de tercera generación, que tiene como ventaja el efecto sinérgico al incrementar la sensibilidad del patógeno por lo menos a uno de los antibióticos utilizados y disminuir la resistencia. Dentro de los grupos de

antibióticos más conocidos con sinergismo para el control de *P. aeruginosa* se encuentran los beta-lactámicos y aminoglucósidos (Bodí & Garnacho, 2007). Sin embargo, también existen desventajas en cuanto a los costos elevados, al riesgo de aumento de la toxicidad y la infección por microorganismos más resistentes; por lo que se requiere de un seguimiento riguroso para evitar que se generen mutaciones asociadas a la resistencia (Brunel & Guery, 2017).

Así mismo, entre las otras sustancias empleadas para el control de este microorganismo se encuentra el uso frecuente de antisépticos y desinfectantes (digluconato de clorhexidina, cloruro de benzalconio, triclosán y formaldehído) en los hospitales, centros de salud y laboratorios. Sin embargo, sobre estos productos también se ha llegado a reportar resistencia por la bacteria, mediante su confirmación por estudios de expresión de genes implicados en la resistencia (Vásquez-Giraldo et al., 2017). Teniendo en cuenta esta susceptibilidad reducida a los biocidas, es importante considerar que también se puede dar una resistencia cruzada con los antibióticos, dificultando aún más su eliminación (Cabrera et al., 2007; Ignak et al., 2017; Vásquez-Giraldo et al., 2017; Namaki et al., 2022).

Entre otros tipos de control se encuentran las terapias de fagos, uso de probióticos y prebióticos, y los fármacos antivirulencia. Dentro de estos últimos se destacan inhibidores de la transmisión de señales que logran la comunicación celular (QS), ya que durante mucho tiempo los tratamientos tradicionales que se han utilizado para combatir las enfermedades infecciosas basado en la erradicación o inhibición del crecimiento de las bacterias, han ejercido una presión selectiva generando más resistencia (Lozano, 2017).

1.2.2 Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa presenta diversos mecanismos de resistencia, que la hacen capaz de resistir a varios tipos de antibióticos y de esta manera le permite prevalecer y permanecer en el huésped. Los principales mecanismos de resistencia se clasifican en tres formas, la resistencia intrínseca, adquirida y adaptativa. A continuación, se describe cada una con sus respectivos mecanismos.

La resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca es la capacidad innata de la bacteria para disminuir la eficacia de los antibióticos por medio de mecanismos que incluyen características funcionales o estructurales relacionadas. Dentro de los mecanismos de resistencia intrínseca incluyen mecanismos en la permeabilidad de la membrana, sistemas de salida y enzimas que inactivan o modifican los antibióticos (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022)

- Permeabilidad de la membrana

P. aeruginosa tiene una membrana externa que funciona como barrera selectiva para evitar el ingreso de los antibióticos, dentro de esta se encuentra un tipo de proteínas llamadas porinas que se ubican en la membrana externa de la bacteria. Su principal función es facilitar la captación pasiva de aminoácidos a través de la membrana externa, un tipo de porina presente en *P. aeruginosa* es la OprD. Cuando se presenta una baja ausencia de porinas, causa que haya poca permeabilidad de la membrana externa e impide el paso de moléculas (antibióticos), generando resistencia (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022).

- Sistemas de salida

Las bombas de expulsión son un complejo enzimático de membrana llamado MexAB-OprM, que son capaces de expulsar al exterior sustancias alifáticas que tienen como objetivo destruir a la bacteria. Está conformado por una proteína bomba que está en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en un espacio periplasmático y un canal de salida en la membrana externa, que ocasiona la impermeabilidad a la mayoría de los antibióticos. Existen 12 sistemas de expulsión que difieren en sus sustratos, sin embargo, MexAB-OprM es la bomba de expulsión implicada en la resistencia a fluoroquinolonas y la patogenicidad de la bacteria (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022).

- Enzimas

Dentro de las enzimas que tienen la capacidad de descomponer los antibióticos en *P. aeruginosa* se encuentran enzimas modificadoras de aminoglucósidos y las B-lactamasas. Estas últimas son un tipo de enzimas que pueden hidrolizar el anillo B-lactámico de los antibióticos, lo que ocasiona destrucción del sitio activo y pérdida de la actividad. Están clasificadas en diferentes grupos como: penicilinas, cefalosporinas o carbapenemasas, dependiendo del antibiótico que vaya a ser atacado por la enzima. Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos tienen tres mecanismos comunes: aminoglucósido fosfotransferasa (APH), aminoglucósido acetiltransferasa (AAC) y aminoglucósido nucleótido transferasa (ANT). Estos mecanismos ejercen resistencia sobre varios tipos de antibióticos (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022).

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida de *P. aeruginosa* se logra por medio de la transferencia horizontal de genes de resistencia o bien por cambios mutacionales que se generen (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022).

- Resistencia por mutaciones

La resistencia por mutaciones llega a ocasionar sobreexpresión de los sistemas de flujo, inactivación o modificación de los antibióticos, lo cual permite que la bacteria sobreviva en presencia de sustancias antimicrobianas (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022).

- Adquisición de genes de resistencia

A través de la transferencia horizontal de genes la bacteria puede adquirir transposones, integrones, plásmidos y profagos, que pueden llevar una gran variedad de genes de resistencia a antibióticos, codificando proteínas que inactivan el antibiótico o afectan el transporte al interior de la célula, o incluso cambios mutacionales en la misma (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022).

Resistencia adaptativa

Para la resistencia intrínseca adaptativa se logra mediante mecanismos como resistencia mediada por biopelículas o generación de células persistentes. La biopelícula funciona como barrera de difusión para reducir el acceso de los antibióticos a la célula bacteriana, y en la formación de esta se ven implicados sistemas de regulación de dos componentes, exopolisacáridos, así como también el sistema QS (Pang et al., 2019; Espinoza & Esparza, 2021; Qin et al., 2022; Ahmed, 2022).

1.3 Importancia del Quorum sensing

Teniendo en cuenta que la problemática sobre la resistencia antimicrobiana se sigue extendiendo en todo el mundo y que los antibióticos utilizados han perdido eficacia, representado una grave amenaza para la salud, se requiere la implementación de nuevas alternativas terapéuticas. Adicionalmente, la patogenicidad de algunas bacterias está dada por la expresión de genes de virulencia que son regulados por el sistema QS. (Holden et al., 2000; Bassler & Losick, 2006; Papenfort & Bassler, 2016). Dentro de estos procesos se encuentran los factores de virulencia, bioluminiscencia, motilidad, formación de biopelículas, pigmentos, entre otros (Bassler & Losick, 2006; Papenfort & Bassler, 2016).

De esta manera se ha propuesto inhibir el QS de las bacterias, por su capacidad de controlar los factores de virulencia del patógeno, lo cual permite anular las señales de comunicación sin que interfiera en su crecimiento (Chioro et al., 2015; Zhao et al., 2020). Dentro de las ventajas de inhibir este sistema, se encuentra que sólo va a afectar a las bacterias diana permitiendo que la microbiota del paciente sea preservada, reducir los efectos adversos y evitar el efecto biocida frente al patógeno disminuyendo la presión selectiva y por ende los mecanismos de resistencia (Lozano, 2017; Zhao et al., 2020).

1.3.1 Sistemas Quorum Sensing, mecanismos y moléculas autoinductoras.

El QS funciona como sistema de comunicación de célula a célula regulado por la densidad celular. En un aumento de ésta densidad se da inicio a la síntesis de

moléculas autoinductoras (AI) dentro de la célula, que se difunden en el medio extracelular a través de la membrana celular y posteriormente forman complejos con receptores específicos, activando las cascadas de transducción de señales lo cual resultará en un cambio en la expresión genética de la población y en una serie de procesos celulares que favorecen la colonización de la bacteria en el huésped (Figura 1-1) (Papenfert & Bassler, 2016; Zhao et al., 2020)

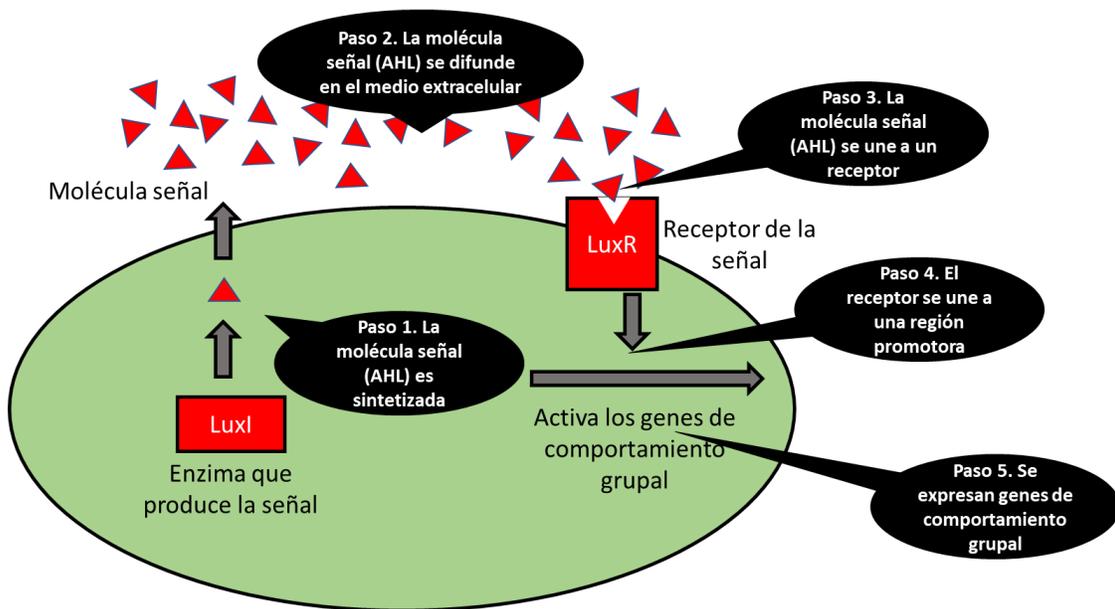


Figura 1-1. Etapas del quórum sensing.

(elaboración propia).

Los sistemas QS han sido más estudiados para las bacterias Gram negativas en comparación con las Gram positivas. Entre las moléculas autoinductoras más conocidas son las N-acil-homoserina-lactonas (AHLs), que son sintetizadas por la familia de proteínas sintetas homólogas LuxI, mientras que para las bacterias Gram positivas corresponden a sustancias peptídicas (Holden et al., 2000; Bassler & Losick, 2006). En las bacterias Gram negativas, dependiendo de la especie, estas moléculas pueden variar en el número de carbonos (4-18) y tener algunas modificaciones en su cadena acilada, pero conservando siempre el núcleo de AHL. Esto le confiere una “huella dactilar” a la especie a la hora de comunicarse y de esta manera encajar con su receptor asociado. También se han identificado otro

tipo de familias químicamente distintas a las AHL, como las proteínas PhcB en *Ralstonia solanacearum* y las proteínas RpfF en *Xanthomonas campestris* (Figura 1-2) (Bassler & Losick, 2006; Papenfort & Bassler, 2016).

Entre las bacterias que tienen la capacidad de producir y detectar varios autoinductores son *Vibrio harveyi*, *Vibro cholerae*, *P. aeruginosa* y especies de *Photobacterium*. *V. harveyi* fue la primera bacteria en la que se descubrió que producía varios autoinductores y que aún sigue siendo el modelo principal de estudio en el QS. Esta utiliza tres tipos de autoinductores una AHL (3OH-C₄-HSL), un autoinductor de cólera 1 (CAI-1) (Z)-3-aminoundec-2-en-4-ona) producida por enzimas CqsA, y el otro autoinductor es el AI-2 que derivan de 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona producido por la DPD sintasa (Holden et al., 2000; Bassler & Losick, 2006; Papenfort & Bassler, 2016). En cuanto a *P. aeruginosa*, esta utiliza dos autoinductores de AHL (3-oxo-C₁₂-HSL y C₄-HSL), dipéptidos cíclicos como IQS (2-(2-hidroxifenil) tiazol-4- carbaldehído) producido por proteínas codificadas por un grupo de genes de péptido sintasa ribosomal (ambBCDE) y dos quinolonas denominadas PQS (2-heptil-3- hidroxil-4-quinolona) y HHQ la cual es precursora de la anterior (2-heptil-4-quinolona) que son producidas por proteínas codificadas por un grupo de genes denominado *pqsABCDH*. Esta diversidad estructural de moléculas autoinductoras evidencia la multifuncionalidad que tienen las bacterias para fortalecer su sistema QS (Holden et al., 2000; Bassler & Losick, 2006; Papenfort & Bassler, 2016; Zhao et al., 2020).

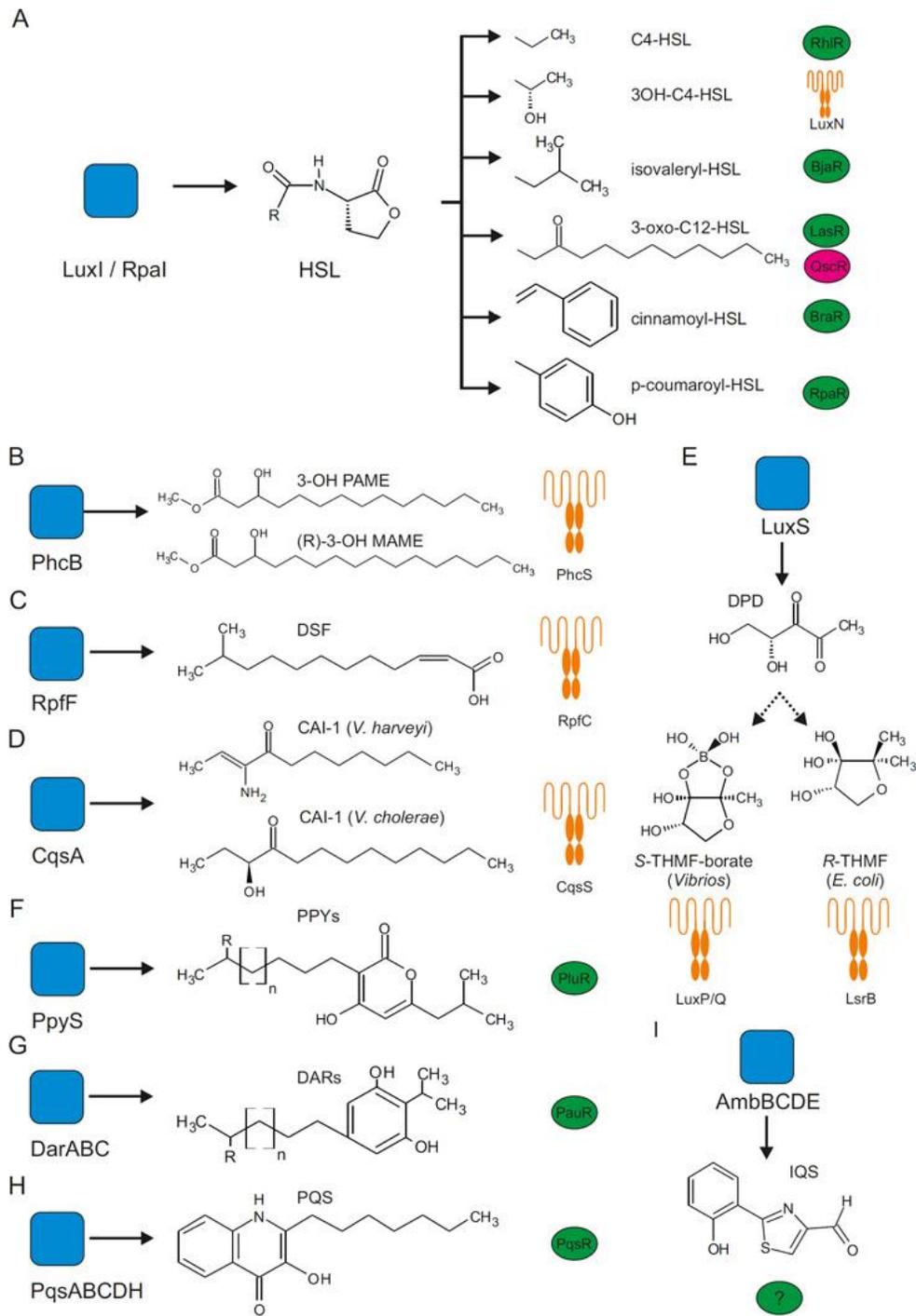


Figura 1-2. Diversidad estructural de moléculas autoinducoras y receptores del QS en bacterias Gram negativas.

Tomado de: (Papenfort & Bassler, 2016).

1.3.2 Blancos específicos para la inhibición de QS

Teniendo en cuenta que todos los sistemas QS tienen común tres mecanismos básicos que son: producir la molécula autoinductora, la acumulación y la detección de la misma, se considera que los inhibidores de QS pueden influir en al menos uno de estos mecanismos como blancos específicos (Bertini, 2018).

- **Inhibición de la biosíntesis de las moléculas autoinductoras**

Interferir con la síntesis de AHL es un enfoque directo y sencillo para la inhibición de la detección de QS, al bloquear las principales enzimas de la vía de síntesis de la molécula autoinductora inhibiendo su producción y de esta manera QS. Existen muy pocos estudios sobre inhibidores de la síntesis de AHL, sin embargo, se han encontrado sustancias que son análogos a la molécula s-adenosilmetionina (SAM) la cual cumple un papel importante en la biosíntesis de AHLs (Figura 1-3). Se ha encontrado que, debido a la naturaleza universal de SAM en organismos vivos, el uso de esta estrategia como inhibidor de QS puede causar efectos secundarios negativos y esto ha hecho que se limiten las investigaciones sobre este mecanismo (Parsek et al., 1999; Hirakawa & Tomita, 2013).

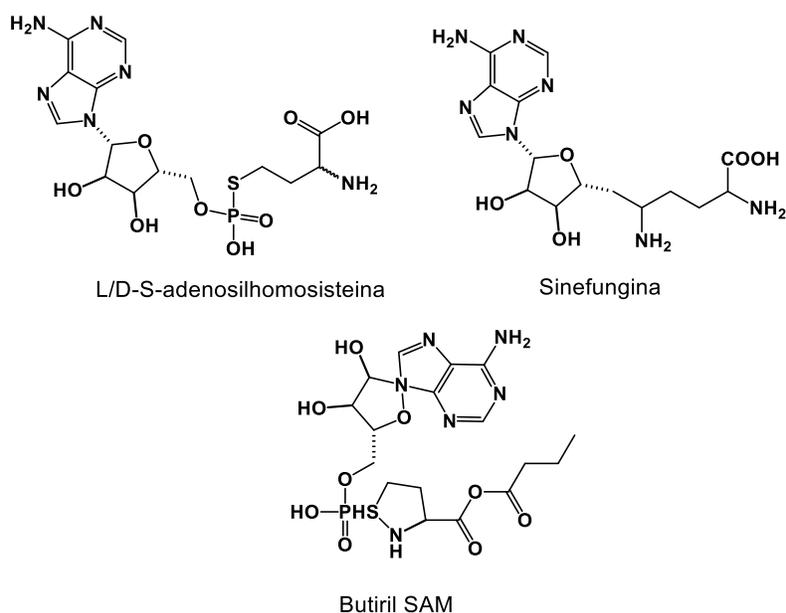


Figura 1-3. Moléculas homólogas a SAM que inhiben el QS.

Tomado de (Parsek et al., 1999)

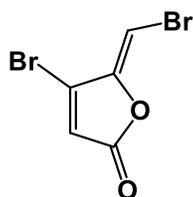
- **Inhibición e inactivación de las moléculas autoinductoras**

Inhibir o inactivar las moléculas AI por enzimas catalíticas, es una estrategia alternativa, ya que permiten degradar estas señales por diferentes mecanismos de acción y por consiguiente ya no están activas y ocurre el fenómeno de “extinción de quorum”. En este sentido se ha encontrado que algunas plantas y bacterias son capaces de producir enzimas que degradan las AHLs, como enzimas catalíticas como las lactonasas, amidasas, acilasas, reductasas y las citocromo oxidasas (Hirakawa & Tomita, 2013).

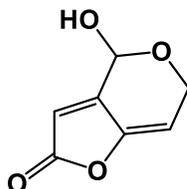
- **Inhibición del receptor AHL**

Dentro de las etapas del QS implica que la señal de AHL se una al receptor LuxR, por lo tanto, la idea de encontrar moléculas antagonistas que interfirieran con esta unión es una estrategia para la inhibición del QS. En la figura 1-4 se presentan algunas de estas moléculas antagonistas (Hirakawa & Tomita, 2013). Se ha demostrado, que el anillo lactónico de las AHLs tiene una función importante cuando se forma el complejo LuxR/AHL, por este motivo buscar moléculas con estructura similar son un blanco importante para lograr antagonizar la función de las AHLs. En este sentido, se han sintetizado moléculas análogas a las AHL con modificaciones estructurales en: 1) Anillo de lactona. 2) Cadena lateral de acilo y 3) Partes de lactona y acilo. También se ha demostrado que algunos compuestos naturales se comportan como antagonistas al ser estructuralmente similares a las AHL, por ejemplo, las acil-furanonas halogenadas derivadas de algas marinas como de *Delisea pulchra* (figura 1-4) (Hirakawa & Tomita, 2013; Chbib, 2020). Adicionalmente a la vez se han encontrado moléculas que inhiben los receptores AHL y no están relacionadas estructuralmente con AHL (figura 1-4) (Chbib, 2020).

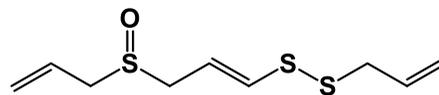
A. Receptores antagonistas



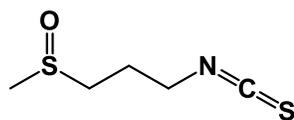
C30 furanona



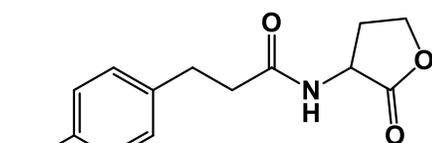
Patulina



Ajoeno

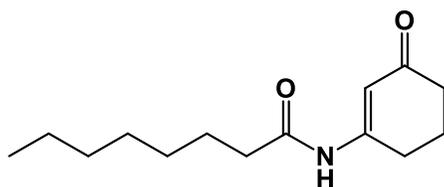


Iberin

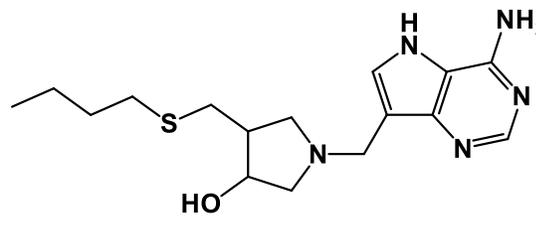


4-bromofenilpropionil-HSL

B. Inhibidores de la síntesis de señales



J8-C8 (N-(3-oxociclohex-1-en-1-il)octanamida



BuT-DADMe-Immucillin A

Figura 1-4. Moléculas antagonistas para el receptor LuxR.

Tomado y modificado de: (Hirakawa & Tomita, 2013)

▪ Captura de la señal

Cuando se mantiene una alta concentración de AHLs el QS persiste, por lo tanto, encontrar moléculas que intercepten AHL actuarían como inhibidores de detección de QS. Tal es el caso de las ciclodextrinas, conocidas por formar complejos con compuestos orgánicos, capaces de atrapar a las AHLs y de esta manera disminuir la producción de pigmentos. Este tipo de inhibidores siguen aún en estudios, ya que ha presentado problemas de solubilidad y baja estabilidad al formar el complejo ciclodextrina-AHL (Hirakawa & Tomita, 2013; Chbib, 2020).

1.3.3 Métodos de detección de inhibidores de QS

Interferir con los procesos relacionados con el QS se ha considerado una estrategia antivirulencia interesante para contrarrestar las enfermedades ocasionadas por bacterias y de esta manera restaurar la tolerancia a los medicamentos utilizados. Se encuentran diversas estrategias para identificar inhibidores del QS (IQS) entre los cuales se encuentran la detección basada en bioensayos, metodologías químicas, cribado virtual de moléculas IQS, entre otras, (Lu et al., 2022).

- **Detección de IQS por medio de bioensayos**

Dentro de las estrategias para identificar compuestos con capacidad de inhibir el QS, se ha propuesto realizar un screening de diferentes organismos, tales como hongos, bacterias, plantas medicinales, cultivos celulares, tejidos y bibliotecas químicas. Para la detección de compuestos inhibidores de QS se usan biosensores que expresan un fenotipo controlado por este sistema de comunicación y que puede ser fácilmente observable y medible, por ejemplo, la extracción de pigmentos, expresión enzimática, fluorescencia, movilidad y formación de biofilms (Pang et al., 2019b; Lu et al., 2022).

Los enfoques para la detección de IQS en bioensayos, se basan en pruebas colorimétricas con cepas bioindicadoras como la producción de bioluminiscencia en especies de *Vibrio* spp, que tiene sus redes de QS bien caracterizadas. Así mismo se ha propuesto la cuantificación de pigmentos como la violaceína en *Chromobacterium violaceum*, prodigiosina en *Serratia marcescens*, prometazina naranja en *S. aureus* y piocianina en *P. aeruginosa*, entre otras (Santhakumari & Ravi, 2019; Lu et al., 2022). A modo de ejemplo *C. violaceum* es una bacteria que ha sido ampliamente estudiada en la detección de sistemas de QS, ya que varias cepas han sido modificadas con plásmidos involucrados en QS y sólo funcionan en presencia de AHLs específicas C6HSL. *C. violaceum* es capaz de producir y detectar las AHLs por sí misma y expresa un pigmento de color violeta llamado violaceína (McClellan et al., 1997; Lu et al., 2022). Las moléculas de señalización de este sistema están altamente conservadas y han sido caracterizadas en sistemas de detección de QS como sistemas homólogos de diversas bacterias asociadas

con infecciones bacterianas, como, por ejemplo, las AHLs identificadas en bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* (Rai et al., 2015; Mohajeri et al., 2023).

Por otra parte, algunas bacterias son capaces de expresar fenotipos característicos como la formación de biopelículas. Este último ha cobrado gran importancia ya que esta matriz de exopolisacáridos actúa como una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y que son sostenidos por una matriz adhesiva y protectora impidiendo el ingreso de los antibióticos. La biopelícula ha afectado diferentes actividades en la industria alimenticia, en la medicina y en la agricultura y se considera que es probablemente la forma de vida dominante de las bacterias, por lo que su control ha sido un enfoque importante para la regulación del QS (Høiby et al., 2010; Rasamiravaka et al., 2015; Thi et al., 2020). Teniendo en cuenta que estas técnicas han demostrado algunas limitaciones al no determinar el mecanismo de acción, se ha recomendado realizar ensayos más específicos entre los que se incluyen la expresión génica, estudios de acoplamiento molecular y pruebas bioquímicas que permitan realizar una aproximación a los mismos (Santhakumari & Ravi, 2019; Lu et al., 2022).

- **Enfoque químico**

Desde el punto de vista químico, se han diseñado estrategias de síntesis diferentes a las tradicionales para la búsqueda de nuevos inhibidores de QS, como las nuevas técnicas en fase sólida, como por ejemplo macromatrices y micromatrices (Kushwaha et al., 2018). Así mismo, y con ayuda de la química combinatoria se puede lograr que el proceso de obtención e identificación sea más rápido y sencillo. Adicionalmente se han identificado receptores de QS por técnicas de cromatografía de afinidad, la cual permite interacciones con el ligando y el receptor, y de esta manera se propone como herramienta para la purificación e identificación de biomoléculas (Kushwaha et al., 2018; Lu et al., 2022). Por otra parte, se ha planteado el diseño de anticuerpos para apagar el QS, ya que son altamente específicos y podrían inactivar el sitio catalítico o secuestrar las AI, siendo una estrategia bastante esperanzadora que contribuye en la investigación para el desarrollo de nuevas vacunas (Kushwaha et al., 2018; Lu et al., 2022)

- **Cribado virtual**

Para complementar los métodos tradicionales en la identificación de IQS, la evaluación virtual basada en estructuras y farmacóforos, se ha vuelto una estrategia prometedora en el descubrimiento de IQS. Este enfoque encaja bien con las proyecciones de alto impacto (HTS) que permiten acelerar los procesos de identificación por medio de grandes bibliotecas de compuestos en menor tiempo. Estos procesos representan una alternativa de bajo costo y eficaz con respecto a los métodos tradicionales, sin embargo, es importante tener en cuenta que estas predicciones *in silico* puede dar resultados de falsos positivos o falsos negativos. En este sentido se propone la evaluación de pruebas combinadas basados en estructura actividad para minimizar este sesgo y además contribuir en el diseño de nuevos fármacos (Zhong et al., 2020; Lu et al., 2022).

1.3.4 Quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*

Según las investigaciones, esta bacteria presenta una variedad de sistemas relacionados con el QS, lo cual le confiere una capacidad enorme de ser resistente al poder controlar diversas actividades fisiológicas en respuesta a cambios ambientales (Luján Roca, 2014; López-Causapé et al., 2018; Ahator & Zhang, 2019).

El sistema QS de *P. aeruginosa* está comprendido como una red de cuatro circuitos interconectados de manera jerárquica, que lleva a cabo la producción de algunos factores de virulencia (Figura 1-5). Dos de los sistemas que conforman esta red son: Las y Rhl están basados en lactonas de N-acil-homoserina (AHL), otro que corresponde a PQS (sistema de señal de quinolona *Pseudomonas*), basado en la molécula 2-alkil-4-(1H)-quinolona (AQ); y un sistema recientemente descubierto correspondiente al IQS el cual utiliza como molécula señal 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído, el cual integra las condiciones de estrés ambiental con la red de QS. En muchos casos estos sistemas vienen regulados principalmente por el sistema Las ya que controla la activación de los circuitos Rhl, PQS y IQS, sin embargo, en ausencia de del sistema Las, el circuito PQS ha mostrado que puede activarse de manera tardía para continuar con su función (Lee & Zhang, 2015; Malgaonkar & Nair, 2019).

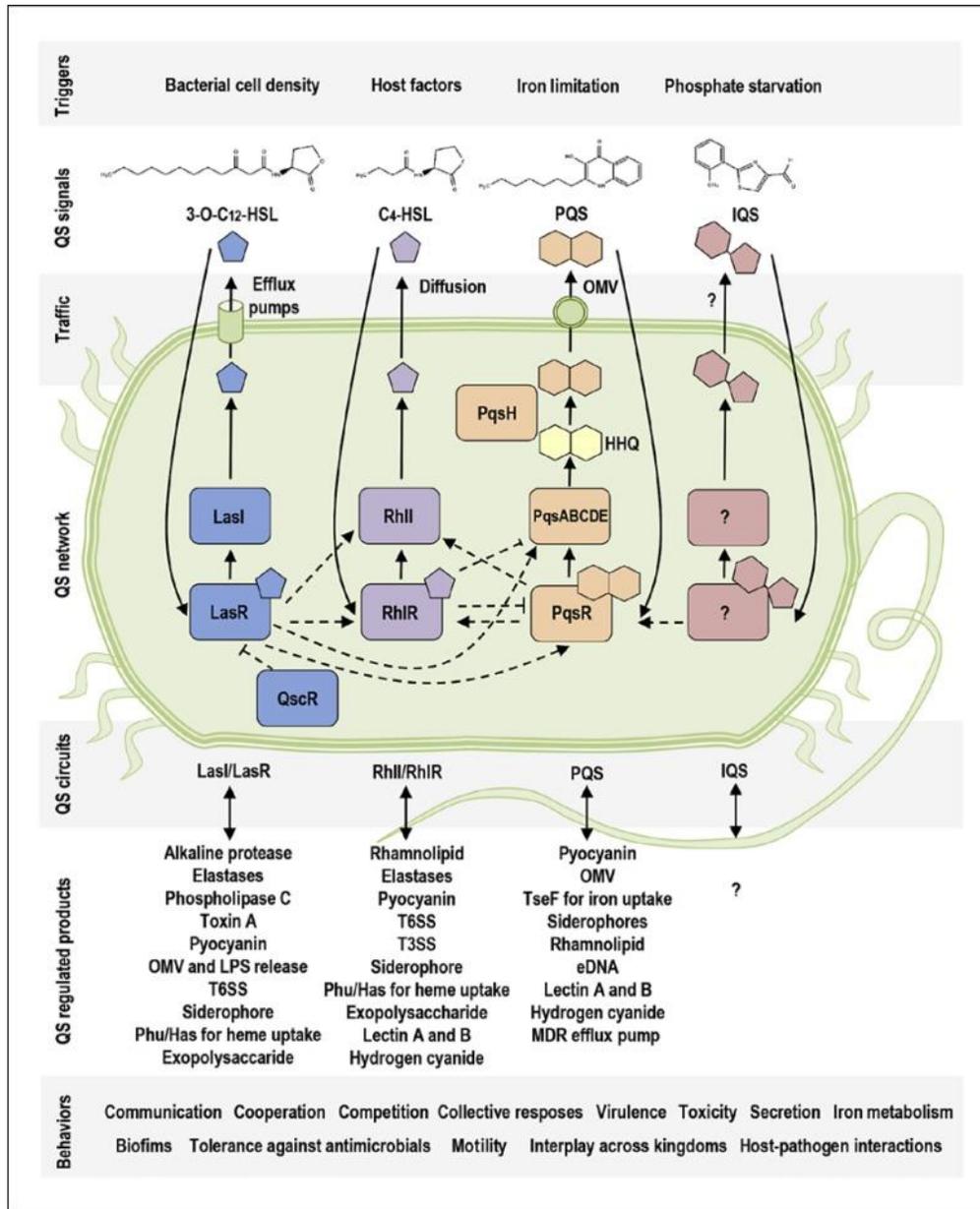


Figura 1-5. Esquema del circuito de detección de Quorum Sensing mediado por cuatro tipos de sistemas que regulan los factores de virulencia de *P. aeruginosa*.

Tomado de: (Turkina & Vikström, 2019).

1.3.5 Biofilm y factores de virulencia

La patogenicidad de *P. aeruginosa* es multifactorial y depende de múltiples factores de virulencia, que pueden ser muy beneficiosos para la bacteria cuando existe una

alta densidad poblacional (Kostylev et al., 2019). Algunos de estos factores de virulencia están regulados por el sistema QS, permitiendo la inducción o inactivación de genes que los codifican. Dentro de los factores de virulencia que puede llegar a controlar el sistema QS de *P. aeruginosa* se incluyen, la proteasa alcalina, pioverdina, fofolipasa C, exoproteasas, exotoxina A, (regulados por Las); los ramnolipidos y cianuro de hidrogeno (regulados por Rhl); elastasas y exopolisacáridos (regulados por Las y Rhl), piocianina (regulada por Las, Rhl y PQS) (regulado por Las, Rhl), entre otros (Rather et al., 2022). Adicionalmente todo el circuito QS, tiene la capacidad de regular genes implicados en la formación de biopelículas y la motilidad (Antunes et al., 2010; Christine & Maurer, 2015; Papenfort & Bassler, 2016; Turkina & Vikström, 2019). Estos productos asociados al sistema QS de *P. aeruginosa* están regulados por los diferentes sistemas que lo conforman, sin embargo, es importante tener en cuenta que existen otros reguladores globales que pueden estar interconectados al circuito QS (Karatuna & Yagci, 2010)

En cuanto a la función de las proteasas y elastasas, estas juegan un papel importante en la degradación de proteínas inmunoregulatoras que afectan al huésped, con la degradación de tejidos y adquisición de hierro (Rocha et al., 2019). *P. aeruginosa* secreta diferentes tipos de proteasas que cumplen con funciones particulares: la proteasa *LasA* que tiene actividad estafilolítica, la elastasa *LasB* que modifica la superficie inicial para la invasión bacteriana y la proteasa alcalina que junto con la *LasB* ayudan a *P. aeruginosa* a evadir el sistema inmunitario (Rather et al., 2021; Peerzada et al., 2022). También se ha encontrado que la elastasa *LasB* puede iniciar la vía de la formación de biopelícula con la activación del nucleósido difosfato quinasa (NDK), por lo que inhibir este factor se convierte en un objetivo multifactorial al interferir con diferentes procesos patogénicos de manera simultánea (Cathcart et al., 2011).

Por otra parte, las cepas de esta bacteria tienen la capacidad de producir pigmentos, denominados piocianina y pioverdina responsable del color verde azulado brillante y amarillo fluorescente, respectivamente (Luján Roca, 2014). La piocianina puede llegar a provocar efectos proinflamatorios y oxidativos

ocasionando daño a las células jugando un efecto protector contra las especies reactivas de oxígeno que son producidas por el sistema inmune (Paz-Zarza et al., 2019).

Adicionalmente la capacidad de formar biofilm de *P. aeruginosa*, funciona como un factor de virulencia que se compone de una matriz extracelular compuesta de exopolisacáridos (EPS), proteínas de unión y ADN, que dificultan la acción antimicrobiana (Luján Roca, 2014). Los EPS constituyen por lo menos el 85% del total de biomasa del biofilm y contribuye a la arquitectura de la biopelícula. El proceso de adherencia comienza con una bacteria que se fija a una superficie y se forma una microcolonia, luego segrega exopolisacáridos formando estructuras en forma de red, que posteriormente empiezan agregar más células microbianas, las cuales van a ser útiles para la comunicación celular (figura 1-6). De este modo la formación de la biopelícula funciona como una barrera de entrada a los antibióticos, favoreciendo así la colonización en el huésped (Høiby et al., 2010; Thi et al., 2020).

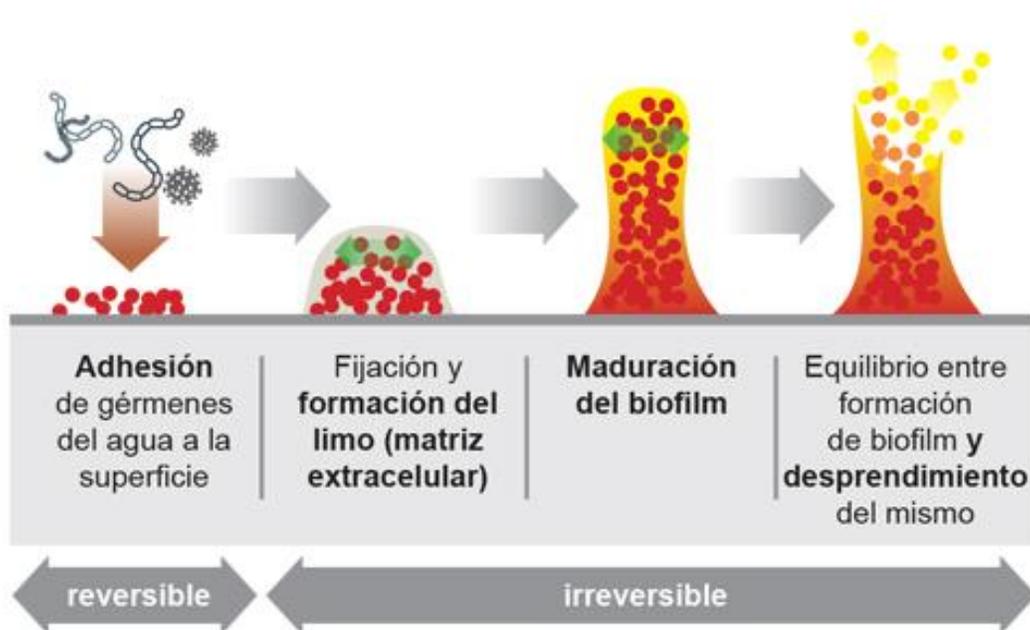


Figura 1-6. Etapas de la formación de la biopelícula.

Tomado de: (Carette et al., 2020)

Otros factores de virulencia que tiene *P. aeruginosa* y que pueden generar una patogénesis multifactorial se encuentra: lipopolisacáridos, flagelo, pili tipo IV,

sistema de secreción tipo III, exotoxina A, alginato y los sistemas de secreción tipo IV, (Luján Roca, 2014; El-Shaer et al., 2016; Rocha et al., 2019). Algunos de estos son los lipopolisacáridos participan en la activación de respuestas inmunes innatas y adquiridas del hospedero, y desencadenan respuestas de inflamación desreguladas. Por otra parte, el pili tipo IV está relacionado en la adhesión tisular induciendo daño en el tejido y diseminación del patógeno, y también le confiere movilidad de tipo “swarming” a la bacteria. Los sistemas de secreción van a proporcionar toxinas importantes como Exo A, Exo T, Exo S Exo U y Exo, las cuales influyen en el proceso de apoptosis (Rocha et al., 2019).

1.3.6 Plantas como fuente de inhibidores de QS

Dentro de las formas de vida encontramos que el reino de las plantas es de vital importancia para los seres vivos, ya que son fuente de vida al tener la capacidad de producir su propio alimento. Los usos de las plantas se relacionan mucho con la diversidad cultural, ya que es la misma sociedad la que le da ese valor agregado cuando son utilizadas para satisfacer sus necesidades (Usman et al., 2014). Es así como las plantas nos proporcionan numerosos beneficios, ya sea a nivel alimenticio, medicinal, artesanal, domestico, industrial, estéticos y en la agricultura. Algunos ejemplos de plantas que se usan ampliamente para el consumo, como especias y condimentos son *Zingiber officinale*, *Solanum nigrum*, *Piper nigrum* y *Oriza sativa*, para el control de inundaciones a *Cynodon dactylon* y en la medicina tradicional a *Calendula officinalis*, *Aloe vera* y *Taraxacum officinale* (Bruschi et al., 2014; Galvis & Torres, 2017)

En la medicina tradicional las plantas durante mucho tiempo han sido utilizadas para tratar algunas afecciones, especialmente por comunidades indígenas, poblaciones que se ubican en zonas tropicales en todo el mundo y población de adulto mayor (Carlson, 2002; Bouyahya et al., 2017). En el mundo aproximadamente existen 500.000 especies vegetales de las cuales en Colombia al ser un país biodiverso cuenta con aproximadamente 50.000 y tan sólo el 10% ha tenido un valor medicinal atribuido por tribus indígenas (Fonnegra G. & Jiménez R., 1999). Debido al potencial de las plantas en el tratamiento de diversas

enfermedades, muchas de ellas han sido utilizadas para el desarrollo de nuevos fármacos. En este sentido las plantas se consideran una fuente importante de principios activos, ya que tienen compuestos con importantes actividades biológicas, como antivirales, antioxidantes, anticancerígenos, antifúngicos y citotóxicos (Bahmani et al., 2015; Hernández et al., 2015).

Dado que los compuestos de origen natural proporcionan una diversidad estructural interesante que pueden mejorar sinérgicamente la actividad de algunos medicamentos, se han realizado varios estudios de plantas para el control del QS de *P. aeruginosa* (Borges et al., 2016). A partir de una revisión bibliográfica de los últimos cinco años se identificaron algunas plantas con potencial inhibición en la formación de biopelícula, y factores de virulencia (piocianina, proteasa, elastasa, swarming y swimming) tabla 1-1. Se resalta que las familias más estudiadas fueron Myrtaceae, Apiaceae, Fabaceae y Lamiaceae. Entre las especies más estudiadas y con mayor actividad se encuentra *Quercus infectoria* (Fagaceae) y *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), seguidas de otras especies como *Centella asiatica* (Apiaceae), *Cassia alata* (Fabaceae), *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), *Quercus infectoria* (Fagaceae) *Myrmecodia tuberosa* (Rubiaceae), *Cinnamomum verum* (Lauraceae) y *Curcuma xanthorrhiza* Roxb (Zingibereaceae) (Vasavi et al., 2016; Bahari et al., 2017; Banerjee et al., 2017; Rekha et al., 2017; Ahmed & Salih, 2019; Alva et al., 2021).

Tabla 1-1. Reportes de actividad anti-QS de extractos de plantas sobre *P. aeruginosa*.

| Especie | Familia | Órgano | Tipo extracto o fracción | Cepa | CMI (mg/mL) | Resultado (concentración mg/mL) | | | | | | Referencia |
|---------------------------|-----------|---------|--------------------------|-----------------|-------------|---------------------------------|--|--------------|-------------|----------------------|-------------|---------------------------|
| | | | | | | Biofilm (cristal violeta) | Pigmentos | Swarmin g | Swimiin g | Proteasa | Elastasa | |
| <i>Cinnamomun verum</i> | Lauraceae | Hojas | EtOH | ATCC 15692 | 0,5 | 80.3 % (0.25) | 94 % (0.25) | 71 % (0.25) | NR | NR | 81 % (0.25) | (Lakshmanan et al., 2018) |
| <i>Quercus infectoria</i> | Fagaceae | agallas | EtOH | aislado clínico | 2.5 | DO 490 nm 0.2 (1) | µg de piocianina producido por µg de proteína total (0.55) | 15 mm (1) | 23 mm (1) | DO 420 nm 0.31 (1) | NE | (Ahmed & Salih, 2019) |
| | | | AcOEt | | 5 | DO 490 nm 0.2 (2.5) | µg de piocianina producido por µg de proteína total (0.54) | 8.5 mm (2.5) | 16 mm (2.5) | DO 420 nm 0.24 (2.5) | | |
| | | | n-butanol | | 10 | DO 490 nm <0.2 (5) | n-butanol µg de piocianina producido por µg de proteína total (0.60) | 14 mm (5) | 27 mm (5) | DO 420 nm 0.30 (5) | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------|-------------|---------------------------|---------------|-----|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|-----------------------------|
| | | Parte aérea | acetona | ATCC 1430 | 0.3 | 70.1 % (0.3) | 89.1 % (0.3) | NE | NR | 78.1 % (0.3) | 73.3 % (0.3) | (Karbasiza de et al., 2017) |
| | | agallas | metanol | ATCC 27853 | 0.2 | 48.1 % (0.1) | NR | 5 mm (0.1) | NR | NR | 37.1 % (0.1) | (Mohabi et al., 2017) |
| | | | | PAO 1 salvaje | 0.2 | 54 % (0.1) | | 6 mm (0.1) | | | 59.1 % (0.1) | |
| | | | | PAO1 (MH873) | 0.2 | 4 % (0.1) | | 6 mm (0.1) | | | 46.1 % (0.1) | |
| | | | | MS.PS.50 / 35 | 0.2 | 50.1 % (0.1) | | 5 mm (0.1) | | | 65.1 % (0.1) | |
| | | | | PAO (300) | 0.2 | 56 % (0.1) | | 6 mm (0.1) | | | 50.1 % (0.1) | |
| <i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb | Zingiberaceae | Rizoma | Etanol | ATCC 35554 | 0.2 | 78.3 % (200) | 84.3 % (200) | 72.1 % (200) | NR | NR | NR | (Othman et al., 2019) |
| <i>Myrmecodia tuberosa</i> | Rubiaceae | Tubérculo | Extracto Etanol | PAO 1 | 1 | 18.1 % (1) | NI | NI | NI | NR | NR | (Hertiani et al., 2018) |
| | | | Fracción Metanol | | 1 | 68.1 % (1) | NI | 10.1 % (1) | 25.1 % (1) | | | |
| | | | Fracción Hexano | | 1 | 69.1 % (1) | 11.6 mm (6) | NI | 25 % (1) | | | |
| | | | Fracción Acetato de etilo | | 1 | 97.1 % (1) | 12.1 mm (6) | 76.8 % (1) | 84.1 % (1) | | | |
| | | | Fracción Agua | | 1 | 30.1 % (1) | NI | 52.2 % (1) | 5.1 % (1) | | | |

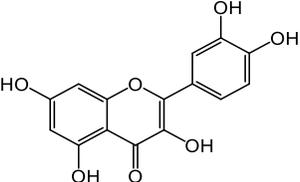
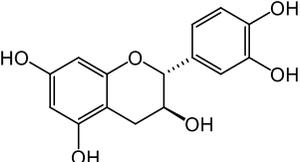
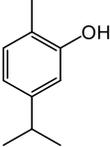
54 Efecto inhibitorio de sustancias provenientes de especies del género *Piper* sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

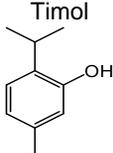
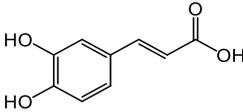
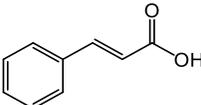
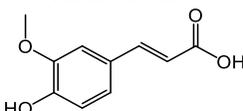
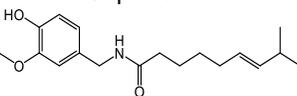
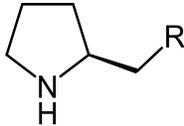
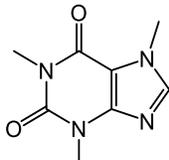
| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------------|----------------|---|-------|------|---------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|--|
| <i>Centella asiatica</i> | Apiaceae | Hojas | EtOH (Fracción activa en <i>C. violaceum</i> AcOET) | PAO 1 | 0.05 | 80.1 % (0.4) | 98.1 % (0.4) | 9.1 % (0.5) | NE | 98.1 % (0.4) | 98 % (0.4) | (Vasavi et al., 2016; Banerjee et al., 2017) |
| | Apiaceae | Hojas | Etanol | PAO 1 | 0.5 | MBIC50 (1) | NE | 52.4 % (1) | 54.3 % (1) | NE | NE | |
| <i>Andrographis paniculata</i> | Acantaceae | Hojas | | | 1 | MBIC50 (1) | NE | 51.4 % (1) | 44.3 % (1) | NE | NE | |
| | Acantaceae | Toda la planta | Clorofor mo | PAO 1 | 5 | 75.2 % (1.25) | 90.3 % (1.25) | 86.2 % (1.25) | NE | 100 % (1.25) | 87.3 % (1.25) | (Banerjee et al., 2017) |
| | | | metanol | | >5 | 51.9 % (1.25) | 61 % (1.25) | 68 % (1.25) | | 92.5 % (1.25) | 72.7 % (1.25) | |
| agua | >5 | 25.1 % (1.25) | 17 % (1.25) | | NI | 39.6 % (1.25) | 23.1 % (1.25) | | | | | |
| <i>Cassia alata</i> | Fabaceae | Hojas | Etanol (fraccion de acetato de etilo) | PAO 1 | 0.4 | >90.1 % (0.4) | >90.1 % (0.4) | 75.1 % (0.4) | NE | >90 % (0.4) | >90 % (0.4) | (Rekha et al., 2017) |

NR: No reporta

Entre los metabolitos que han presentado potencial para inhibir el QS de *P. aeruginosa* se presentan en la tabla 1-2, donde se destacan flavonoides, alcaloides, fenilpropanos y terpenos (Bouyahya et al., 2017; Deryabin et al., 2019; Carette et al., 2020; Q. Li et al., 2022). Otros compuestos que se destacan son los reportados para el extracto de *Centella asiática*, donde la actividad anti-QS frente a *C. violaceum* y *P. aeruginosa* PAO 1 es atribuida a los flavonoides en especial a kaempferol y quercetina (Vasavi et al., 2016). En otro estudio donde evaluaron extractos de la familia Zingiberaceae encontraron que, compuestos fenólicos como zingerona y 6-gingerol a 500 ppm pueden inhibir QS en la producción de piocianina (*P. aeruginosa*) y violaceína (*C. violaceum*) en un 35% y 52% respectivamente (Vijendra Kumar et al., 2014). Otro estudio realizado para la especie *Syzygium jambos* se determinó que los compuestos bioactivos en la atenuación de los factores de virulencia y la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* son: 5-hidroximetil-2-furfural y Betulina (Rajkumari et al., 2018). Finalmente, *Allium sativum* tiene sustancias anti-QS como el ajoene y catequina (Vandeputte et al., 2010; Jakobsen et al., 2012).

Tabla 1-2. Compuestos naturales con actividad inhibitoria del QS de *P. aeruginosa*

| Tipo | Compuesto | Resultado (concentración µg/mL) | | | | |
|-------------|---|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| | | Biopelícula | Proteasa | Elastasa | Piocianina | Referencias |
| Flavonoides | Quercetina  | 52% (16) | 40 % (16) | 37 % (16) | 60% (16) | (Ouyang et al., 2020) |
| | Catequina  | 50-90% (1000) | 20-49% (1000) | 50-90% (1000) | 50-90% (1000) | (Vandeputte et al., 2010) |
| Terpenos | Carvacrol  | 70% (7,9 µM) | NR | NR | 60% (7,9 µM) | (Tapia-Rodriguez et al., 2017) |

| | | | | | | |
|---------------|--|-------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------------------|
| | <p>Timol</p>  | NI | NR | NR | 92% (1 mol) | (James Bound et al., 2020) |
| Fenilpropanos | <p>Ácido cafeico</p>  | 35% (4 mmol/L) | NR | NR | 15% (4 mmol/L) | (Ugurlu et al., 2016) |
| | <p>Ácido cinámico</p>  | 45% (4 mmol/L) | NR | NR | 20% (4 mmol/L) | |
| | <p>Ácido ferúlico</p>  | 45% (4 mmol/L) | NR | NR | 18% (4 mmol/L) | |
| Alcaloides | <p>Capsaicina</p>  | 20% (50) | NR | NR | NR | (Rivera et al., 2019) |
| | <p>(R)-Norbgugaine</p>  <p>R= (CH₂)₁₂CH₃</p> | 83% (1,8 mM) | NR | NR | 37% (1,8 mM) | (Majik et al., 2013) |
| | <p>Cafeína</p>  | 50-90% (1000) | 20-49% (1000) | 50-90% (1000) | 50-90% (1000) | (Sethupathy et al., 2016) |

NR: No reporta.

Estos estudios reflejan que las plantas pueden ser una fuente potencial para controlar el sistema QS de *P. aeruginosa* y de esta manera ser una alternativa para mejorar la respuesta a los antibióticos. Adicionalmente, es importante resaltar que Colombia cuenta con un alto potencial para dirigir las investigaciones en la

búsqueda de nuevos principios activos y de esta manera plantear nuevas estrategias terapéuticas (B. González et al., 2001; Carlson, 2002; Carreño, 2016; Bouyahya et al., 2017).

1.4 Generalidades del género *Piper*

El nombre del género *Piper* es correspondiente al latín para “Pimienta” (peperi = pimienta), refiriéndose a su especie más representativa *P. nigrum* (Muñoz-Schick et al., 2012; Sotelo, 2016). Este pertenece a la familia Piperaceae la cual hace parte del orden *Piperales*, dentro del grupo *Magnoliidea*. Esta familia es una de las más grandes del mundo y se registra que es una de las más antiguas de la humanidad (Torres-Hormaza et al., 2020; Bernal, 2022). Tiene un gran número de géneros y especies que la componen con aproximadamente diez géneros y aproximadamente 4000 especies en el mundo (García Barriga, 1992; Bernal, 2022). Los principales géneros que la constituyen son: *Piper*, *Peperomia*, *Trianaeopiper*, *Ottonia*, *Arctottonoa*, *Macropiper*, *Manekia*, *Pothomorphea*, *Sarcorachis*, *Verhuellia* y *Zippelia*. Las especies de esta familia tienen una alta importancia económica, comercial y medicinal, dentro de las que se destacan especies como *Piper nigrum* que es usada como condimento, *Piper betle* como estimulante, *Piper ornatum* con usos ornamentales, *Piper sarmentosum* y *Piper retrofractum* usadas como plantas medicinales, entre otras (Parmar et al., 1997; Suwanphakdee et al., 2016; Sen et al., 2019; Trujillo & Vargas, 2022; Bernal, 2022).

1.4.1 Distribución a nivel mundial y en Colombia

El género *Piper* es uno de los géneros más abundante de la familia Piperaceae que comprende cerca de 1457 especies en el mundo que se encuentran en zonas entre los 0 a 2500 m de altitud y algunas a los 3000 m (The plant list, 2021). Se distribuyen principalmente en regiones tropicales y subtropicales de la región de las Américas, Sur de Asia, Malasia y unas pocas en África e islas del pacífico (figura 1-7). En América las regiones Andina y Centro América albergan la mayor parte de las especies descritas (POWO, 2022; Trujillo & Vargas, 2022). En Colombia se encuentran aproximadamente 693 especies de la familia Piperaceae ampliamente distribuidas en los géneros *Piper* (415 spp.) y *Peperomia* (277 spp.) encontrándose

con mayor riqueza en la región Andina, Pacífica, Caribe, Amazonia y Orinoquía (García Barriga, 1992).



Figura 1-7. Distribución mundial del género *Piper*.

Tomado de: (POWO, 2022)

1.4.2 Aspectos morfológicos y taxonómicos

El género *Piper* cuenta con aproximadamente 2000 especies descritas que a su vez se distribuyen en 9 subgéneros y un complejo llamado *Piper sanctum*, *Piper cinereum* (Jaramillo et al., 2008). La clasificación taxonómica del género *Piper* se resume en la figura 1-8.

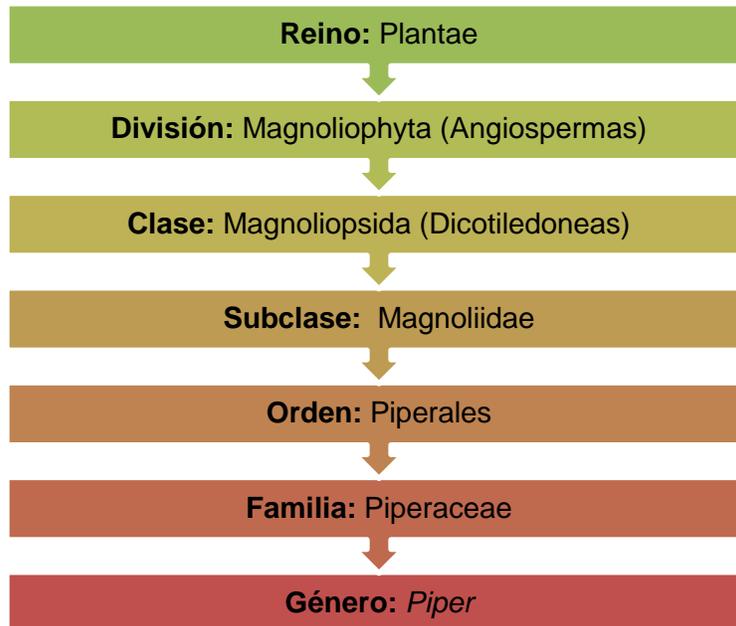


Figura 1-8. Clasificación taxonómica del género *Piper*.

Las especies de *Piper* tienen una alta variación morfológica, por lo que se hace necesario tener en cuenta los caracteres más importantes para su clasificación taxonómica (figura 1-9). Algunas características se mencionan a continuación:

En cuanto a los aspectos morfológicos se conoce que el prófido, correspondiente a la primera hoja de una rama axilar que generalmente cubre el vástago del tallo y que se ubica entre el peciolo y el pedúnculo, suele estar presente en la mayoría de las especies y pueden presentarse en color rojo o verde blanquecino, deciduos o persistentes o formar un anillo persistente. En algunas especies puede ser succulento como en *P. crassinervium*. El tallo contiene entrenudos que pueden tener colores característicos al secarse y también fisuras, algunas especies tienen verrugas cercanas al nudo o sobrecrecimientos epidérmicos. El peciolo puede tener una prolongación lateral que se extiende a lo largo del mismo o desarrollarse parcialmente. También pueden tener sobrecrecimientos epidérmicos y dimórficos. En cuanto a las hojas, estas pueden ser alternas, pecioladas, simples, enteras, lobuladas, palmatinervias o plinervias, poseen tricomas en la parte abaxial generalmente de diferente tipo y densidad. Las inflorescencias son su carácter más importante y de alto valor para su caracterización, son en forma de cordoncillo solitarias o compuestas, su orientación puede ser peduncular, erecta o arqueada,

los colores pueden ser distintos y se observan en la bráctea floral. El pedúnculo en algunas especies es de color vino tinto y por último, sus frutos que generalmente son bayas o drupas pueden ser negros o verdes y a veces no son visibles (Trujillo & Vargas, 2022).

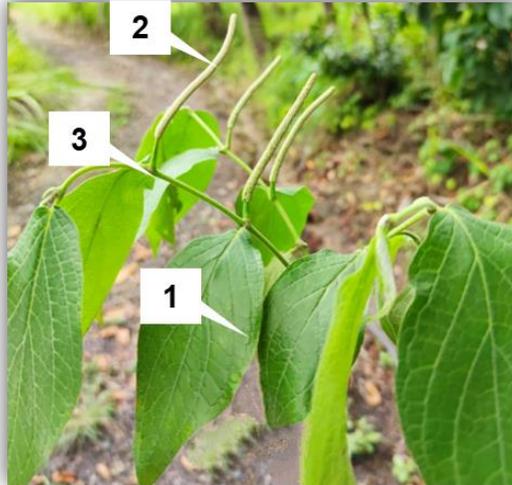


Figura 1-9. Principales características morfológicas del género *Piper*. 1. Hojas simples, alternas y nervadas. 2. Inflorescencias en cordoncillo. 3. Tallos nudosos
(Elaboración propia)

El hábito de estas especies generalmente suelen ser arbustos que surgen en el sotobosque, sin embargo, también se encuentran como arbóreas, lianescente, sarmentosos, herbáceas o sufrútices. La mayoría de las especies suelen ser umbrófilas (que habitan en la sombra), pero especies abundantes como *P. aduncum* pueden ser heliófilas (que habitan en zonas abiertas y con abundante luz). Para algunas especies, la caracterización de su hábito suele ser diagnóstico para su identificación (Trujillo & Vargas, 2022).

1.4.3 Usos etnobotánicos de especies del género *Piper*

Las especies del género *Piper* han sido ampliamente utilizadas en el mundo por presentar una variedad de aplicaciones en la industria, en la medicina y con fines alimenticios (Ghosh et al., 2014). Estas especies representan para la economía un alto valor agregado, debido a su amplia variedad de usos alimenticios y medicinales por comunidades ancestrales, entre las que se destaca *P.*

methysticum, *P. aduncum*, *P. nigrum* y *P. marginatum* (Siges et al., 2005; Roersch, 2010; Maciej et al., 2011; Nagori et al., 2011; Cáceres & Kato, 2014; Durant-Archibold et al., 2018; Salehi et al., 2019; Sen et al., 2019). La especie más representativa del género es *P. nigrum* que es conocida por producir la pimienta que se usa ampliamente en preparaciones alimenticias, por su uso como repelente de insectos y a nivel medicinal para tratar infecciones respiratorias (Siddiqui et al., 2005; Sen et al., 2019). La especie *P. methysticum* es otra de las especies representativas del género, la cual es usada comúnmente en la preparación de bebidas sedantes, tratamiento del asma y también en infecciones urinarias (Brown-Joel et al., 2018). Otra especie conocida es *P. betle* comúnmente utilizada en preparaciones tradicionales como estimulante y para tratar infecciones respiratorias (Nagori et al., 2011; Ghosh et al., 2014; Sen et al., 2019). La especie *P. sarmentosum* es también ampliamente conocida por sus usos medicinales para tratar el reumatismo, por sus propiedades culinarias y pesticidas (Farhana Syed Ab Rahman, 2016). Varios de los usos etnomedicinales que presentan las especies de *Piper* están relacionados con el potencial como fungicida, insecticida, bactericida y anticancerígeno (Navickiene et al., 2006; Carmona-Hernández et al., 2014; Muñoz et al., 2018; Patiño-Bayona et al., 2021). Otras especies de este género que tiene reportes de usos medicinales se relacionan en la tabla 1-3.

Tabla 1-3. Usos etnobotánicos de especies del género *Piper*.

| Especie | Órgano | Uso etnobotánico | Lugar | Referencia |
|-----------------------|----------------|---|-----------------|---------------------------------|
| <i>P. nigrum</i> | Hojas | Alimenticio, repelente de insectos, cataplasmas para tratar afecciones pulmonares | África | (Suroowan & Mahomoodally, 2016) |
| <i>P. methysticum</i> | Raíces | Calmante, relajante muscular, | Islas Pacíficas | (Brown-Joel et al., 2018) |
| | | Tratamiento para el asma, infecciones del tracto urinario | | (Baguley et al., 2016) |
| <i>P. betle</i> | Hojas | Tratamiento de desórdenes respiratorios | África | (Suroowan & Mahomoodally, 2016) |
| <i>P. sarmentosum</i> | Hojas y raíces | Tratamiento de reumatismo | China | (Li & Xing, |

| | | | | |
|----------------------|----------------|---|------------------------------|---|
| | | | | 2016) |
| <i>P. aduncum</i> | Hojas | Antimicótico, y antimicrobiano | Amazonas | (Fosberg et al., 1990) |
| | Hojas y frutos | Tratamiento de eripelas, cistitis, desordenes digestivos | Brasil | (Brazão et al., 2014) |
| | Raíces | Tratamiento estomacal y respiratorio | New Guinea | (Siges et al., 2005) |
| <i>P. bogotense</i> | Hojas | Dolor de cabeza, estomago, dermatitis y desinfectante | Colombia | (Tene et al., 2007; Calderón et al., 2010b) |
| <i>P. hispidum</i> | Hojas | Tratamiento antihemorrágico y diurético | Brasil | (J. K. R. da Silva et al., 2014) |
| | | Tratamiento de la malaria | Colombia | (Friedrich et al., 2005) |
| | | Tratamiento contra la conjuntivitis, diarrea y hemorragias | Panamá | (M. P. Gupta et al., 1993) |
| <i>P. peltatum</i> | Hojas y raíces | Tratamiento de malaria, leishmaniasis, y hepatitis | Brasil | (da Silva Pinto et al., 2009) |
| <i>P. umbellatum</i> | Raíces | Tratamiento en infecciones urinarias, de la piel, digestivos, antiinflamatorios | África, Asia y Latinoamérica | (Roersch, 2010) |
| | Hojas | Cicatrizante | Indonesia | (Silalahi et al., 2015) |

Adicionalmente las especies de *Piper* se resaltan por presentar importantes actividades biológicas atribuyendo su potencial como fungicida, insecticida, bactericida y antihelmíntica (Chakraborty & Shah, 2011; Carmona-Hernández et al., 2014; Muñoz et al., 2018; Patiño et al., 2018; Patiño-Bayona et al., 2021). Dentro de las aplicaciones medicinales se ha reportado que la especie *Piper betel* (extracto acuoso), ha presentado potencial antimicrobiano frente a *E. coli* (extracto acuoso), *S. aureus* (extracto metanólico) y *Proteus vulgaris* (extracto éter) (Chakraborty & Shah, 2011). Para las especies *Piper nigrum* y *Piper longum* se ha reportado actividad frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*

(Trivedi et al., 2011). Adicionalmente se ha reportado el potencial de especies de *Piper* con potencial como antifúngicos, frente a *Fusarium oxysporum f. sp. Passiflorae*, *Cladosporium cladosporoides*, *Botrytis Cinérea* (Navickiene et al., 2006; Parra et al., 2011; Parra Amin et al., 2019). Como insecticidas frente a *Sitophilus zeamais* (Patiño-Bayona et al., 2021) y como anticancerígeno en líneas celulares de pulmón, próstata y mama (Muñoz et al., 2018). Otros usos de actividad biológica para especies de este género se relacionan en la tabla 1-4.

Tabla 1-4. Actividades biológicas de especies de *Piper*.

| Especie | Órgano | Actividad biológica | Referencia |
|---|-----------------|--|--|
| <i>P. pertomentellum</i> , <i>P. asperiusculum</i> , <i>P. aduncum</i> , | Aceite esencial | Insecticida (<i>S. zeamais</i>) | (Celis et al., 2008; Patiño-Bayona et al., 2021) |
| <i>P. nigrum</i> | Hojas | Antibacteriano (<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>) | (Trivedi et al., 2011) |
| <i>P. betel</i> | Hojas | Antibacteriano (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Proteus vulgaris</i>) | (Chakraborty & Shah, 2011) |
| <i>P. eriopodon</i> , <i>P. aduncum</i> , <i>P. amalago</i> , <i>P. arboreum</i> , <i>P. arthante</i> , <i>P. asperiusculum</i> , <i>P. bogotense</i> , <i>P. cumanense</i> | Parte aérea | Anticancerígeno | (Muñoz et al., 2018) |
| <i>P. longum</i> | Hojas | Antibacteriano (<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>) | (Trivedi et al., 2011) |
| <i>P. aduncum</i> | Parte aérea | Antibacteriano (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>) | (Brazão et al., 2014) |
| | Frutos | Antifúngico (<i>Cladosporium cladosporoides</i>) | (Navickiene et al., 2006) |
| <i>P. bogotense</i> | Parte aérea | Antifúngico (<i>Trichophyton Rubrum</i> , <i>T. Mentagrophytes</i>) | (Tangarife-Castaño et al., 2014) |
| | | Antiparasitario (<i>Tripanosoma cruzi</i>) | (Leal et al., 2013) |

| | | | |
|------------------------|-------|---|----------------------|
| <i>P. cumanense</i> | Hojas | Antifungico (<i>Botrytis</i> <i>Cinerea</i> , <i>Fusarium</i> <i>Oxysporum</i>) | (Parra et al., 2011) |
| <i>P. lanceafolium</i> | Hojas | Antifungico (<i>C. albicans</i>) | (López et al., 2002) |
| <i>P. umbellatum</i> | Hojas | Antibacteriano (<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i> y <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>) | (Silva et al., 2014) |

1.4.4 Estudios fitoquímicos en el género *Piper*

En cuanto a la composición química de las especies del género *Piper*, esta ha sido ampliamente documentada, reportando una diversidad de compuestos aislados entre los que se resalta las amidas, crómenos, fenilpropanoides, terpenos, ácidos benzoicos, lignanos, algunos alcaloides y fenoles. (Parmar et al., 1997; do Nascimento et al., 2012; Salehi et al., 2019). Algunos de estos compuestos que han sido previamente documentados se relacionan en la figura 1-10.

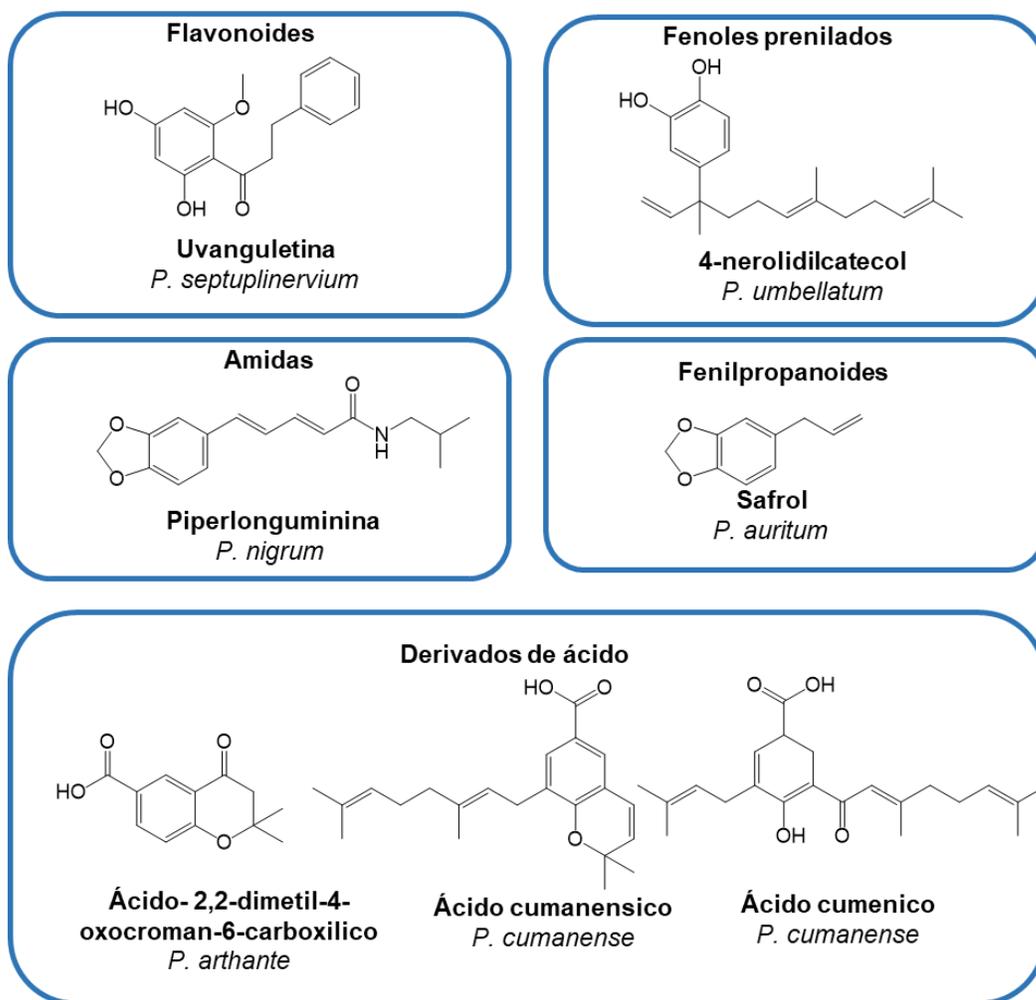


Figura 1-8. Metabolitos representativos del género *Piper*

1.4.5 Actividad antibacteriana e inhibitoria del QS de especies del género *Piper*

Las especies de *Piper* son fuente potencial de sustancias antibacterianas, por lo que se hace importante la búsqueda de nuevas sustancias que ayuden a controlar a bacterias multirresistentes como *P. aeruginosa*. Dentro de las especies de este género que tienen reporte de propiedades antimicrobianas se presentan en la tabla 1-4). Se ha reportado el potencial antimicrobiano de especies del género *Piper* frente a bacterias de importancia en salud pública entre las que se encuentra *Piper betle* frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Proteus vulgaris* (Chakraborty & Shah, 2011), y para *P. nigrum* y *Piper longum* frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *P.*

aeruginosa (Trivedi et al., 2011). Así mismo se demostró que *P. pesaresanum*, *P. daniel-gonzalezzi*, *P. glanduligerum*, *P. crassinervium* y *P. umbellatum* han tenido potencial inhibitorio frente a *P. aeruginosa* (Vallejo et al., 2014). De esta manera, a pesar de que varias especies de *Piper* han demostrado tener potencial antimicrobiano, no se les ha identificado los posibles constituyentes responsables de esta actividad.

Tabla 1-5. Estudios de actividad antimicrobiana de extractos de especies del género *Piper*.

| Espece | Tipo de muestra | Microorganismo | Método de bioensayo | Resultado | Referencia |
|---------------------|-----------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|
| <i>P. betle</i> | Hojas | <i>E. coli</i> | Difusión en disco | 3 mm (100 mg/mL) | (Chakraborty & Shah, 2011) |
| | | <i>S. aureus</i> | | 2.2 mm (100 mg/mL) | |
| | | <i>P. vulgaris</i> | | 2.5 mm (100 mg/mL) | |
| <i>P. nigrum</i> | Frutos | <i>S. aureus</i> | Difusión en disco | 25 mm (10 mg/mL) | (Trivedi et al., 2011). |
| | | <i>B. subtilis</i> | | 19 mm (10 mg/mL) | |
| | | <i>E. coli</i> | | 24 mm (10 mg/mL) | |
| | | <i>P. aeruginosa</i> | | 18 mm (10 mg/mL) | |
| <i>Piper longum</i> | Frutos | <i>S. aureus</i> | Difusión en disco | 24 mm (10 mg/mL) | (Trivedi et al., 2011). |
| | | <i>B. subtilis</i> | | 20 mm (10 mg/mL) | |
| | | <i>E. coli</i> | | 23 mm (10 mg/mL) | |
| | | <i>P. aeruginosa</i> | | 19 mm (10 mg/mL) | |
| <i>P.</i> | Parte | <i>P. aeruginosa</i> | Dilución en | Análisis | (Vallejo et al., |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------|----------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------|
| <i>pesaresanum</i> | aérea | | placa | cualitativo (+). Todas inhiben. | 2014). |
| <i>P. daniel-gonzalezzi</i> | | | | | |
| <i>P. glanduligerum</i> | | | | | |
| <i>P. crassinervium</i> | | | | | |
| <i>P. umbellatum</i> | | | | | |
| <i>P. tuberculatum</i> | Hojas | <i>P. aeruginosa</i> | Microdilución en caldo | CMI >1024 µg/mL | (Costa et al., 2010) |

Por otra parte, se ha reportado que los aceites esenciales de especies del género *Piper*, tales como *P. amalago*, *P. marginatum*, *P. hispidum* y *P. aduncum*., presentan potencial antimicrobiano frente a bacterias de importancia pública como *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa* (Majolo et al., 2019; Noriega et al., 2019). En la tabla 1-6 se reporta la actividad y la composición de los aceites para algunas especies del género *Piper*.

Tabla 1-6. Estudios de actividad antimicrobiana de aceites esenciales de especies del género *Piper*.

| Especie | Microorganismo | Método de bioensayo | CMI (µg/mL) | Composición | Referencia |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------|--|--------------------------------|
| <i>P. callosum</i> | <i>Aeromonas hydrophila</i> | MD | 3750 | safrol (67.0 %), metil eugenol (7.2 %), β-pineno (6.6 %) and α-pineno (6.4 %); | (Majolo et al., 2019) |
| <i>P. hispidinervum</i> | | | 3750 | safrol (89.3 %), miristicina (4.0 %), | |
| <i>P. hispidum</i> | | | 937.5 | γ-terpineno (27.3 %), p-cimeno (14.0 %) and α-terpineno (12.0 %). | |
| <i>P. marginatum</i> | | | 234.4 | δ-3-careno (13.1 %), propiopiperona (8.0 %), (E)-cariofileno (6.8 %). | |
| <i>P. amalago</i> L. | <i>E. coli</i> | MD | 50-200 | β -felandreno (20,42 %), espatulenol (10,34 %), biciclogermacreno | (Araujo Baptista et al., 2019) |
| | <i>S. aureus</i> | | 50-200 | | |

| | | | | | |
|----------------------|------------------------------|----|---------|---|------------------------|
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | | 100-200 | (8,50 %) y α -pineno (7,29 %). | |
| <i>P. aduncum</i> | <i>S. aureus</i> | MD | 500 | Dilapiol (76.5%) miristicina (2.1%), apiol (1.2%) elemicina (0.8%) | (Brazão et al., 2014) |
| | <i>S. epidermidis</i> | | 250 | | |
| <i>P. leticianum</i> | <i>Streptococcus mutans</i> | DD | 180 | E- β -cariofileno (21,8) y Germacreno D (9). | (Noriega et al., 2019) |
| <i>P. augustum</i> | | | 180 | E- β -cariofileno (27.1) y Germacreno D (11.2). | |

MD: Microdilución, DD: Difusión en disco

Así mismo hay otros estudios que también se han enfocado a tratar de identificar los compuestos activos de especies del género *Piper*, por ejemplo, para *P. sarmentosum* que presentó una CMI de 500 ppm frente a *B. subtilis* y *S. aureus*, la actividad ha sido atribuida a los compuestos β -sitosterol y 3-(3',4',5'-trimetoxifenilpropanoil)pirrolidina (Atiax et al., 2006). En otro estudio se encontró que un compuesto aislado de *P. maingayi* correspondiente a N-isobutil-15-(3",4"-metilenedioxifenil)-2E,4E,12Z-pentadecatrienamida) presentó una CMI de 250 ppm frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Hashim et al., 2019). Para la especie *P. sarmentosum* Rozblam se aislaron los compuestos braquiamida B y piperonal, que han presentado actividad antimicrobiana frente a hongos y bacterias patógenas del arroz (*Rhizoctonia solani*, *Bipolaris oryzae*, *Xanthomonas oryzae*) (Puzi et al., 2011). En la tabla 1-7 se relacionan algunos estudios enfocados en la actividad antimicrobiana de compuestos que han sido aislados de especies de *Piper*.

Tabla 1-7. Estudios de actividad antimicrobiana en el ensayo de microdilución para compuestos aislados de especies del género *Piper*.

| Especie | Compuesto | Microorganismo | CMI (μ g/mL) | Referencia |
|-----------------------|---|----------------------|-------------------|-----------------------|
| <i>P. sarmentosum</i> | β -sitosterol | <i>B. subtilis</i> | NI | (Atiax et al., 2006). |
| | | <i>E. coli</i> | NI | |
| | | <i>P. aeruginosa</i> | NI | |
| | | <i>S. aureus</i> | 500 | |
| | 3-(3',4',5'-trimetoxifenilpropanoil)pirrolidina | <i>B. subtilis</i> | 500 | |
| | | <i>E. coli</i> | NI | |
| | | <i>P. aeruginosa</i> | NI | |

| | | <i>S. aureus</i> | NI | |
|--------------------|---|--|----------|----------------------------|
| <i>P. maingayi</i> | N-isobutil-15-(3",4"-metilenedioxifenil)-2E,4E,12Z-pentadecatrienamida) | <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> | 250 | (Hashim et al., 2019). |
| <i>P. aduncum</i> | Metil-8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato | <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> | 8.5 nmol | (Orjala et al., 1993) |
| <i>P. hispidum</i> | 2'-hidroxi-3,4,4',6'-tetrametoxichalcona | <i>S. aureus</i> | 250 | (G. M. Costa et al., 2016) |

Teniendo en cuenta lo anterior, estos estudios reflejan el potencial antimicrobiano de especies de este género frente a *P. aeruginosa*, sin embargo, son muy pocos los que se han dirigido a la evaluación del QS de este patógeno. En la tabla 1-8 se reportan algunos estudios sobre la actividad frente a fenotipos asociados al QS de *P. aeruginosa*, así como también para otras bacterias Gram negativas. Se ha reportado esta actividad para algunos extractos de especies de *Piper*, encontrándose que en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* *P. betle* ha mostrado efectos inhibitorios en un 75 % a una concentración de 200 µg/mL (Tan et al., 2013; Datta et al., 2016). En cuanto a otros factores de virulencia de *P. aeruginosa* se ha reportado que los extractos de hojas (hexano, metanol y cloroformo) de *P. betle* ha mostrado que tienen la capacidad de inhibir la producción de piocianina en un 60 % a 150 µg/mL. Otro estudio de la misma especie evidencia que tiene potencial anti-QS con concentraciones entre 25-200 µg/mL para inhibir piocianina y la motilidad swarming de *P. aeruginosa* (Tan et al., 2013; Datta et al., 2016). Para otros extractos como los frutos de *Piper longum* se ha reportado un halo de inhibición de 6 mm frente a otras bacterias Gram negativas como *C. violaceum* (Zaki, 2013).

Tabla 1-8. Estudios de QS de extractos de especies del género *Piper*.

| Especie | Tipo de muestra | Microorganismo | Método de bioensayo | Resultado | Referencia |
|--------------------|-----------------|----------------------------|------------------------------------|------------------|--|
| <i>P. betle</i> | Hojas | <i>P. aeruginosa</i> PAO1. | Inhibición de formación de biofilm | 75% (200 µg/mL) | (Tan et al., 2013; Datta et al., 2016) |
| <i>P. longum L</i> | Frutos | <i>C. violaceum</i> | Difusión en disco | 6mm zona anti-QS | (Zaki, 2013) |

| | | | | | |
|----------------------|----------|----------------------|--|-------------------|---------------------------------|
| <i>P. delineatum</i> | Hojas | <i>V. harveyi</i> | Inhibición de la bioluminiscencia | 50 % (500 µg/mL) | (Martín-Rodríguez et al., 2015) |
| <i>P. nigrum</i> | Semillas | <i>P. aeruginosa</i> | Inhibición de formación de biofilm | NI | (Vázquez-Martínez et al., 2020) |
| | | <i>C. violaceum</i> | Inhibición de cuantificación de violaceína | 95 % (2000 µg/mL) | |

NI: No inhibe

Además, también se ha reportado la actividad sobre los aceites esenciales de especies de *Piper* (tabla 1-9), encontrándose que en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* el aceite esencial de *P. nigrum* a 50 µL/mL causa una inhibición del 26 % (Tan et al., 2013; Amrutha et al., 2017). En relación con la cepa bioindicadora *C. violaceum*, se ha reportado que los aceites esenciales de las especies *P. bogotense*, *Piper brachypodom*, *Piper bredemeyeri*, han mostrado actividad con una concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) de 513, 93 y 45 µg/mL respectivamente (Olivero V et al., 2011), el aceite esencial de *P. nigrum* a 50 µL/mL inhibe la producción de violaceína en un 16 % (Tan et al., 2013; Amrutha et al., 2017).

Tabla 1-9. Estudios de QS de aceites esenciales de especies del género *Piper*.

| Especie | Microorganismo | Método de bioensayo | Resultado | Composición | Referencia |
|-----------------------|----------------------|--|-----------------------------|---|---|
| <i>P. nigrum</i> | <i>P. aeruginosa</i> | Inhibición de formación de biofilm | 26% (50 µL/mL) | ND | (Tan et al., 2013; Amrutha et al., 2017) |
| | <i>C. violaceum</i> | Inhibición de cuantificación de violaceína | 16% (50 µL/mL) | | |
| <i>P. bogotense</i> | <i>C. violaceum</i> | Inhibición de cuantificación de violaceína | IC ₅₀ 513 µg/mL | transsabineno hidrato (14.2 %), α-felandreno (13.7 %) | (Castañeda et al., 2007; Olivero-Verbel et al., 2009; Olivero V et al., 2011) |
| <i>P. brachypodom</i> | | | IC ₅₀ =93 µg/mL | trans-β-cariofileno (20.2 %), oxido de cariofileno (10.8 %) | |
| <i>P. bredemeyeri</i> | | | IC ₅₀ =45 µg/mL. | sabineno/β-pineno (33.8 %), α-pineno (20.3 %) | |

ND: No determinado

Adicionalmente, los estudios sobre actividad anti-QS de compuestos aislados de especies de *Piper* han sido limitados, sin embargo, se presentan reportes para dos compuestos aislados de la especie *P. nigrum* donde se evidencia que tiene potencial en la inhibición de la violaceína de la cepa biosensora *C. violaceum*, pero no en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* (tabla 1-10).

Tabla 1-10. Estudios de QS de compuestos aislados de especies del género *Piper*.

| Especie | Compuesto | Microorganismo | Método de bioensayo | Resultado | Referencia |
|----------------------|--|------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>P. nigrum</i> | piperina | <i>P. aeruginosa</i> (PAO 1) | Inhibición de formación de biofilm | NI | (Vázquez-Martínez et al., 2020) |
| | | <i>C. violaceum</i> (CV026) | Cuantificación de violaceína | 70 % (50 µg/mL) | |
| | trichostachina | <i>P. aeruginosa</i> (PAO 1) | Inhibición de formación de biofilm | NI | |
| | | <i>C. violaceum</i> (CV026) | Cuantificación de violaceína | 12 % (50 µg/mL) | |
| <i>P. delineatum</i> | (-)-(2S)-7,5'-Dihidroxi-5,3'-dimetoxiflavanona | <i>Vibrio harveyi</i> | Inhibición de la bioluminiscencia | IC ₅₀ 206 µg/mL | (Martín-Rodríguez et al., 2015) |

En este sentido se evidencia que especies de este género han demostrado así su potencial para controlar patógenos desde la detección del sistema QS, siendo interesantes para evaluar su potencial biológico y así poder contrarrestar la resistencia bacteriana que presenta *P. aeruginosa*.

1.4.6 Generalidades de *P. pertomentellum*

La especie *P. pertomentellum* Trel. & Yunk. se encuentra distribuida en los Andes, cordillera central y pos. Oriental. Es endémica de Colombia, se encuentra sobre los 1000 – 1500 msnm principalmente en los departamentos de Antioquia, Caldas y Cundinamarca (POWO, 2022; Bernal, 2022). Se caracteriza porque su hábito es

arbustivo, tiene inflorescencias en espiga, la disposición de las hojas es alternas, su haz es color verde claro y el envés verde un poco más oscuro y crece en biomas tropicales húmedos (figura 1-11) (Bernal, 2022). En cuanto a la actividad biológica reportada para esta especie, se encuentra que tiene potencial en la inhibición de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. Passiflorae y *Colletotrichum tamarilloi*, así como también la inhibición de enzimas como acetilcolinesterasa y lipasa pancreática. Estos estudios asocian su actividad biológica a la presencia de los metabolitos representativos de tipo fenólico, terpénico o esteroide (Patiño et al., 2018). A nivel fitoquímico esta especie no presenta estudios, y tampoco de actividad antibacteriana y de quorum sensing.



Figura 1-9. Espécimen de *Piper pertomentellum* Trel. & Yunk.
(Elaboración propia)

2. Metodología

2.1 Identificación de especies del género *Piper* con potencial anti-QS

2.1.1 Procedimientos generales

Para la preparación de las soluciones stock de los extractos y compuestos se empleó como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®, Alemania), adquirido comercialmente y previamente filtrado por una membrana de nylon de 0,45 µm. En los ensayos de actividad biológica se emplearon cepas de referencia comerciales de la American Type Culture Collection (ATTC®), correspondiente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA-47 para los ensayos de susceptibilidad y formación de biopelícula, mientras que *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 para el ensayo de producción de violaceína. Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de las bacterias y para la realización de los bioensayos fueron Luria Bertani (LB) y Cetrimide (C), adquiridos comercialmente (Liofilchem®, Italia). Los ensayos de susceptibilidad y de formación de biopelícula se realizaron en microplacas de 96 pozos fondo redondo (Nest®, California, EE. UU) y los ensayos de producción de violaceína en microtubos estériles con tapón de rosca (SureSeal™.). Durante el proceso de tinción de biopelícula se utilizaron reactivos comerciales como buffer fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich), cristal violeta (Sigma-Aldrich) y etanol al 96% (grado técnico). Como controles se utilizaron gentamicina (MK®) y timol (Sigma-Aldrich).

Entre los equipos empleado para el crecimiento de los microorganismos se empleó un agitador orbital con temperatura (Jeio tech®, Daejeon, República de Corea) y una incubadora (Nuair®, Minnesota, EE. UU). Para la centrifugación de las muestras en los ensayos de producción de violaceína se empleó una microcentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), para las mediciones de densidad óptica (DO) y de absorbancia un lector de microplacas Multiskan sky (Thermo Fischer Scientific®, Waltham, EE. UU) y para concentrar los extractos se utilizó un rotaevaporador (Heidolph, Schwabach, Alemania).

2.1.2 Mantenimiento y preparación de la suspensión bacteriana para los ensayos:

Para la conservación de las características morfológicas, fisiológicas y genéticas de las cepas se empleó el método de congelación a -70 °C usando como criopreservante glicerol al 10 %.

P. aeruginosa: Se tomó una colonia aislada del microorganismo y se cultivo en caldo Luria Bertani (LB), por 24 h a 37 °C y 180 rpm en un agitador orbital. A partir de esta inóculo se preparó una dilución 1:100 en caldo LB, del cual se toman 2 µL para el ensayo de susceptibilidad bacteriana para obtener una concentración final de $1 \cdot 10^5$ UFC/mL en el pozo y para el ensayo de inhibición de biopelícula se tomó directamente del cultivo de toda la noche para obtener una concentración final en el pozo de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL.

C. violaceum: Se tomó una colonia aislada del microorganismo y se incubó estáticamente en caldo LB a 30 °C por 24 h en una incubadora. A partir de esta siembra se preparó una suspensión bacteriana en caldo LB que se ajustó a una DO de 0.4 a 600 nm.

2.1.3 Colecta de material vegetal y preparación de extractos etanólicos

El material vegetal utilizado en este estudio proviene de 19 especies recolectadas por el grupo de investigación en salidas de campo en Cundinamarca, Boyaca y Santander. De estas especies, 12 están amparadas bajo el marco de la amnistía establecido en el artículo 6° de la ley de 1955 de 2019 y 6 se encuentra legalizadas bajo el contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados (Resolución No. 0255 del 14/03/2014, Contrato de acceso a Recursos Genéticos y sus productos derivados No. 121 de 22/01/2016. OTROSÍ No. 21) celebrado entre la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Finalmente, se incluyó 1 especie (*P. nigrum*) introducida y cultivada en Colombia, a la empresa Pimienta Pepper trading S.A.S. Las muestras de herbario fueron enviadas para su determinación al Herbario Nacional Colombiano y/o al Herbario de la Universidad de Antioquía.

Para la preparación de los extractos etanólicos, el material vegetal (seco y molido) fue sometido a extracción por maceración con etanol al 96 % a temperatura ambiente. En el proceso se realizaron 4 extracciones con cambios de disolvente cada 4 días y en cada una de ellas el disolvente fue retirado mediante el empleo de un rotaevaporador. En este estudio se evaluaron un total de 21 extractos etanólicos provenientes de especies del género *Piper* (Tabla 2-1).

Tabla 2-1. Extractos provenientes de especies de *Piper* sometidos a la evaluación del potencial inhibitorio sobre el QS y la formación de biopelícula

| Código de extracto | Especie | Órgano | Lugar de procedencia | Código de herbario |
|--------------------|--|-----------------|---|--------------------------|
| E1 | <i>Piper annulatispicum</i> Trel. & Yunck.** | Hojas | Puerto Boyacá – Vía Betania-Otanche | HUA 217579 |
| E2 | <i>Piper asperiusculum</i> Kunt ** | Hojas | San Mateo (Boyacá) | COL579924 |
| E3 | <i>Piper asperiusculum</i> Kunt ** | Inflorescencias | San Mateo (Boyacá) | COL579924 |
| E4 | <i>Piper asperiusculum</i> Kunt ** | Tallos | Puerto Boyacá – Vía Betania-Otanche | HUA 217640 |
| E5 | <i>P. bogotense</i> C.DC* | Parte aérea | Choachí (Cundinamarca) | Identificada sin Voucher |
| E6 | <i>P. bogotense</i> C.DC* | Parte aérea | Parque Nacional Enrique Olaya Herrera (Bogotá D.C.) | Identificada sin Voucher |
| E7 | <i>Piper ceanothifolium</i> Kunt** | Inflorescencias | El Colegio (Cundinamarca) | HUA 217583 |
| E8 | <i>Piper cumanense</i> Kunt.** | Parte aérea | Arcabuco (Boyacá) | HUA217578 |
| E9 | <i>Piper cundinamarcanum</i> Trel** | Hojas | Apulo (Cundinamarca) | HUA217592 |
| E10 | <i>Piper eriopodon</i> Miq.** | Parte aérea | Arcabuco (Boyacá) | Identificada sin Voucher |
| E11 | <i>Piper falcifolium</i> Trel.* | Hojas | Puerto Boyacá – Vía Betania-Otanche | HUA 217600 |
| E12 | <i>Piper grande</i> Vahl** | Hojas | Puerto Boyacá – Vía Betania-Otanche | HUA 217596 |
| E13 | <i>Piper haughtii</i> Trel. & Yunck. ** | Hojas | Puerto Boyacá – Vía Betania-Otanche | HUA 217598 |
| E14 | <i>Piper nigrum</i> L. | Semilla | Adquirida comercialmente a la empresa Pimienta Pepper trading S.A.S | NA |
| E15 | <i>Piper peltatum</i> L.* | Inflorescencias | Viotá (Cundinamarca) | Identificada sin Voucher |
| E16 | <i>Piper pertomentellum</i> T. & Y.* | Parte aérea | San Mateo | Identificada |

| | | | | |
|-----|---|-------------|-------------------------------------|--------------------------|
| | | | (Boyacá) | sin Voucher |
| E17 | <i>Piper pertomentellum</i> T. & Y.* | Tallos | San Mateo (Boyacá) | Identificada sin Voucher |
| E18 | <i>Piper pesaresanum</i> C.DC.** | Parte aérea | Santa Bárbara (Santander) | COL553307 |
| E19 | <i>Piper statarium</i> Trel. & Yunck.** | Parte aérea | Puerto Boyacá – Vía Betania-Otanche | HUA 217602 |
| E20 | <i>Piper sucreense</i> Trel. & Yunck.** | Hojas | Puerto Boyacá – Vía Betania-Otanche | HUA 217595 |
| E21 | <i>Piper umbellatum</i> L.* | Hojas | Viotá (Cundinamarca) | Identificada sin Voucher |

*Contrato de acceso a recurso genético (CARG), ** Amnistía, NA: no aplica

2.1.4 Ensayo de susceptibilidad bacteriana en *P. aeruginosa*

La determinación de la susceptibilidad de *P. aeruginosa* se realizó siguiendo el protocolo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) con algunas modificaciones (CLSI, 2018). Se utilizó una placa de 96 pocillos en la que se añadieron 2 µL de cada extracto previamente solubilizados en DMSO que permitiera obtener una concentración final en el pozo de 1000, 250 y 62.5 ppm. Posteriormente, se agregaron 2 µL del inóculo de *P. aeruginosa* previamente preparado a una dilución 1:100, para obtener una concentración final en el pozo de 5×10^5 UFC/mL y se completó a 200 µL con caldo LB. Posteriormente de la incubación a 37 °C por 24 h, se tomó la lectura de densidad óptica (DO) a 600 nm y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de crecimiento (Ecuación 1). Los ensayos se realizaron por triplicado y con dos réplicas independientes. Como controles se emplearon de crecimiento (Bacteria + DMSO 2%), inhibición (gentamicina a 2 ppm) y esterilidad (medio LB y extractos con 2% DMSO). En el caso de los tratamientos que presentaron efecto antibacteriano teniendo en cuenta las diferencias significativas ($p < 0.05$) fue necesario disminuir más la concentración

$$\% \text{ Crecimiento} = \left(\frac{DO \text{ tratamiento}}{DO \text{ control}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.1.5 Ensayo de formación de biopelículas en *P. aeruginosa*

El efecto de los 21 extractos en la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* se realizó mediante el método de tinción con cristal violeta descrito en la literatura con algunas modificaciones (O'Toole & Kolter, 1998; O'Toole, 2011). En una placa de

96 pocillos se adicionó 2 µL del extracto para obtener una concentración final en el pozo de 62.5 ppm (concentración subinhibitoria), 2 µL del inóculo de toda la noche (18 – 24 h con DO 1.0 - 1.2 nm) y 196 µL de caldo LB. Posteriormente se realizó incubación estática durante 24 h a 37 °C en una incubadora. Pasado este tiempo se descartó el sobrenadante, se lavó la placa dos veces con PBS y se dejó secar sobre una toalla de papel por media hora en una estufa a 50 °C. Para el proceso de tinción se adicionó 250 µL de cristal violeta (0.1 %), y se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente. Luego se descartó la solución de cristal violeta no adherido a la biopelícula, se lavó tres veces con PBS para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar nuevamente. Finalmente se añadieron 250 µL de etanol al 96% para solubilizar el cristal adherido a la biopelícula y se tomaron lecturas de absorbancia a 570 nm. Como controles se emplearon de formación de biopelícula (Bacteria+ DMSO 2%), inhibición (gentamicina a 1.5 ppm) y esterilidad (medio LB y extractos con “% DMSO). Para todos los ensayos, se realizaron cinco réplicas con dos repeticiones independientes y los resultados se expresaron como porcentaje de formación de biopelícula (ecuación 2).

$$\% \text{ formación de biopelícula} = \left(\frac{\text{Abs tratamiento}}{\text{Abs control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.1.6 Ensayo de cuantificación de la producción de violaceína

La evaluación de la detección de QS en *C. violaceum* se realizó mediante el método de cuantificación de violaceína descrito en la literatura con algunas modificaciones (Luís et al., 2016; Aleksic et al., 2018). Se preparó una suspensión bacteriana de *C. violaceum* en caldo LB que se ajustó a una DO de 0.4 nm. De los extractos se agregaron 5 µL de cada tratamiento para obtener una concentración final en el tubo de 62.5 ppm, así mismo se adicionó 5 µL del inóculo ajustado y se completó con caldo LB hasta alcanzar un volumen final en el tubo de 500 µL. Se dejó incubar durante 24 h a 30 °C. Pasado este tiempo se centrifugó el cultivo a 15000 rpm por 10 minutos para separar el pigmento de las células planctónicas. Una vez descartado el sobrenadante se añadieron 500 µL de DMSO y se agitó con vortéx para solubilizar el pigmento, nuevamente se volvió a centrifugar a 15000 rpm durante 10 minutos para precipitar las células que se hubieran suspendido. Finalmente, se transfirió 200 µL del sobrenadante de cada uno de los tratamientos

y controles a una placa de 96 pocillos y se leyó su absorbancia a 585 nm en un lector de microplacas. Como controles se emplearon producción de violaceína (bacteria + DMSO 2%), inhibición (timol a 100 ppm) y de esterilidad (medio LB sin o con extractos o compuestos). Para todos los ensayos, se realizaron cinco réplicas con dos repeticiones independientes y los resultados se expresaron como porcentaje de producción de violaceína (Ecuación 3).

$$\% \text{ producción de violaceína} = \left(\frac{\text{Abs tratamiento}}{\text{Abs control}} \right) \times 100 \quad (3)$$

2.1.7 Criterio de selección de extractos con potencial de inhibición de quorum sensing

Para la selección de los extractos promisorios se tuvieron en cuenta aquellos que presentaron un efecto significativo (prueba estadística Duncan ($p < 0.05$) en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* y en la producción de violaceína de *C. violaceum* a una concentración que no afectó el crecimiento de *P. aeruginosa* (figura 2-1).

Para los extractos seleccionados anteriormente se evaluó la producción de violaceína de *C. violaceum* descrito en el numeral 2.1.6 y formación de biopelícula de *P. aeruginosa* descrito en el numeral 2.1.5 en un rango de concentraciones de 1000 ppm a 0.97 ppm, con el fin de determinar a concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) utilizando el programa GraphPad Prism 8.0.2 con un nivel de confianza del 95 %. y la concentración inhibitoria de biopelícula (BIC).

Finalmente, la especie con la menor BIC y CI_{50} y con pocos reportes en la literatura sobre su actividad biológica y/o su composición química, se escogió para continuar con el estudio fitoquímico.

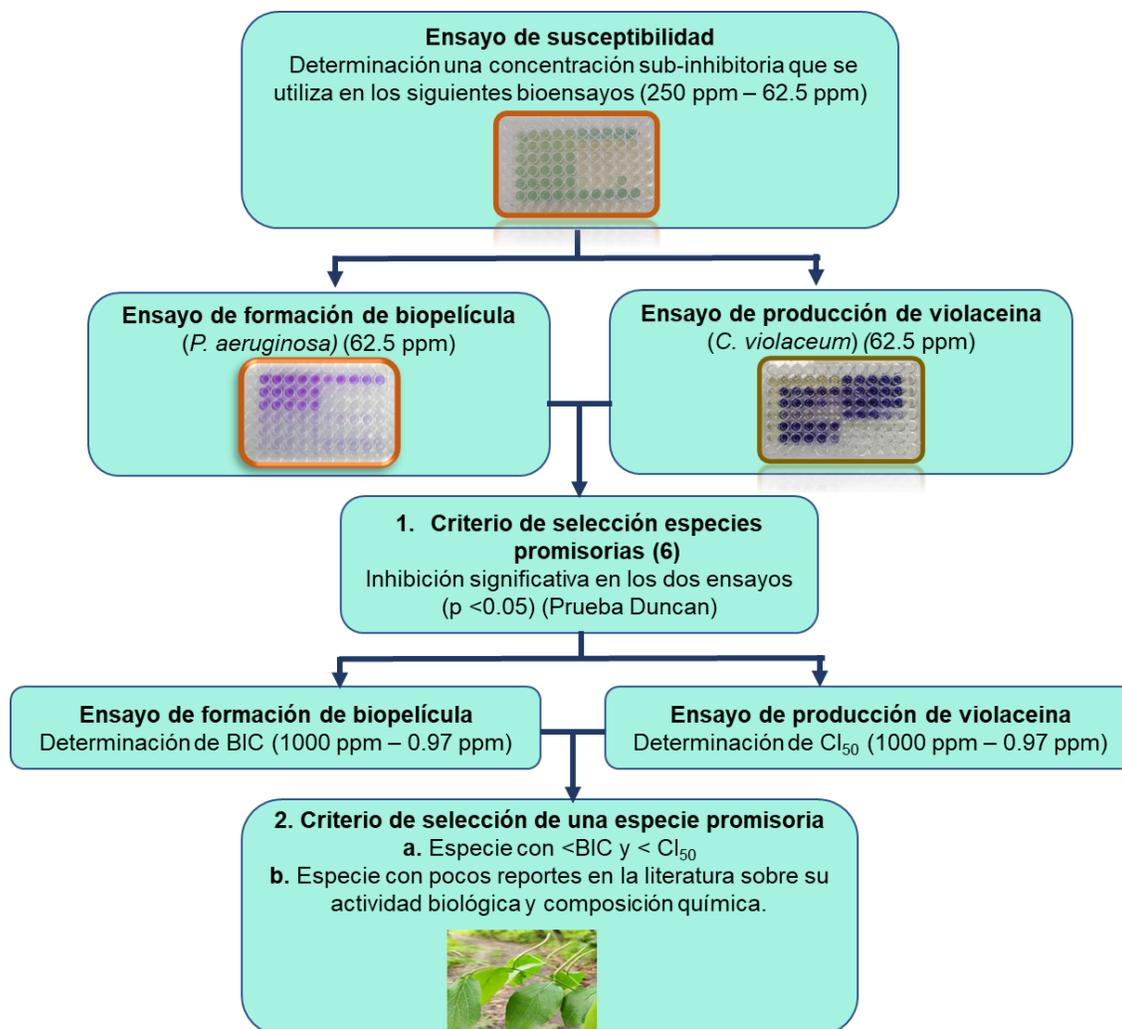


Figura 2-1. Diagrama metodológico realizado para la identificación de especies del género *Piper* con potencial anti-QS.

2.1.8 Análisis estadístico

Para todos los ensayos se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía considerando los supuestos de la prueba (normalidad, homogeneidad de varianzas, independencia, aleatoriedad y valores atípicos) para determinar si existían diferencias significativas en los ensayos. Los datos que presentaban diferencias significativas ($p < 0.05$) se sometieron a la prueba de comparación múltiple Duncan, para confirmar en qué grupo ocurrían las diferencias. Estos análisis se realizaron en el programa estadístico R studio®. Todos los resultados informados corresponden a la media de cinco réplicas de una repetición

independiente con menor coeficiente de variación y su respectiva desviación estándar, utilizando una significancia estadística de $p < 0.05$.

2.2 Estudio fitoquímico de la parte aérea de *P. pertomentellum*

2.2.1 Procedimientos generales

Para el fraccionamiento del extracto se empleó cromatografía líquida al vacío (CLV) utilizando como fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄ SiliaPlate™ de tamaño 5-20 µm (SiliCycle® Inc, Canadá). Las separaciones cromatográficas se realizaron por cromatografía flash (CF) utilizando como fases estacionarias sílica gel P60 SiliaFlash® de tamaño 40-63 µm y/o 20-45 µm (SiliCycle® Inc, Canadá). Los estudios cromatográficos, el monitoreo del fraccionamiento y las purificaciones se realizaron por cromatografía en capa delgada (CCD), empleando cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ SiliaPlate™ (SiliCycle® Inc, Canada) y utilizando como reveladores luz UV (254 y 365 nm), vapores de yodo, FeCl₃ y/o vainillina al 0.1% en H₂SO₄. Los solventes utilizados para las separaciones cromatográficas fueron adquiridos grado técnico, se destilaron y secaron antes de su uso. La elucidación de los compuestos aislados se realizó mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y por comparación con datos de literatura. Los espectros de RMN ¹H, APT, COSY, HMQC y/o HMBC fueron tomados en el equipo Bruker Avance AC-400 (Bruker®, Germany) utilizando solventes deuterados a una temperatura de 25 °C. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Las multiplicidades están asignadas como s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, dd = doble doblete y m = multiplete. Para la obtención del espectro infrarrojo (IR), se determinó en un espectrómetro IRTracer-100 (Shimadzu®, Japón). Para el análisis de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se utilizó un sistema LC-MS-TOF (Shimadzu®, Japón). El método de ionización se operó con ESI en modo de iones positivos y negativos.

2.2.2 Extracción y fraccionamiento de la parte aérea de *Piper pertomentellum*

La parte aérea seca y molida de *P. pertomentellum* (200 g) fue sometida a extracción por maceración a temperatura ambiente con etanol al 96% a temperatura ambiente. En el proceso se realizaron cuatro extracciones con cambios de disolvente cada 4 días y en cada una de ellas el disolvente fue retirado mediante el empleo de un rotaevaporador, de esta manera se obtuvieron 34 g de extracto etanólico seco (EEPP). Posteriormente 32 g del extracto se fraccionó por cromatografía líquida al vacío (CLV) con solventes de polaridad creciente (diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt), isopropanol (IPA) y etanol:agua (EtOH y H₂O 80:20) (Figura 2-2).

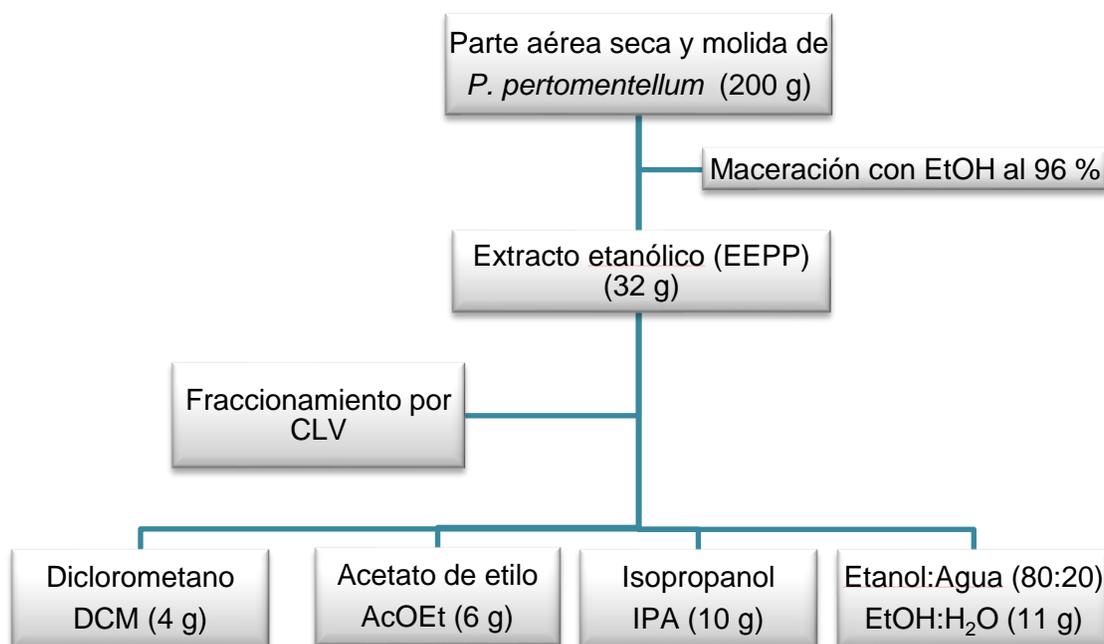


Figura 2-2. Esquema general de extracción y fraccionamiento de la parte aérea de *P. pertomentellum*

2.2.3 Evaluación del potencial de inhibición de quorum sensing de las fracciones de *P. pertomentellum*

Se determinó el potencial de inhibición de QS de las fracciones provenientes de *P. pertomentellum* siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en las secciones 2.1.5 a 2.1.6 en un rango de concentración de 1000 a 0.97 ppm. Las fracciones que presentaron mayor efecto en alguno de los ensayos se seleccionaron para su posterior purificación.

2.2.4 Purificación de la fracción de DCM proveniente de la parte aérea de *P. pertomentellum*

La fracción de DCM (4 g) se sometió a cromatografía Flash utilizando como fase móvil una mezcla de hexano:AcOEt en polaridad creciente (85:15 a 50:50), lo que condujo a la obtención de 84 fracciones que por el monitoreo cromatográfico fueron reunidas finalmente en 6 fracciones (DCM-1 a DCM-6). La fracción DCM-2 (221 mg) se purificó por CF sucesivas con los sistemas de elución CHCl₃:MeOH 98:2 y hexano:acetona 70:30, obteniéndose el compuesto **C1** como un sólido cristalino blanco en forma de agujas (20 mg, p.f. 93-95 °C). La fracción DCM-3 (700 mg) se sometió a CF sucesivas con un sistema de elución hexano:acetona 70:30 y DCM:MeOH 98:2, obteniéndose nuevamente el compuesto **C1** (375 mg). Posteriormente se purificó la fracción DCM-4 (286 mg) por CF sucesivas con los sistemas de elución de DCM:acetona 97:3, hexano:AcOEt 65:35 y hexano:acetona 70:30, lo que condujo a la obtención del compuesto **C2** como un sólido blanco en forma agujas (22 mg, p.f 155-157 °C). La fracción DCM-5 (192 mg) se sometió a purificación por CF sucesivas con el sistema hexano:AcOEt 80:20 y hexano:AcOEt 60:40, obteniéndose el compuesto **C2** (69 mg). La fracción DCM-6 (277 mg) se purificó por CF sucesivas con CHCl₃ y DCM:acetona (98:2), lo que condujo a la obtención de **C3** como un sólido de color anaranjado (11 mg, p.f. 266 - 268°C) y de **C4** como un sólido blanco en forma de agujas (12 mg, p.f. 120-122 °C). En la Figura 2-3 se muestra el diagrama de purificación de la fracción de DCM.

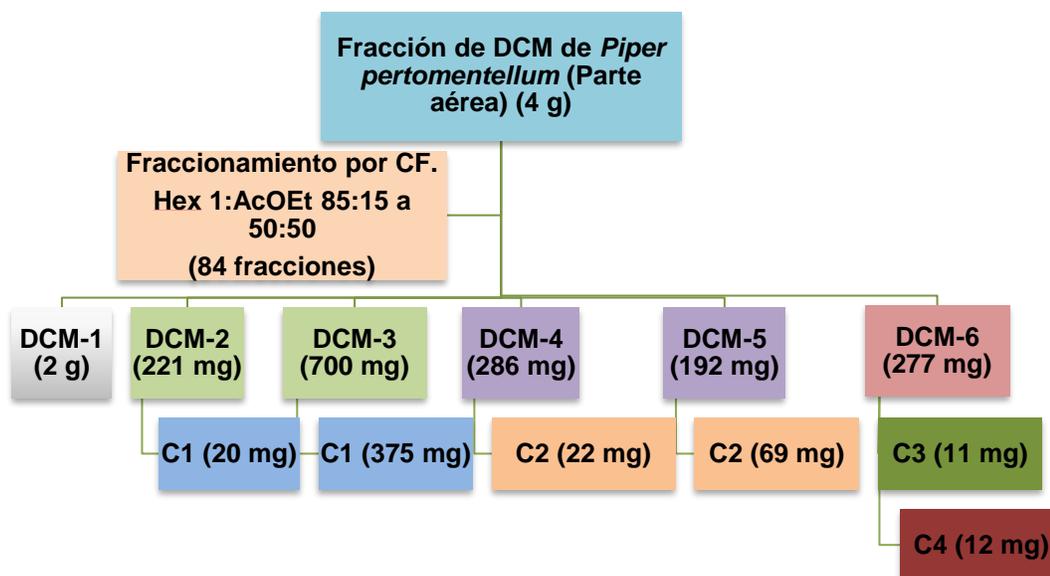


Figura 2-3. Diagrama general de purificación de la fracción DCM de la parte aérea de *P. pertomentellum*.

2.2.5 Purificación de la fracción de AcOEt proveniente de *P. pertomentellum*

La fracción de AcOEt también fue seleccionada para continuar el proceso de purificación teniendo en cuenta los resultados de los bioensayos descritos anteriormente. La fracción de AcOEt se sometió a cromatografía flash utilizando un sistema de elución hexano:AcOEt 50:50, se obtuvieron un total de 10 fracciones que por monitoreo cromatográfico fueron reunidas finalmente tres fracciones (AC1-AC3). La fracción AC2 (470 mg) se purificó por CF sucesivas con los sistemas de elución DCM:Acetona 90:10 y DCM:MeOH 95:5, obteniéndose un sólido cristalino de color blanco **C5** (166 mg, p.f 154-156 °C). En la Figura 2-4 se ilustra el esquema de purificación realizado para la fracción de AcOEt.

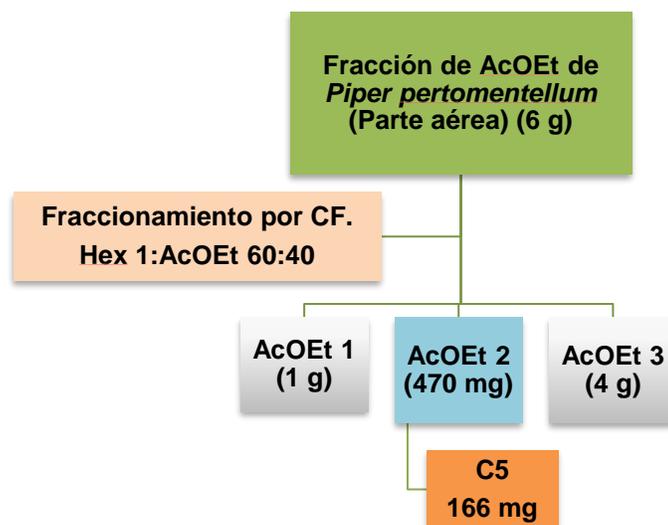


Figura 2-4. Diagrama general de purificación de la fracción AcOEt de la parte aérea de *P. pertomentellum*

2.3 Evaluación del potencial de metabolitos presentes en especies del género *Piper* sobre algunos factores de virulencia asociados al QS de *P. aeruginosa*

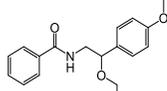
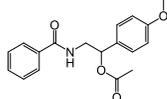
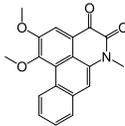
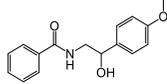
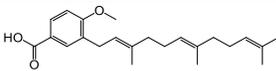
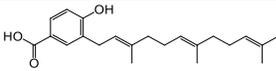
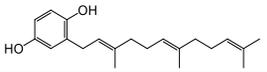
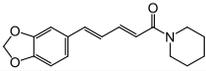
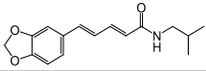
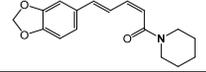
2.3.1 Procedimientos generales

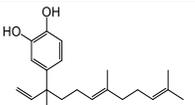
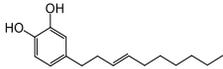
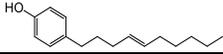
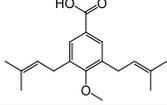
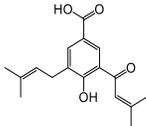
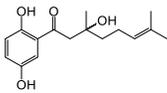
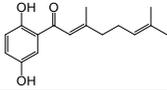
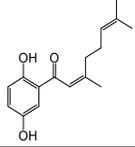
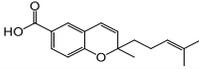
Las cepas de referencia, los equipos y reactivos que se utilizaron para realizar los ensayos se mencionan en el numeral 2.1.1. Adicionalmente, para el ensayo de proteasa se utilizó como sustrato azocaseína (Sigma-Aldrich, EE. UU) y ácido tricloroacético (ATC) (Sigma-Aldrich, EE. UU). En cuanto al ensayo de elastinas se utilizó como sustrato elastina rojo Congo (ERC) (Sigma-Aldrich, EE. UU). Para el ensayo de pirocianina se empleó ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y cloroformo de grado técnico sin tratamiento adicional. En todos los ensayos se utilizó buffer tris a 100mM (EMD Millipore, USA. Los controles positivos ácido cinámico y quercetina fueron adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich).

2.3.2 Compuestos químicos de *Piper* para la evaluación de los factores de virulencia y formación de biopelícula de *P. aeruginosa*.

Los compuestos para la evaluación del efecto en la producción de factores de virulencia (piocianina, elastasas y proteasas) y formación de biopelícula, corresponden a los obtenidos del estudio fitoquímico de la parte aérea de *P. pertomentellum* y otros previamente aislados e identificados por el equipo de investigación en especies del género *Piper* (Tabla 2-2)

Tabla 2-2. Compuestos de *Piper* empleados para evaluar la formación de biopelícula y de algunos factores de virulencia de *P. aeruginosa*.

| Código | nombre compuesto | Origen | Estructura |
|--------|------------------------------------|--------------------------|---|
| C1 | Etiltembamida | <i>P. pertomentellum</i> |  |
| C2 | Acetato de tembamida | <i>P. pertomentellum</i> |  |
| C3 | Cefaradiona B | <i>P. pertomentellum</i> |  |
| C4 | Benzamida | <i>P. pertomentellum</i> |  |
| C5 | Tembamida | <i>P. pertomentellum</i> |  |
| C6 | Ácido 4-metoxi-3-farnesilbenzoico | <i>P. bogotense</i> |  |
| C7 | Ácido 4-hidroxi-3-farnesilbenzoico | <i>P. bogotense</i> |  |
| C8 | 2-Farnesilhidroquinona | <i>P. bogotense</i> |  |
| C9 | Piperina | <i>P. nigrum</i> |  |
| C10 | Piperlonguminina | <i>P. nigrum</i> |  |
| C11 | iso-piperina | <i>P. nigrum</i> |  |

| | | | |
|-----|--|--------------------------|---|
| C12 | 4-Nerolidilcatecol | <i>P. peltatum</i> |  |
| C13 | Eriopodol | <i>P. eriopodon</i> |  |
| C14 | Gibbilimbol | <i>P. eriopodon</i> |  |
| C15 | Ácido 4-metoxinervogénico | <i>P. pesaresanum</i> |  |
| C16 | Ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico | <i>P. pesaresanum</i> |  |
| C17 | 1,4-dihidroxi-2-(3'-hidroxi-3' 7'-dimetil-1'-oxo-6'-octenil)benzeno | <i>P. ceanothifolium</i> |  |
| C18 | Debromocymopolona | <i>P. ceanothifolium</i> |  |
| C19 | 1,4-dihidroxi-2-(3', 7'-dimetil-1'-oxo-2' -6'-octadienil)benzeno | <i>P. ceanothifolium</i> |  |
| C20 | Lhotzcromeno | <i>P. ceanothifolium</i> |  |
| C21 | 1,4-dihidroxi-2-(1'-hidroxi-1',1'-dimetil)benzeno | <i>P. ceanothifolium</i> |  |

2.3.3 Ensayo de formación de biopelícula de *P. aeruginosa*

El ensayo de formación de biopelícula se realizó como se describió previamente en el numeral **2.1.5** con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones stock de los compuestos con DMSO de 25000 a 6250 ppm y se obtuvo como concentraciones finales 250 – 62.5 ppm en el pozo, en el caso en el que dieron activos en la última concentración se evaluó hasta 15.6 ppm. Como control de inhibición se empleó quercetina a una concentración final de 3,9 ppm. Se realizaron cinco réplicas con dos repeticiones independientes y se cuantificó la formación de la biopelícula utilizando la ecuación 2.

2.3.4 Ensayos sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa*

La evaluación de los compuestos de especies del género *Piper* sobre los factores de virulencia en *P. aeruginosa* se realizó siguiendo la metodología previamente descrita (Filloux A & Ramos J, 2014). Se prepararon soluciones stock de los compuestos con DMSO de 25000 a 3200 ppm para obtener como concentraciones finales de 250 – 3.2 ppm en el tubo.

Se adicionó 10 µL de un cultivo de toda la noche de *P. aeruginosa* (18 – 24 h DO 1.0 – 1.2 nm) a cada uno de los tratamientos a las diferentes concentraciones seleccionadas, se incubó a 37 °C durante 24 h y a 180 rpm en un agitador orbital. Posteriormente, se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para cuantificar la producción de proteasas, elastasas y piocianina (ecuación 5). Para todos los ensayos (elastasas, proteasas y piocianina) se empleó como control de inhibición ácido cinámico a 250 ppm. y se realizaron cinco réplicas con dos repeticiones independientes y los resultados se expresaron como porcentaje de producción (Ecuación 5).

$$\% \text{ Producción} = \left(\frac{\text{Abs tratamiento}}{\text{Abs control}} \right) \times 100 \quad (5)$$

▪ Ensayo de producción de elastasas

Para la determinación de la producción de proteasa se tomó 25 µL del sobrenadante y se agregó 225 µL de tampón tris 100 mM pH 7.5, suplementado con 10 mg/mL de elastina rojo (ERC). Esta mezcla se incubó durante 3 h a 37 °C con agitación a 180 rpm y pasado este tiempo se añadió tampón PBS a pH 6.0. La reacción se detuvo por enfriamiento a 4 °C durante 2 min y la mezcla resultante se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min para separar las ERC insolubles. A el sobrenadante se le determino la absorbancia a 495 nm y los resultados se expresaron como porcentaje de producción de elastasa utilizando la ecuación 5 (Filloux A & Ramos J, 2014).

▪ Ensayo de producción de proteasas

Para la determinación de la producción de proteasa se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente en literatura (Filloux A & Ramos J, 2014). Se

tomaron 37.5 μL del sobrenadante y se añadió una solución de tampón tris 100 mM pH 8,0 suplementada con azocaseína al 0.3% y se incubó durante una hora a 37 °C de forma estática. Posteriormente, se añadió 125 μL de ácido tricloroacético (ATC 10%) para detener la reacción y la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. A partir de 200 μL del sobrenadante resultante se realizó la medición de absorbancia 400 nm y los resultados se expresaron como porcentaje de producción de proteasa utilizando la ecuación 5.

▪ **Ensayo de producción de piocianina**

La determinación de la producción de pigmento piocianina se realizó mediante el método descrito anteriormente (Filloux A & Ramos J, 2014). El pigmento de piocianina se extrajo a partir de 750 μL del sobrenadante con 375 μL de cloroformo, se eliminó el sobrenadante y la capa orgánica (azul color) se acidificó con 300 μL de HCl 0.2 M. El sobrenadante tomó una coloración rosa y de este se tomaron 150 μL que se neutralizaron con 150 μL de un tampón tris a 200 mM. A partir de estas soluciones se registraron las absorbancias a 390 nm y los resultados se expresaron como porcentaje de producción de piocianina utilizando la ecuación 5.

2.3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó de manera similar a lo descrito en el numeral **2.1.8.**

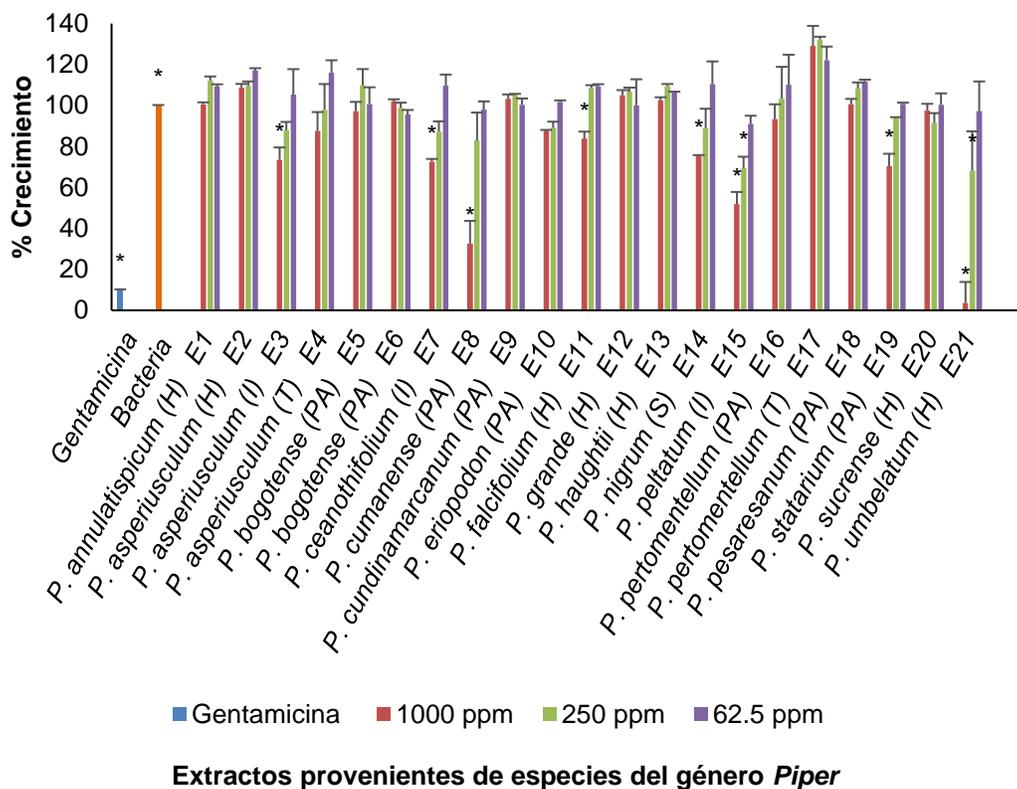
3.Resultados y Discusión

3.1 Identificación de especies del género *Piper* con potencial de inhibición de quorum sensing

En este estudio se identificaron los extractos de especies del género *Piper* con mayor potencial de inhibición de QS en los ensayos de producción de violaceína de *C. violaceum* y/o en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa*, a concentraciones que no afectaran el crecimiento (Rather et al., 2022). Es importante resaltar que la estrategia de inhibir el QS se basa en disminuir la patogenicidad de la bacteria sin afectar su crecimiento, de esta manera se reduce la presión selectiva, la resistencia y aumenta la susceptibilidad del patógeno en el sistema inmune del huésped (Rather et al., 2022) De esta manera, se ha demostrado en varios estudios que evaluar sub-MIC reduce procesos de virulencia asociados al sistema QS sin afectar el crecimiento bacteriano (Bahari et al., 2017; El-Mowafy et al., 2017; Aleanizy et al., 2021). En este sentido, se inició con los ensayos de susceptibilidad para los 21 extractos de 17 especies y cuyos resultados se presentan en la Figura 3-1 y en el Anexo 5-1. Se determinó que a las concentraciones evaluadas (1000, 250 y 62.5 ppm) solamente en la de 62.5 ppm todos los extractos no tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento. Teniendo en cuenta este resultado, esta fue seleccionada como concentración sub-inhibitoria (sub-MIC) para la evaluación de los extractos en los siguientes ensayos.

Este ensayo permitió determinar que para 14 especies (**E1, E2, E6-E9, E11-E13, E15, E16, E18-E20**), este es su primer reporte de evaluación de actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa*. Para la especie *P. eriopodon* (**E10**) se ha reportado que el extracto de DCM a 1000 ppm no tiene actividad frente a *P. aeruginosa* (Vallejo et al., 2014) y su aceite esencial solo ha sido activo frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus* (Ustariz et al., 2020), en este sentido en este trabajo el extracto etanólico tampoco presentó efecto inhibitorio. Sobre *P.*

nigrum (E14) se ha descrito que el extracto etanólico no presenta ningún efecto en el crecimiento de *P. aeruginosa* a la concentración de 500 ppm, lo que concuerda con los resultados de este trabajo que tampoco tuvo inhibición en las mismas condiciones (Vázquez-Martínez et al., 2020). Entre las especies que tuvieron actividad antibacteriana y que tiene un reporte previo de su actividad, se encuentra *P. umbelatum* (E21), para la cual se ha reportado que el extracto de DCM tiene potencial para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a 1000 ppm (Vallejo et al., 2014).



*Tratamientos con diferencias significativas frente al control de crecimiento. Prueba Duncan (P<0.05).

Figura 3-1. Porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de extractos de especies del género *Piper*

Los resultados de los ensayos de inhibición de QS por el método de cuantificación de producción de violaceína en *C. violaceum* se presentan en la Tabla 3-1. Se resalta que 15 de los 21 extractos a 62.5 ppm redujeron significativamente la

producción de violaceína, destacándose **E2, E6, E12, E13, E14, E17 y E18**, dado que causaron una reducción de al menos el 50% en la producción del pigmento. En cuanto a los resultados del ensayo de formación de biopelícula en *P. aeruginosa*, se encontró que 10 de los 21 extractos redujeron significativamente la formación de biopelícula, siendo **E2, E3, E6, E7 y E10**, los extractos con mayor potencial al reducir al menos el 50% la producción de biopelícula (Tabla 3-1). Se resalta que este es el primer reporte de inhibición de QS y formación de biopelícula para las especies **E1, E2, E6-E8, E10-E13, E15, E18 y E21**.

Tabla 3-1. Efecto inhibitorio de extractos etanólicos de *Piper* sobre la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* y la producción de violaceína de *C. violaceum*

| Código | Extractos | % Formación de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> | % Producción de violaceína en <i>C. violaceum</i> |
|--------|--------------------------------|--|---|
| E1 | <i>P. annulatispicum</i> (H) | NI | 62.6 ± 6.9* |
| E2 | <i>P. asperiusculum</i> (H) | 49.2 ± 6.1* | 45.7 ± 2.8* |
| E3 | <i>P. asperiusculum</i> (I) | 45.9 ± 9.1* | NI |
| E4 | <i>P. asperiusculum</i> (T) | 39.2 ± 8.7* | NI |
| E5 | <i>P. bogotense</i> (PA) | NI | NI |
| E6 | <i>P. bogotense</i> (PA) | 19.8 ± 1.4* | 46.6 ± 6.1* |
| E7 | <i>P. ceanothifolium</i> (I) | 39.1 ± 6.3* | NI |
| E8 | <i>P. cumanense</i> (PA) | 70.8 ± 2.8* | 54.9 ± 4.1* |
| E9 | <i>P. cundinamarcanum</i> (PA) | NI | 54.1 ± 3.7* |
| E10 | <i>P. eriopodon</i> (PA) | NI | NI |
| E11 | <i>P. falcifolium</i> (H) | NI | 66.1 ± 7.5* |
| E12 | <i>P. grande</i> (H) | 65.1 ± 9.4* | 45.1 ± 4.8* |
| E13 | <i>P. haughtii</i> (H) | NI | 49.9 ± 2.3* |
| E14 | <i>P. nigrum</i> (S) | NI | 31.5 ± 4.8* |
| E15 | <i>P. peltatum</i> (I) | NI | 76.1 ± 9.3* |
| E16 | <i>P. pertomentellum</i> (PA) | 77.5 ± 3.5* | 27.2 ± 5.5* |
| E17 | <i>P. pertomentellum</i> (T) | NI | 71.4 ± 3.9* |
| E18 | <i>P. pesaresanum</i> (PA) | NI | 44.4 ± 5.9* |
| E19 | <i>P. statarium</i> (PA) | NI | 75.5, ± 5.1* |
| E20 | <i>P. sucrense</i> (H) | 55.7 ± 5.1* | 61.5 ± 2.7* |
| E21 | <i>P. umbelatum</i> (H) | 76.9 ± 11.7* | NI |

H: hojas, T: tallos, PA: parte aérea, I: inflorescencias. NI: No inhibe, *Inhibe significativamente diferente en comparación al control con un p valor < 0.05 (prueba Duncan).

En la literatura son limitados los estudios con especies del género *Piper* sobre la evaluación del QS y la formación de la biopelícula en *P. aeruginosa*. Para el extracto etanólico de *P. nigrum* a 500 ppm se ha reportado que inhibe en un 40% la producción de violaceína de *C. violaceum* (sin afectar el crecimiento bacteriano) y no inhibe la formación biopelícula de *P. aeruginosa*, siendo estos resultados consistentes con lo encontrado en este trabajo (Vázquez-Martínez et al., 2020). En otro estudio, se ha reportado que el extracto metanólico de esta especie presenta un efecto inhibitorio en la producción de violaceína de *C. violaceum* CV026 por el método cualitativo de difusión en disco (15 mm) y en el ensayo cuantitativo se determinó una inhibición del 78% (500 ppm) (Singh et al., 2016). Adicionalmente, se ha reportado potencial inhibitorio en la producción de violaceína en el ensayo de difusión en disco a 1, 2 y 3 mg/mL con *C. violaceum* ATCC CV026, para las fracciones de hexano, cloroformo y metanol provenientes de *P. nigrum* (Tan et al., 2013). Se ha descrito en la literatura que el aceite esencial proveniente de las hojas de *P. bogotense* tiene potencial para inhibir el QS de *C. violaceum* ATCC CV026 (CI₅₀ de 513.8 ppm), caracterizándose este aceite por presentar como constituyentes mayoritarios a trans-sabineno hidrato (14.2%), α -felandreno (13.7%) y α -pineno (8.7%) (Olivero-Verbel et al., 2009; Olivero V et al., 2011)

Los extractos de *P. asperiusculum* (**E2**), *P. bogotense* (**E6**), *P. cumanense* (**E8**), *P. grande* (**E12**), *P. pertomentellum* (**E16**) y *P. sucrense* (**E20**), que causaron inhibición significativa tanto en la producción de violaceína en *C. violaceum* como en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa*, puede ser que su acción está asociada a la inhibición del QS en los dos microorganismos (McClellan et al., 1997; Steindler & Venturi, 2007; Kothari et al., 2017). Sin embargo, se encontró que para los extractos de *P. asperiusculum* (**E3**), *P. ceanothifolium* (**E7**) y *P. umbellatum* (**E21**) sólo afectaron la formación de la biopelícula. Estos resultados podrían estar relacionados a que la formación de la biopelícula además de ser controlada por el QS, también está regulada por otros sistemas como el c-di-GMP, *GacS/GacA* y *RetS/LadS* y por ende no podemos asegurar que esté actuando sobre el sistema QS (Skariyachan et al., 2018; Rather et al., 2022).

En este sentido, a los extractos con inhibición significativa en los dos bioensayos se seleccionaron los extractos **E2** (*P. asperiusculum*), **E6** (*P. bogotense*), **E8** (*P.*

cumanense), **E12** (*P. grande*), **E16** (*P. pertomentellum*) y **E20** (*P. sucrense*) para determinar la CI_{50} en la producción de violaceína y la BIC en la formación de biopelícula (Tabla 3-2). Los extractos más activos en ambos ensayos fueron *P. asperiusculum* (**E2**) y *P. cumanense* (**E8**) con una CI_{50} menor a 100 ppm y una BIC de 0,97 ppm, seguido por los extractos de **E6**, **E12**, **E16** y **E20**, que tuvieron una BIC de 3.9 ppm y una CI_{50} mayor a 100 ppm. El potencial que han mostrado estos extractos en los dos ensayos aplicados también ha sido previamente reportado para otras especies, como ha sido para el extracto etanólico de *Centella asiática* a 400 ppm que inhibe más de un 50% de violaceína en *C. violaceum* y en un 80% la biopelícula de *P. aeruginosa*. Para el extracto etanólico de *Cinnamomun verum* se ha descrito en la literatura que a 250 ppm inhibe el 70% de violaceína y el 80% la formación de biopelícula (Vasavi et al., 2016; Alva et al., 2021).

Tabla 3-2. Resultados del potencial de inhibición de algunas especies del género *Piper* sobre la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* y sobre la producción de violaceína en *C. violaceum*.

| CÓDIGO | EXTRACTO | MICROORGANISMOS | | REPORTES EN LA LITERATURA |
|------------|--------------------------|---|----------------------|---------------------------|
| | | <i>C. violaceum</i> | <i>P. aeruginosa</i> | |
| | | CI_{50} (95% límite de confianza) (ppm) | BIC (ppm) | |
| E2 | <i>P. asperiusculum</i> | 70.7 (61.2 - 82.4) | 0.9 | No |
| E6 | <i>P. bogotense</i> | 154.5 (139.6 - 172.5) | 3.9 | Si |
| E8 | <i>P. cumanense</i> | 74.9 (53.9 - 98.7) | 0.9 | Si |
| E12 | <i>P. grande</i> | 185.4 (116.5 - 299.6) | 3.9 | No |
| E16 | <i>P. pertomentellum</i> | 149.6 (131.8 - 172.6) | 3.9 | No |
| E20 | <i>P. sucrense</i> | 181.1 (121.9 - 257.2) | 3.9 | No |

Los extractos etanólicos de las seis especies seleccionadas no cuentan con reportes previos en la literatura sobre su actividad anti-QS y el efecto en la formación de biopelículas. Adicionalmente, es importante resaltar que las especies *P. asperiusculum* (E2), *P. pertomentellum* (E16), *P. sucrense* (E20) y *P. grande* (E12), no tienen reportes previos sobre su composición química por lo que pueden ser objeto de futuros estudios para aislar e identificar los compuestos bioactivos. En el presente estudio se seleccionó a *P. pertomentellum* (E16) para someter a

estudio fitoquímico, dado que algunas ya se estaban trabajando paralelamente en el grupo de investigación y porque de otras no fue posible coleccionar material vegetal suficiente para el estudio fitoquímico.

3.2 Estudio fitoquímico realizado de la parte aérea de *P. pertomentellum*

El estudio fitoquímico sobre la parte aérea de *P. pertomentellum* fue realizado con el fin de aislar e identificar algunos constituyentes químicos con potencial inhibitorio del QS en *P. aeruginosa*. De esta manera el extracto etanólico (EE) y las fracciones iniciales obtenidas por CLV (DCM, AcOEt, IPA, EtOH:H₂O 80:20) se sometieron a ensayos de susceptibilidad, formación de biopelícula (*P. aeruginosa*) y cuantificación en la producción de violaceína (*C. violaceum*). En cuanto a los resultados de susceptibilidad (Figura 3-2) se evidenció que la fracción de DCM fue la que causó la mayor inhibición significativa en el crecimiento de *P. aeruginosa* a la máxima concentración. De esta manera, se determinó que las sub-MIC para los ensayos de la formación de biopelícula y de la producción de violaceína tanto para el extracto y las fracciones de AcOEt, IPA y EtOH:H₂O estaba a partir de 1000 ppm y para la fracción de DCM de 500 ppm. (**Anexo 5.2, tabla 5.2**).

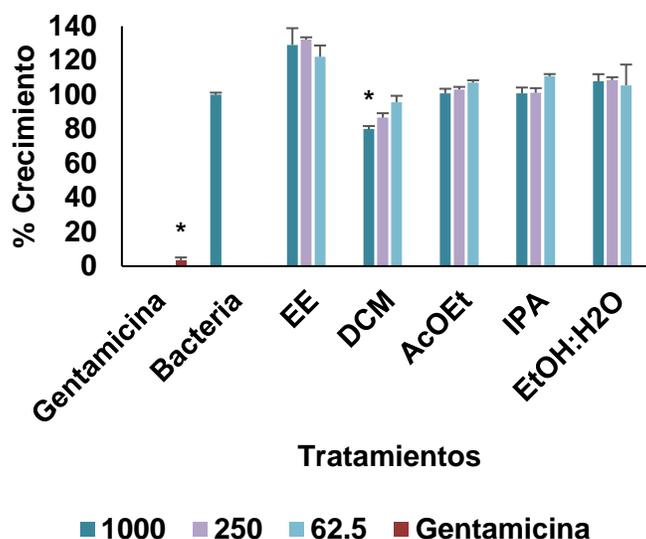


Figura 3-2. Crecimiento de *P. aeruginosa* frente a diferentes concentraciones del extracto etanólico (EE) y fracciones (DCM, AcOEt, IPA, EtOH:H₂O) de *P. pertomentellum*.

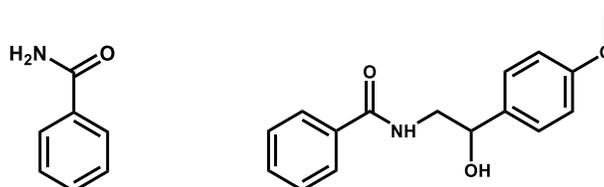
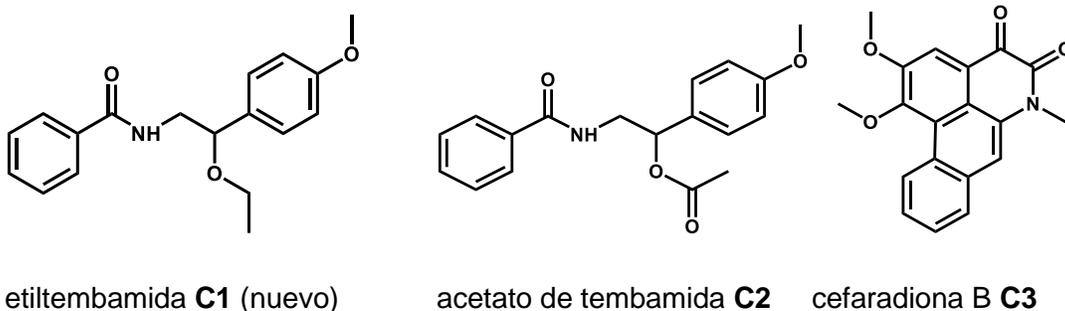
Los resultados descritos en la Tabla 3.3 del potencial de inhibición de QS para el extracto etanólico y fracciones provenientes de *P. pertomentellum*, sugieren que las fracciones no causan inhibición significativa en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa*. En cambio, si se observa que las fracciones de DCM y AcOEt inhiben la producción de violaceína de *C. violaceum* aunque su acción es menor a la observada para el extracto etanólico. Estas fracciones fueron seleccionadas para continuar con el estudio fitoquímico y así aislar e identificar algunos constituyentes químicos responsables de la actividad observada.

Tabla 3-3. Potencial de inhibición de QS para el extracto etanólico y fracciones provenientes de *P. pertomentellum*.

| Extracto etanólico y Fracciones de <i>P. pertomentellum</i> | MICROORGANISMOS | |
|---|---|----------------------|
| | <i>C. violaceum</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| | Cl ₅₀ (95 % límite de confianza) (ppm) | BIC (ppm) |
| Extracto etanólico | 149.6 (131.8 – 172.1) | 3.9 |
| DCM | 330.9 (150.1 - 452.2) | NI |
| AcOEt | 643.6 (485.1 - 672.3) | NI |
| IPA | NI | NI |
| EtOH:H ₂ O | ≥1000 | NI |

*Cl₅₀ están expresadas como la media de cinco réplicas de una repetición independiente, junto con intervalos de confianza al 95%. NI = No inhibe

El estudio químico realizado sobre las fracciones de DCM y AcOEt provenientes del extracto etanólico de *P. pertomentellum* condujo al aislamiento de una nueva piperamida (etiltembamida **C1**), junto con cuatro amidas conocidas (acetato de tembamida **C2**), benzamida **(C4)** y tembamida **(C5)** y cefaradiona B **(C3)**). Las estructuras de los compuestos aislados e identificados se ilustran en la Figura 3-3. Todos los compuestos son reportados por primera vez para *P. pertomentellum*, sin embargo, en otras especies del género *Piper* se ha descrito la presencia de **C2** (Maxwell & Rampersad, 1989), **C3** (Desai et al., 1988) y **C5** (da Silva et al., 2018). En general las características estructurales de los compuestos aislados e identificados están de acuerdo con la quimiotaxonomía del género *Piper*, siendo las amidas uno de los tipos de metabolitos más representativos (Parmar et al., 1997; Maciej et al., 2011; do Nascimento et al., 2012; Wolff et al., 2015). Las piperamidas con núcleo similar a la tembamida han sido previamente reportadas en otras especies del género *Piper*, como es el caso de *P. taiwanense*, *P. guayranum* y *P. galeatum* (Chen et al., 2007; Gupta et al., 2010; Orjala et al., 2006). y también en especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) como *Z. capense* (Cabral et al., 2015).



benzamida **C4**tembamida **C5**

Figura 3-3. Compuestos aislados e identificados de la fracción de DCM y AcOEt provenientes de la parte aérea de *P. pertomentellum*

El compuesto **C1** fue aislado como un sólido blanco en forma de agujas con p.f. 93-95 °C y que en CCD se caracterizó por presentar una coloración café oscura al ser revelado con el reactivo vainillina-ácido sulfúrico. Su espectro IR (**Anexo 5.3: tabla 5-3, figura 5-1**) se caracteriza por presentar señales indicativas de un grupo amida (3331 cm⁻¹ tensión N-H de amida secundaria, 1635 cm⁻¹ tensión C=O de un grupo carbonilo y 1543 cm⁻¹ tensión C-N), de aromáticos (3061 cm⁻¹ de tensión C(sp²)-H, hacia 1600 y 1500 cm⁻¹ de las tensiones C=C) y de éteres (1246, 1100 y 1029 cm⁻¹ características de flexiones C-O-C) (Stuart, 2004). De acuerdo con el análisis de RMN se confirma la presencia de un anillo aromático monosustituido, por las señales de ¹H con δ_H 7.78- 7.74 (m, 2H), 7.54 – 7.48 (m, 1H) 7.44 (dd, $J = 8.1, 6.5$ Hz, 2H), junto con las señales de APT en δ_C 134.7 (C), 131.5 (CH), 128.6 (2CH), 126.9 (2CH)) y de un anillo aromático 1,4 disustituido (señales con δ_H 7.28 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H) y en APT con δ_C 159.5 (C), 131.8 (C), 127.8 (2CH), 114.0 (2CH)). También se corroboró la presencia de una amida secundaria por la señal del grupo carbonilo con δ_C 167.3 (C) y las señales de un grupo metileno que por su desplazamiento sugiere estar unido a un heteroátomo como nitrógeno (δ_C 46.2 (CH₂) y δ_H 3.89 (1H, ddd, $J = 13.8, 7.8, 4.0$ Hz)) (do Nascimento et al., 2012; Gómez-Calvario & Rios, 2019). Adicionalmente, se determinó la presencia de grupos alquilo oxigenados de tipo etoxilo (señales de ¹H con δ_H 3.46 (m, 1H), 3.41 - 3.31 (m, 1H) y 1.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), junto con señales de APT en 64.2 (CH₂) y 15.3 (CH₃)), de metoxilo (por señales con δ_H 3.82 (s, 3H) y δ_C 55.3 CH₃)) y de metino oxigenado (señales en δ_C 80.0 (CH) y δ_H 4.44 (1H, dd, $J = 8.9, 4.0$ Hz)) (Anexo 5-3, Figura 5-2 y 5-3). Las anteriores señales son consistentes a una piperamida con estructura similar a tembamida (do Nascimento et al., 2012; Gómez-Calvario & Rios, 2019; Wolff et al., 2015). El núcleo base, la asignación de las señales de RMN y la ubicación de los sustituyentes fueron corroboradas por análisis de experimentos bidimensionales tipo COSY, HMQC y HMBC (Tabla 3-4) y (**Anexo 5.3: Figura 5-4, 5-5 y 5-6**). Por análisis del espectro de masas de alta

resolución (EMAR) la fórmula molecular fue establecida como $C_{18}H_{21}NO_3$ (m/z 296.1209 $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{21}NO_3$, 296.1281) y es consistente con el resultado del análisis espectroscópico. De esta manera, este es el primer reporte del compuesto **C1** que por su similitud con la tembamida fue nombrado como etiltembamida.

El compuesto **C2** fue aislado como un sólido blanco en forma de agujas, con p.f de 155-157 °C y por análisis de RMN se determinó que presenta un perfil similar a **C1**. La diferencia entre sus espectros se evidencia por la desaparición de las señales del grupo etoxilo presente en **C1** y la aparición de señales para un grupo acetilo (señales en 1H con δ_H 2.12 (s, 3H) y en APT con δ_C 21.2 (CH_3) y 170.7 (C)) (**Anexo 5.3: Tabla 5-4, Figura 5-7 y 5-8**). Por comparación con los datos reportados en la literatura este compuesto fue identificado como acetato de tembamida (Cabral et al., 2015) (Tabla 3-4), el cual se ha identificado en otras especies del género *Piper* como *P. mollicomum* y *P. guayranum* (Maxwell & Rampersad, 1989; H. A. da Silva et al., 2018) y en especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) como *Z. capense* (Cabral et al., 2015). A este compuesto se le ha reportado que tiene actividad antifúngica frente a *Cladosporium cladosporoides* y *C. sphaerospermum*, actividad antiviral sobre el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) y actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (Cheng et al., 2005; Cabral et al., 2015; Silva et al., 2018).

El compuesto **C5** fue aislado como un sólido blanco en forma de agujas con p.f de 155-156 °C, y por su espectro en RMN presenta un perfil similar a **C1** y **C2**, lo que sugiere que corresponde a una piperamida. Este compuesto no presenta señales para los grupos alquilos oxigenados ubicados sobre el carbono de la posición 2 de **C1** y **C2**, pero si se mantiene la señal del metino en la posición 2 (señales en δ_C 71.7 (CH) y δ_H 4.82 (1H, dd, $J = 7.8, 5.1$ Hz)), lo que sugiere la presencia de un grupo hidróxilo sobre esta posición. Por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura, **C5** fue identificado como tembamida (**Anexo 5.3: Tabla 5-7, Figura 5-14 y 5-15**) y (Tabla 3-4), el cual ha sido previamente reportado para las especies *P. mollicomum* y *P. guayranum* (Silva et al., 2018; Maxwell & Rampersad, 1989). De este compuesto se conoce que tiene

actividad antifúngica frente a *C. cladosporoides* y *C. sphaerospermum* y actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (Cabral et al., 2015; Silva et al., 2018).

Tabla 3-4. Comparación de los datos espectroscópicos para los compuestos **C1**, **C2** y **C5**

| N° C | Compuesto C1 etiltembamida | | Compuesto C2 acetato de tembamida | | Compuesto C5 tembamida | |
|--------|--|--|--|--|---|---|
| | δ RMN ¹ H (int, mult, J) CDCl ₃ | δ RMN ¹³ C (APT) CDCl ₃ | δ RMN ¹ H (int, mult, J) CDCl ₃ | δ RMN ¹³ C (APT) CDCl ₃ | δ RMN ¹ H (int, mult, J) Metanol-d ₄ | δ RMN ¹³ C (APT) Metanol-d ₄ |
| 1 | 3.89 (1H, ddd, J = 13.8, 7.8, 4.0 Hz), 3.41-3.31 (1H, m) | 46.1 (CH ₂) | 3.86 (2H, t, 6.5 Hz) | 45.0 (CH ₂) | 3.57 (2H, qd, J = 13.5, 6.4 Hz) | 47.2 (CH ₂) |
| 2 | 4.44 (1H, dd, J = 8.9, 4.0 Hz) | 79.9 (CH) | 5.97 (1H, t, 6.3 Hz) | 74.3 (CH) | 4.85 (1H, dd, J = 7.8, 5.1 Hz) | 71.7 (CH) |
| 1' | - | 131.7 (C) | - | 129.7 (C) | - | 134.2 (C) |
| 2', 6' | 7.28 (d, J = 8.7 Hz, 2H) | 127.8 (2CH) | 7.36 (2H, d, 8.6 Hz) | 128.0 (CH) | 7.34 (d, J = 8.7 Hz, 2H) | 127.0 (2CH) |
| 3', 5' | 6.91 (d, J = 8.6 Hz, 2H), | 114.0 (2CH) | 6.93 (2H, d, 8.7 Hz) | 114.2 (2CH) | 6.91 (d, J = 8.7 Hz, 2H) | 113.3 (2CH) |
| 4' | - | 159.4 (C) | - | 159.8 (C) | - | 159.3 (C) |
| 1'' | - | 134.7 (C) | - | 134.3 (C) | - | 134.5 (C) |

| | | | | | | |
|------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| 2", 6" | 7.78 – 7.74 (m, 2H), | 126.9 (2CH) | 7.74 (2H, d, 7.3 Hz) | 126.9 (2CH) | 7.78 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H) | 126.8 (2CH) |
| 3", 5" | 7.44 (dd, $J = 8.1, 6.5$ Hz, 2H) | 128.6 (2CH) | 7.46 (2H, d, 7.8 Hz) | 128.5 (2CH) | 7.45 (dd, $J = 8.2, 6.7$ Hz, 1H) | 128.1 (2CH) |
| 4" | 7.54 – 7.48 (m, 1H) | 131.5 (1CH) | 7.52 (1H, t, 7.4 Hz) | 131.4 (CH) | 7.55-7.50 (m, 1H) | 131.2 (CH) |
| C=O | - | 167.3 (C) | - | 167.4 (C) | - | 169.1 (C) |
| NH | 6.60 (1H, sa) | - | 6.44 (1H, sa) | - | - | - |
| OCH ₃ | 3.82 (3H, s) | 55.3 (CH ₃) | 3.83 (3H, s) | 55.3 (CH ₃) | 3.78 (3H, s) | 54.2 (CH ₃) |
| 1''' | 3.46 (1H, m) 3.41-3.31 (1H, m) | 64.2 (CH ₂) | - | 170.7 (C) | - | - |
| 2''' | 1.19 (3H, t, $J = 7.0$ Hz) | 15.3 (CH ₃) | 2.12 (3H, s) CH ₃ CO | 21.2 (CH ₃) | - | - |

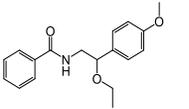
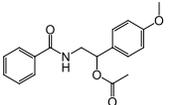
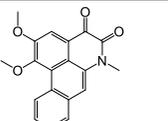
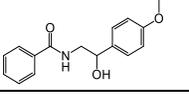
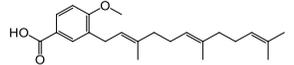
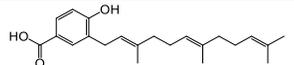
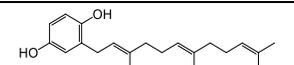
El compuesto **3** fue aislado como un sólido en forma de agujas de color anaranjado, con fluorescencia intensa amarillo verdoso en luz UV a 254 nm con p.f 267-268 °C. El análisis de los espectros de RMN revela señales típicas del esqueleto de 4,5-dioxoaporfina (Gómez-Calvario & Rios, 2019), y que se observan en ^1H con δ_{H} 9.48 (t,1H,), 8.19 (s,1), 7.85 (t, 1H), 7.65 (t, 2H), 7.65 (t, 2H), 7.44 (s,1H), junto con las de APT con δ_{C} 175.6 (C), 156.4 (C), 155.1 (C), 153.0 (C), 132.4 (C), 131.9 (C), 129.2 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 127.0 (C), 124.7 (C), 123.8 (C), 119.7 (C), 114.4 (CH) y 112.7 (CH). Adicionalmente, se determinó la presencia de dos metoxilos (señales de ^1H en δ_{H} 4.10 (d, 6H) y 4.10 (d, 6H), y en APT con δ_{C} 56.6 (CH_3) y 60.6 (CH_3)) y de un grupo N-metilo (señal de ^1H δ_{H} 3.83 (s,3H) y en APT con δ_{C} 29.8 (CH_3)) (**Anexo 5.3: Tabla 5-5, Figura 5-10 y 5-11**). La corroboración del núcleo base y la ubicación de los sustituyentes se realizó por análisis del experimento HMBC y por comparación con datos reportados en la literatura (Desai et al., 1988). De esta forma, **C3** fue identificado como cefaradiona B, el cual ha sido aislado de diferentes especies de *Piper* como *P. augustum* y *Piper longum* (Desai et al., 1988; Delgado et al., 1998). Este compuesto ha demostrado tener actividad citotóxica frente a líneas celulares de colon y mama, acción antihelmintica y antioxidante (Lin et al., 2014; Liu et al., 2014).

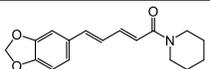
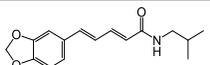
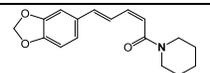
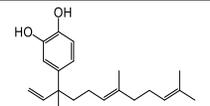
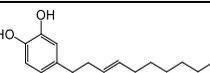
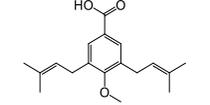
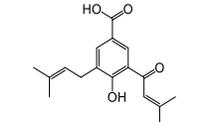
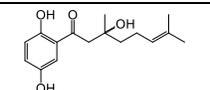
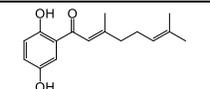
El compuesto **C4**, fue aislado como un sólido en forma de agujas con p.f de 120-122 °C. Del análisis espectroscópico de RMN (**Anexo 5.3, Figura 5-12 y 5-13**) y por comparación con los datos reportados en la literatura (Lignier et al., 2011), se identificó a **C4** como benzamida. Este compuesto no presenta reportes en el género *Piper*, sin embargo, se ha reportado para otras especies como *Sarcomelicope argyrophylla*, *Houttuynia cordata*, *Haplophyllum obtusifolium* (Razakova et al., 1984; Brum-Bousquet et al., 1985; Chou et al., 2009). Para este compuesto se conocen diversas actividades biológicas entre las que se destaca antimicrobiana y anti biofilm frente a bacterias multiresistentes (Razakova et al., 1984; Brum-Bousquet et al., 1985; Chou et al., 2009; Sommer et al., 2019; Song et al., 2020)

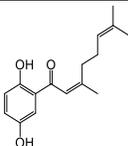
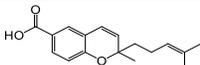
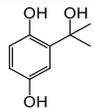
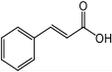
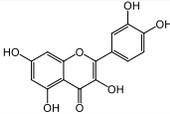
3.3 Determinación del potencial de compuestos provenientes de especies de *Piper* sobre algunos factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Se ha descrito en la literatura que el sistema QS de *P. aeruginosa* tiene la capacidad de regular la expresión de varios factores de virulencia los cuales le permiten establecerse en el huésped y causar una infección (Kostylev et al., 2019). Dentro de los principales factores de virulencia regulados por el QS que controlan la patogenicidad de esta bacteria algunos son la elastasa LasB, la proteasa LasA, y la piocianina, así como también la formación de biopelículas. Estos están principalmente implicados en las infecciones pulmonares ocasionando daños a nivel tisular, desencadenando respuestas inflamatorias y alterando el sistema inmunitario del huésped. (Karatuna & Yagci, 2010; Rather et al., 2022). De esta manera, reducir estos factores de virulencia que se encuentran altamente relacionados con el ciclo de infección de *P. aeruginosa* a través del sistema QS se propone como un nuevo enfoque terapéutico para controlar las infecciones causadas por esta bacteria (Rasko & Sperandio, 2010; Lu et al., 2022; Rather et al., 2022). En este sentido, este trabajo se evaluó la producción de algunos factores de virulencia de *P. aeruginosa* como elastasa, proteasa y piocianina, así como en la formación de biopelículas, en presencia de constituyentes químicos identificados en especies de *Piper* a diferentes concentraciones de (250 ppm – 62.5 ppm). En la investigación se incluyeron los compuestos aislados e identificados en *P. pertomentellum* (C1 a C5) y los provenientes de trabajos previos realizados sobre algunas de las especies de *Piper* evaluadas en el primer objetivo (C6 a C21) (sección 2.3.2, tabla 2-2). Todos los resultados obtenidos en este estudio se presentan en el **Anexo 5.4 (tabla 5.8)** y en la tabla 3-5 donde se reportan aquellas concentraciones en la que se obtuvo la mayor actividad correspondiente al menor porcentaje de producción y/o formación. Este es el primer reporte para la mayoría de los compuestos provenientes de especies del género *Piper* (excepto piperina C9) en la evaluación de los factores de virulencia y la formación de biopelícula de *P. aeruginosa*.

Tabla 3-5. Efecto de compuestos aislados de especies de *Piper* en la producción de factores de virulencia y formación de biopelícula en *P. aeruginosa*.

| Cód | Compuesto | Estructura | % de producción | | | |
|-----|-------------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | | | % de formación | Piocianina (ppm/ μ M) | Proteasas (ppm/ μ M) | Elastasas (ppm/ μ M) |
| | | | Biopelícula (ppm/ μ M) | | | |
| C1 | etiltembamida |  | 56.4 \pm 12.8 (31.2/104.3) | NI | NI | NI |
| C2 | acetato de tembamida |  | 53.4 \pm 3.6 (125/399.3) | 68.4 \pm 14.4 (250/798.7) | NI | 62.7 \pm 7.4 (31.2/99.68) |
| C3 | cefaradiona B |  | 41.5 \pm 8.9 (31.2/97.1) | 47.9 \pm 13.7 (62.5/194.7) | NI | 57.1 \pm 12.7 (62.5/194.7) |
| C4 | benzamida |  | 34.2 \pm 3.1 (31.2/257.8) | 55.6 \pm 14.1 (31.2/257.8) | NI | 68.3 \pm 20.1 (31.2/257.8) |
| C5 | tembamida |  | 41.2 \pm 6.1 (250/922.1) | NI | NI | 68.7 \pm 19.1 (250/922.1) |
| C6 | ácido 4-metoxi-3-farnesilbenzoico |  | NI | NI | NI | NI |
| C7 | ácido 4-hidroxi-3- farnesilbenzoico |  | NI | 39.7 \pm 7.8 (62.5/182.7) | NI | 60.2 \pm 16.4 (250/730) |
| C8 | 2-farnesilhidroquinona |  | NI | 33.2 \pm 20.1 (250/796) | 73.9 \pm 13.9 (250 /796) | 44.3 \pm 18.3 (250/796) |

| | | | | | | |
|------------|--|--|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| C9 | piperina |  | 61.5 ± 12.9 (125/438.5) | 27.6 ± 5.3 (125/438.5) | 57.2 ± 2.6 (125/438.5) | 43.3 ± 9.6 (125/438.5) |
| C10 | piperlongumina |  | 51.4 ± 14.7 (250/915.7) | 35.2 ± 9.2 (250/915.7) | 64.2 ± 10.8 (250/915.7) | 43.8 ± 7.4 (250/915.7) |
| C11 | isopiperina |  | NI | 69.5 ± 48.2 (125/438) | 74.5 ± 19.2 (125/438) | 55.7 ± 21.1 (125/438) |
| C12 | 4-nero-lidilcatecol |  | NI | 61.6 ± 13.5 (62.5/199.1) | NI | 65.4 ± 8.9 (62.5/199.1) |
| C13 | Eriopodol |  | 53.2 ± 14.7 (62.5/252) | NI | NI | NI |
| C14 | Gibbilimbol |  | 28.1 ± 2.6 (15.6/67.2) | 22.7 ± 4.5 (125/538.7) | NI | 51.2 ± 7.9 (250/1077.5) |
| C15 | Ácido 4-metoxinervogénico |  | 38.6 ± 10.2 (31.2/108.3) | 53.3 ± 15.8 (62.5/217.1) | NI | 58.2 ± 16.1 (62.5/217.1) |
| C16 | ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico |  | 50.6 ± 9.6 (250/868.1) | 49.2 ± 32.9 (62.5/217.1) | 57.3 ± 17.1 (125/434.1) | 67.5 ± 42.4 (62.5/217.1) |
| C17 | 1,4-dihidroxi-2-(3'-hidroxi-3' 7'-dimetil-1'-oxo-6'- octenil)benceno |  | 53.1 ± 16.5 (31.2/112.2) | 64.4 ± 19.1 (31.2/112.2) | NI | 64.4 ± 14.2 (31.2/112.2) |
| C18 | debromocymopolona |  | 43.9 ± 4.1 (31.2/120) | 32.6 ± 2.5 (31.2/120) | 49.7 ± 10.6 (125/480.7) | 25.9 ± 14.4 (125/480.7) |

| | | | | | | |
|--------------------|---|--|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| C19 | 1,4-dihidroxi-2-(3', 7'-dimetil-1'-oxo-2'-Z-6'-octadienil)benceno |  | 44.2 ± 5.3 (125/480.7) | 44.3 ± 12.4 (250/961.5) | 68.7 ± 25.8 (250/961.5) | 40.2 ± 2.5 (250/961.5) |
| C20 | Lhotzromeno |  | NI | 63.1 ± 30.6 (62.5/229) | 75.2 ± 21.3 (250/919.1) | 73.1 ± 19.5 (250/919.1) |
| C21 | 1,4-dihidroxi-2-(1'-hidroxi-1'-metil-1'-etil)benceno |  | 44.5 ± 10.1 (31.2/185.7) | 58.8 ± 16.7 (31.2/185.7) | NI | 47.2 ± 12.5 (31.2/185.7) |
| Controles + | Ácido cinámico |  | NI | 32.3 ± 5.2 (250/1689) | 60.2 ± 14.4 (250/1689) | 42.6 ± 6.4 (250/1689) |
| | Quercetina |  | 29,9 ± 17.4 (3.9/12.9) | NI | NI | NI |

*Los datos se presentan como porcentaje de producción ± la desviación estándar de cinco réplicas de una repetición independiente y la concentración. Según la prueba estadística Duncan ($p < 0.05$) estos resultados tienen efecto significativo con respecto al control de la bacteria.

Estudios enfocados a inhibir la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* se consideran de interés ya que esta característica de la bacteria funciona como barrera de entrada a los antibióticos y está involucrada en infecciones asociadas a la atención médica al adherirse a dispositivos médicos aumentando los índices de morbilidad y mortalidad (Høiby et al., 2010; Corehtash et al., 2015; Thi et al., 2020). En este trabajo se encontró que de los 21 compuestos evaluados 5 de ellos (**C3**, **C14**, **C15**, **C18** y **C21**), causaron una reducción significativa en la formación de la biopelícula con porcentajes de producción menores al 50% a concentraciones inferiores a 200 μ M. De estos compuestos se destacan por su actividad **C3** (cefadiona B) y **C14** (gibilimbol), sin embargo, ninguno causó mayor inhibición que el control positivo. Este es el primer reporte de actividad inhibitoria sobre la formación de la biopelícula de algunos constituyentes químicos provenientes del género *Piper* evaluados. En la literatura se encuentran reportes que sugieren la potencialidad de hidroquinonas y amidas, para inhibir la formación de biopelículas. En un estudio sobre un sesquiterpeno hidroquinona conocido como avarol se determinó su capacidad para reducir la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* en un 75% (Pejin et al., 2014). Recientemente se diseñaron y sintetizaron compuestos estructuralmente diversos que inhiben la señalización basada en PqsR y LasR y disminuyen la producción de factores de virulencia y el crecimiento de biopelículas en dos cepas de *P. aeruginosa*. Entre los compuestos activos se encuentra la amida N-ciclopentil-5-(3-nitrofenil)-5-oxo-pentamida que inhibe la formación de la biopelícula en un 45% (10 μ M) (Hossain et al., 2020). Para derivados de ácidos benzoicos como es el caso del ácido vanílico se ha reportado su capacidad para reducir la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* en un 46% (4 mmol/L) (Ugurlu et al., 2016).

A continuación, se realizó una comparación entre la actividad de los constituyentes químicos evaluados y los extractos de especies del género *Piper* en donde fueron identificados (Tabla 3-6). De esta manera el efecto inhibitorio en la formación de la biopelícula de **C3** (46.7%, 62.5 ppm) proveniente de *P. pertomentellum* (77.5%, 62.5 ppm), **C18** (40.6%, 62.5 ppm) y **C21** (51.8%, 62.5 ppm) presentes en *P. ceanothifolium* (39.1%, 62.5 ppm), sugiere que estos compuestos pueden ser algunos de los responsables de la actividad antibiopelícula que presentaron los extractos. Por otra parte, el estudio realizado permitió determinar la inhibición

significativa en la formación de biopelícula de **C14** y **C15** provenientes de *P. eriopodon* y *P. pesaresanum* respectivamente, a pesar de que sus extractos no presentaron promisorio inhibición en la formación de biopelícula. Este efecto podría atribuirse a las bajas cantidades en la que se encuentran la mayoría de estos compuestos en el extracto y a la posible presencia de sustancias del extracto que atenúen la actividad observada en los compuestos por separado (Castillo-Juárez et al., 2013). Finalmente, también se estableció que para los extractos de especies que tuvieron actividad como *P. bogotense*, los compuestos evaluados (**C6–C8**), no causaron reducción en la formación de biopelícula, lo cual sugiere que el efecto pudo haber sido sinérgico por mezclas de constituyentes en el extracto o que no se aislaron e identificaron los compuestos bioactivos que pueden estar en muy bajas cantidades.

Tabla 3-6. Efecto en la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* de extractos y compuestos de especies de *Piper*.

| Código | Nombre compuesto | % formación biopelícula (62.5 ppm) | Especie | % formación biopelícula (62.5 ppm) |
|--------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| C1 | Etiltembamida | 72.9 ± 21.3 | <i>P. pertomentellum</i> (E16) | 77.5 ± 3.5 |
| C2 | Acetato de tembamida | 64.3 ± 10.2 | | |
| C3 | Cefaradiona B | 46.7 ± 13.6 | | |
| C4 | Benzamida | 35.6 ± 4.9 | | |
| C5 | Tembamida | 66.1 ± 13.6 | | |
| C6 | Ácido 4-metoxi-3-farnesilbenzoico | NI | <i>P. bogotense</i> (E6) | 19.8 ± 1.4 |
| C7 | Ácido 4-hidroxi-3-farnesilbenzoico | NI | | |
| C8 | 2-Farnesilhidroquinona | 73.3 ± 11.1 | | |
| C9 | Piperina | NI | <i>P. nigrum</i> (E14) | NI |
| C10 | Piperlonguminina | 71.3 ± 21.9 | | |
| C11 | iso-piperina | NI | | |
| C12 | 4-Nerolidilcatecol | NI | <i>P. peltatum</i> (E15) | NI |
| C13 | Eriopodol | 53.2 ± 14.7 | <i>P. eriopodon</i> (E10) | NI |
| C14 | Gibbilimbol | 70.9 ± 15.7 | | |
| C15 | Ácido 4-metoxinervogénico | 44.1 ± 7.8 | <i>P. pesaresanum</i> (E18) | NI |

| | | | | |
|-----|--|-------------|-------------------------------|------------|
| C16 | Ácido 3-(3',3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3'',3''-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico | NI | | |
| C17 | 1,4-dihidroxi-2- (3'-hidroxi-3' 7'-dimetil-1'-oxo-6'-octenil)benceno | 46.2 ± 7.7 | <i>P. ceanothifolium</i> (E7) | 39.1 ± 6.3 |
| C18 | Debromocymopolona | 40.6 ± 10.9 | | |
| C19 | 1,4-dihidroxi-2- (3', 7'-dimetil-1'-oxo-2' -6'-octadienil)benceno | NI | | |
| C20 | Lhotzcromeno | NI | | |
| C21 | 1,4-dihidroxi-2-(1'-hidroxi-1',1'-dimetil)benceno | 51.8 ± 15.1 | | |

NI: No inhibe

Otros factores que son objetivo de inhibición dentro de las estrategias antivirulentas son las proteasas, reguladas principalmente por el sistema LasII/R y RhII/R, y que interfieren en los mecanismos de defensa, son agentes cruciales en la degradación y deterioro de las proteínas de los tejidos del huésped (Karatuna & Yagci, 2010; Rather et al., 2022). *P. aeruginosa* secreta diferentes tipos de proteasas que cumplen con funciones particulares: la proteasa *LasA* que tiene actividad estafilolítica, la elastasa *LasB* que modifica la superficie inicial para la invasión bacteriana y la proteasa alcalina que junto con la *LasB* ayudan a *P. aeruginosa* a evadir el sistema inmunitario (Rather et al., 2021; Peerzada et al., 2022). Es importante resaltar que la elastasa *LasB* puede iniciar la vía de la formación de biopelícula con la activación del nucleósido difosfato quinasas (NDK), por lo que su inhibición puede apuntar a múltiples procesos virulentos (Cathcart et al., 2011). En este estudio se evaluó el potencial para inhibir la producción de proteasas y elastasas de **C1** a **C21** (Tabla 3-5), lo que permitió determinar por primera vez que los compuestos **C8-C11**, **C16** y **C18-C20** redujeron la producción de proteasas, siendo los más promisorios por la producción menor al 60% los compuestos **C9**, **C16** y **C18**. Del análisis de los resultados se puede deducir que la isomería geométrica de los dobles en la amida **C9** parecen favorecer la actividad al compararla la estructura con la de su isómero **C11**. Adicionalmente, de la comparación de **C10** y **C9** se puede deducir que la sustitución sobre el nitrógeno del grupo amida también influye en la actividad que presenta **C9**. Por otra parte,

cabe resaltar que los compuestos **C18** y **C19** corresponden a tres hidroquinonas que se diferencian por la presencia del doble enlace con configuración *E* en la posición 2' que parece favorecer la actividad de **C18** en comparación a su isómero geométrico **C19**. De los tipos de metabolitos bioactivos determinados en este estudio, solo se ha encontrado reportes en la literatura para ácidos benzoico como el vanílico en donde se determinó su capacidad para inhibir en un 50% la biosíntesis de proteasas en otras bacterias como *Serratia marcescens* (Sethupathy et al., 2017).

En los ensayos para inhibir la producción de elastasas de los constituyentes provenientes del género *Piper* (**C1** a **C21**), se determinó que **C3**, **C7-C11**, **C14**, **C15**, **C18**, **C19** y **C21** redujeron la producción en más del 60%, destacándose **C9** (piperina), **C18** (debromocymopolona) y **C21** (1,4-dihidroxi-2-(1'-hidroxi-1'-metiletil)benzeno), porque causaron porcentajes de producción de elastasas de 43.3% (438.5 μ M), 25.9% (480.7 μ M) y 47.2% (185.7 μ M), respectivamente (Tabla 4-5). Es importante mencionar que los compuestos **C18** y **C21** corresponden a dos hidroquinonas que se diferencian por el tamaño de la cadena alquílica, lo que sugiere que la presencia de la cadena prenilada en **C18** puede ser necesaria para potenciar la inhibición sobre elastasas. Estos resultados son consistentes a lo reportado en la literatura recientemente, en donde mediante estudios computacionales se plantea que compuestos con cadena lateral entre 10 y 12 átomos de carbono actúan como antagonistas del sistema LasR (Victoria-Munoz et al., 2022).

Otro de los factores de virulencia relevantes es la piocianina, cuya producción es regulada por los tres sistemas de QS de *P. aeruginosa*, y es un factor citotóxico que se libera en grandes cantidades durante los procesos de infección pulmonar en la fibrosis quística (Antunes et al., 2010; Peerzada et al., 2022). En este estudio se determinó que los compuestos que redujeron la producción de este pigmento en al menos un 60% fueron **C3**, **C4**, **C7-C10**, **C14-C16**, **C18**, **C19** y **C21**. Se destacan aquellos compuestos que ocasionaron el mayor efecto a concentraciones menores de 200 μ M, correspondiendo a **C3** (cefaradiona B), **C7** (ácido 4-hidroxi-3-farnesilbenzoico) y **C18** (debromocymopolona), los cuales ocasionaron porcentajes de producción de 47.9% (194.7 μ M), 39.7% (182.7 μ M), 32.6% (120 μ M),

respectivamente (Tabla 3-5). Estos compuestos no han presentado reportes previos en la literatura sobre la producción de piocianina a las concentraciones evaluadas. Sin embargo, para **C9** (piperina) se había descrito en la literatura que presentó inhibición de este pigmento a una concentración menor a 50 ppm (Vázquez et al 2020), siendo muy diferente a la evaluada en este trabajo (125 ppm). En la literatura se han reportado efectos inhibitorios en la producción de este pigmento para moléculas con similar núcleo base (amidas, y derivados de ácido benzoico, hidroquinonas). Recientemente se reportó la amida N-ciclopentil-5-(3-nitrofenil)-5-oxo-pentamida con capacidad para inhibir la producción de piocianina en un 25% (10 μ M) (Hossain et al., 2020). Para el sesquiterpeno hidroquinona avarol, se reportó que redujo la producción de piocianina de *P. aeruginosa* en un 39% (Pejin et al., 2014). En otro estudio se determinó al ácido vanílico, su potencial para reducir la producción de piocianina de *P. aeruginosa* en un 16% (4 mmol/L) (Ugurlu et al., 2016). Es importante resaltar que C6, C7, C15 y C16 corresponden a cuatro derivados de ácido benzoico donde C6 y C7 se diferencian por la presencia de un grupo metoxilo en la posición 4 del anillo aromático para C6 y un hidroxilo para C7 en esta misma posición, lo que sugiere que el grupo hidroxilo parece favorecer la actividad por los resultados promisorios de C7. Por otra parte, para los compuestos C15 y C16 se sugiere que la presencia de una cadena oxoprenilada de la posición 3 del benceno y el grupo hidroxilo en la posición 4 de C16, puede ser necesaria para potenciar la inhibición sobre la piocianina.

Las moléculas con acción multidiana sobre los factores de virulencia son de gran interés en la actualidad, para el control de QS ya que permiten actuar simultáneamente sobre algunas vías regulatorias, aprovechando la relación con los sistemas (LasI, Rhl, PQS y IQS) que conforman esta red de comunicación en *P. aeruginosa* (Lee & Zhang, 2015; Kostylev et al., 2019). En el presente trabajo se determinaron algunos constituyentes presentes en especies del género *Piper* con potencial para modular todos los factores de virulencia y la formación de biopelículas. Los compuestos con potencial multidiana correspondieron a amidas (**C9** y **C10**), hidroquinonas (**C8**, **C18** y **C19**) y derivados de ácido benzoico (**C16**). Reportes previos confirman que este tipo de metabolitos han tenido efectos positivos al modular el QS de *P. aeruginosa* y para algunos se han identificado los mecanismos de acción. De las hidroquinonas se ha descrito que tienen la

capacidad de alterar la integridad de la membrana celular a través del estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno y los iones que se liberan de la membrana celular, razón que puede estar relacionado con el efecto inhibitorio de este tipo de compuesto en la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* (Jeyanthi et al., 2021). En un estudio realizado sobre avarol un sesquiterpeno hidroquinona, se determinó que presentó efectos inhibitorios en la producción de factores de virulencia como la producción de pirocianina, motilidad y formación de biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1 a concentraciones subinhibitorias (Pejin et al., 2014). Desde hace algunos años se ha reportado el potencial en la inhibición del QS de *P. aeruginosa* de derivados de ácido benzoico y amidas, por su capacidad para modular la biopelícula y los factores de virulencia (Deryabin et al., 2019; Başaran et al., 2020). Así mismo se ha determinado por estudios computacionales que compuestos con anillos aromáticos conectados por una cadena alifática corta con grupo funcional amida tienen alta afinidad por el sistema LasR, el cual controla los factores de virulencia evaluados (Victoria-Muñoz et al., 2022).

Al realizar un análisis de relación estructura-actividad preliminar fue posible establecer que de las hidroquinonas (**C8**, **C17**, **C18**, **C19** y **C21**), el compuesto **C18** fue el más activo, sugiriendo que la presencia de su cadena lateral de tipo oxogeranilo y con isomería *E* en el doble enlace de la posición 2' favorece la actividad en comparación a su isómero geométrico (**C19**). Al comparar la actividad de **C18** y **C8**, se deduce que leve actividad en la producción de proteasas y biopelícula de **C8**, puede deberse a la presencia de una cadena prenilada de más de 10 de carbonos y a la ausencia del grupo carbonilo. En cuanto a **C21** y **C17** estos no tuvieron actividad en proteasas, pero sí frente a los otros factores de virulencia. Al comparar **C21** con **C18** se sugiere que la cadena prenilada es importante para la actividad. De la comparación de **C18** con **C17** se puede deducir que la inactividad de **C17** puede ser por la presencia de un grupo hidroxilo en la cadena prenilada y la ausencia del doble enlace en la posición 2'.

Finalmente, el presente trabajo constituye el primer reporte de inhibición de la producción de factores de virulencia y la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* de algunos constituyentes presentes en especies de *Piper*. Teniendo en cuenta el potencial encontrado, es importante continuar los estudios sobre este tipo de

sustancias que involucren la expresión génica, otros factores de virulencia y también a nivel computacional, que permitan identificar su mecanismo de acción y que puedan pasar a una fase clínica (Bramhachari, 2019; Aljeldah, 2022; Bassetti et al., 2022).

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

Con el presente estudio se contribuye a la determinación del potencial inhibitorio de sustancias provenientes de especies del género *Piper* sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados de este trabajo permitieron concluir que:

- Esta investigación contribuye a la caracterización del potencial anti-QS de extractos provenientes de especies del género *Piper*, determinándose a *P. asperiusculum*, *P. cumanense*, *P. pertomentellum*, *P. bogotense*, *P. sucrense* y *P. grande*, como las de mayor acción inhibitoria en la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 y en la producción de violaceína *C. violaceum* ATCC 12472.
- El estudio fitoquímico realizado sobre la parte aérea de *P. pertomentellum* condujo al aislamiento e identificación por primera vez en la especie de cinco amidas (**C1-C5**), destacándose **C1** (etiltembamida) que no tiene reportes previos en la literatura.
- Este estudio permitió determinar el potencial de algunos constituyentes químicos presentes en especies del género *Piper* sobre algunos factores de virulencia asociados al sistema QS de *Pseudomonas aeruginosa*. Se destaca el potencial inhibitorio de los factores de virulencia de los compuestos con potencial multidiana que correspondieron a amidas (**C9** y **C10**), hidroquinonas (**C8**, **C18** y **C19**) y derivados de ácido benzoico (**C16**).

4.2 Recomendaciones y proyecciones

- Teniendo en cuenta el potencial anti-QS que tuvieron las especies de *Piper*, se recomienda continuar con la caracterización de otros extractos provenientes de este género presentes en Colombia
- Se recomienda continuar con la investigación fitoquímica sobre las especies pertenecientes al género *Piper* que presentaron potencial de inhibición de QS, con el fin de continuar caracterizando los constituyentes químicos con potencial anti-QS.
- Es importante seguir realizando estudios que permitan determinar el mecanismo de acción de los compuestos que tuvieron actividad sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa*. y realizar ensayos más específicos de QS con el fin de ampliar el espectro de actividad.
- Para algunos de los compuestos aislados en este estudio se recomienda determinar la estereoquímica para complementar su caracterización química.

Producción científica

Los resultados obtenidos en esta investigación han sido presentados en congresos nacionales e internacionales:

- Hernández-Moreno L.V., Pabón-Baquero L.C, Patiño-Ladino O.J. **Evaluación del potencial de inhibición de quorum sensing de plantas del género *Piper sp.* frente a *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente.** 1er SIMPOSIO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA. Bogotá, 2020. Participación en modalidad oral (virtual).
- Hernández-Moreno L.V., Cuca-Suárez L.E, Patiño-Ladino O.J, Pabón-Baquero L.C, Hernández-Rodríguez P., Gómez V., Prieto-Rodríguez J.A. **Evaluación del potencial anti-quorum sensing y antibiofilm de plantas colombianas pertenecientes al género *Piper*.** Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2021, "Al ritmo de los nuevos tiempos. Ciudad de México, 2021. Participación en modalidad oral (virtual).
- Hernández-Moreno L.V., Pabón-Baquero L.C, Patiño-Ladino O.J. **Actividad anti-quorum sensing y antibiofilm de *Piper pertomentellum*,** COLAPLAMED - IX Congreso latinoamericano de plantas medicinales. Ecuador, 2021. Participación en modalidad oral (virtual).
- Hernández-Moreno L.V., Pabón-Baquero L.C, Patiño-Ladino O.J. **Constituyentes químicos de *Piper pertomentellum* atenúan la producción de virulencia del patógeno *Pseudomonas aeruginosa* in vitro.** XIV Congreso Colombiano de Fitoquímica y I Congreso Colombiano de Semilleros de Fitoquímica. Universidad de Sucre, Sincelejo, 2022. Participación en modalidad oral.

- Lida Vanessa Hernández Moreno. **Vinculación de talento joven e impacto regional en el proyecto de investigación "Identificación de moléculas líderes de origen natural con acción multidiana como inhibidores de quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente"** UNAL Investiga 2021. Bogotá 2021. Participación en modalidad oral (virtual).

- Hernández-Moreno L.V., Patiño-Ladino O.J, Pabón-Baquero L.C. **Potential Anti-Quorum sensing and Anti-biofilm of compounds from *Piper pertomentellum* against *Pseudomonas aeruginosa*.** *Molecules* (En preparación)

- Hernández-Moreno L.V., Pabón-Baquero L.C, Patiño-Ladino O.J, **Anti-Quorum sensing and Anti-biofilm activity of extracts from species of *Piper* and their constituents in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Plants* (En preparación)

5. Anexos:

5.1 Potencial de los extractos de *Piper* en la susceptibilidad de *P. aeruginosa*

Tabla 5-1. Efecto de los extractos provenientes de especies de *Piper* en el crecimiento de *P. aeruginosa*

| Código | Especie | Concentraciones (ppm) y resultados % crecimiento | | |
|--------|--------------------------------|--|--------------|--------------|
| | | 1000 | 250 | 62,5 |
| E1 | <i>P. annulatispicum</i> (H) | 100.5 ± 0.9 | 112.1 ± 2.1 | 109.2 ± 1.1 |
| E2 | <i>P. asperiusculum</i> (H) | 108.7 ± 1.7 | 109.4 ± 2.2 | 117.1 ± 1.1 |
| E3 | <i>P. asperiusculum</i> (I) | 73.4 ± 6.1 * | 87.8 ± 4.1 | 105.2 ± 12.5 |
| E4 | <i>P. asperiusculum</i> (T) | 87.5 ± 9.3 | 97.9 ± 12.5 | 116.1 ± 6.1 |
| E5 | <i>P. bogotense</i> (PA) | 97.2 ± 4.5 | 109.7 ± 7.9 | 100.6 ± 8.2 |
| E6 | <i>P. bogotense</i> (PA) | 101.9 ± 1.1 | 98.8 ± 2.5 | 95.6 ± 2.1 |
| E7 | <i>P. ceanothifolium</i> (I) | 72.5 ± 1.3* | 87.2 ± 4.9 | 109.5 ± 5.5 |
| E8 | <i>P. cumanense</i> (PA) | 32.6 ± 11.1* | 82.8 ± 13.6 | 97.9 ± 4.1 |
| E9 | <i>P. cundinamarcanum</i> (PA) | 103.3 ± 2.1 | 105.3 ± 0.3 | 100.3 ± 3.1 |
| E10 | <i>P. eriopodon</i> (PA) | 87.5 ± 0.5* | 89.1 ± 3.1 | 101.7 ± 0.7 |
| E11 | <i>P. falcifolium</i> (H) | 83.8 ± 3.4* | 108.3 ± 1.5 | 109.3 ± 1.1 |
| E12 | <i>P. grande</i> (H) | 104.9 ± 2.5 | 106.6 ± 2.1 | 100.1 ± 12.7 |
| E13 | <i>P. haughtii</i> (H) | 102.4 ± 1.55 | 109.5 ± 0.9 | 106.6 ± 0.13 |
| E14 | <i>P. nigrum</i> (S) | 75.5 ± 0.2* | 88.8 ± 9.6 | 110.4 ± 11.1 |
| E15 | <i>P. peltatum</i> (I) | 51.8 ± 5.9 * | 69.4 ± 5.5* | 90.9 ± 1.3 |
| E16 | <i>P. pertomentellum</i> (PA) | 93.3 ± 7.2 * | 103.3 ± 15.5 | 110.1 ± 14.6 |
| E17 | <i>P. pertomentellum</i> (T) | 129.3 ± 9.8 | 132.2 ± 1.3 | 122.1 ± 6.6 |
| E18 | <i>P. pesaresanum</i> (PA) | 100.6 ± 2.5 | 108.2 ± 2.9 | 111.6 ± 0.9 |
| E19 | <i>P. statarium</i> (PA) | 70.3 ± 6.1* | 94.1 ± 0.2 | 100.8 ± 0.5 |
| E20 | <i>P. sucrense</i> (H) | 97.5 ± 3.2 | 91.4 ± 4.8 | 100.4 ± 5.5 |

| | | | | |
|-----|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| E21 | <i>P. umbelatum</i> (H) | 3.5 ± 10.3* | 78.1 ± 19.2 | 97.1 ± 14.6 |
| | <i>Gentamicina</i> (2 ppm) | 2.3 ± 0.2 | | |

H: hojas. T: tallos. PA: parte aérea. I: inflorescencias. *Inhibe significativamente diferente en comparación al control con un p valor <0.05 (prueba Duncan).

5.2 Potencial de los extractos de *Piper* en la susceptibilidad de *P. aeruginosa*

Tabla 5-2. Efecto del extracto y fracciones provenientes de especies de *Piper* en el crecimiento de *P. aeruginosa*

| Extracto etanólico y Fracciones de <i>P. pertomentellum</i> | Concentración (ppm) y resultados % de crecimiento | | |
|---|---|-------------|--------------|
| | 1000 | 250 | 62.5 |
| EE | 129,1 ± 9,8 | 132,2 ± 1,3 | 122,1 ± 6,6 |
| DCM | 79,1 ± 1,8 | 86,6 ± 2,6 | 95,6 ± 3,7 |
| AcOEt | 100,7 ± 2,7 | 103,1 ± 1,5 | 107,1 ± 1,3 |
| IPA | 100,8 ± 3,4 | 101,1 ± 2,7 | 110,7 ± 1,3 |
| EtOH:H2O | 107,8 ± 4,2 | 108,5 ± 1,7 | 105,5 ± 12,1 |
| <i>Gentamicina</i> (2 ppm) | 1.6 ± 1.5 | | |

5.3 Datos espectroscópicos y constantes físicas de los compuestos provenientes de *P. pertomentellum*

Datos espectroscópicos y constantes físicas de los compuestos:

etiltembamida **(C1)**

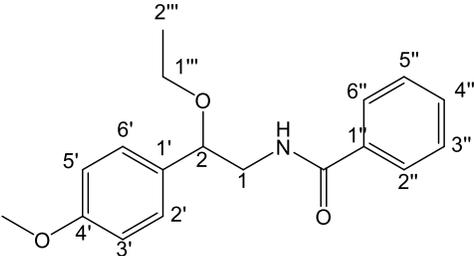
acetato de tembamida **(C2)**

cefaradiona B **(C3)**

benzamida **(C4)**

tembamida **(C5)**

Tabla 5-3. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C1**

| | | |
|---|---------------------------|--|
|  | Nombre: | Etiltembamida |
| | Estado físico: | Sólido blanco en forma de agujas |
| | Formula molecular: | C ₁₈ H ₂₁ NO ₃ |
| | Punto de fusión: | 93 – 95°C |
| | Datos EMAR | EMAR calculada C ₁₈ H ₂₁ NO ₃ (m/z 296.1209 [M+H] ⁺ , calculado para C ₁₈ H ₂₁ NO ₃ , 296.1281) |
| IR = 3331 (NH), 3061 (C(sp ²)-H), 1635 (C=O), 1543 (C-N), 1600 y 1500 (C=C) 1246, 1100 y 1029 (C-O-C), 1029 (Ar-O-C) cm ⁻¹ | | |
| RMN¹H: (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.78- 7.74 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.54 – 7.48 (m, 1H, H-4''), 7.44 (dd, <i>J</i> = 8.1, 6.5 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.28 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H, H-2' H-6'), 6.91 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.60 (sa, 1H, NH), 4.44 (dd, <i>J</i> = 8.9, 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.89 (ddd, <i>J</i> = 13.8, 7.8, 4.0 Hz, 1H, H-1), 3.82 (s, 3H, MeOH), 3.46 (m, 1H, H-1'''), 3.41- 3.31 (m, 1H, H-1), 3.41- 3.31 (m, 1H, H-1''') 1.19 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H). | | |
| APT: (100 MHz, CDCl ₃) δ 167.3 (C=O), 159.5 (C, C-4), 134.7 (C, C-1''), 131.8 (C, C-1'), 131.5 (CH, C-4''), 128.6 (2CH, C-3'', C-5''), 127.8 (2CH, C-2', C-6'), 126.9 (2CH, C-2'', C-6''), 114.0 (2CH, C-3', C-5'), 80.0 (CH, C-2), 64.2 (CH ₂ , C-1'''), 55.3 (CH ₃ , C-CH ₃ OH), 46.2 (CH ₂ , C-1), 15.3 (CH ₃ , C-2'''). | | |
| Bibliografía datos espectroscópicos: No reporta. | | |

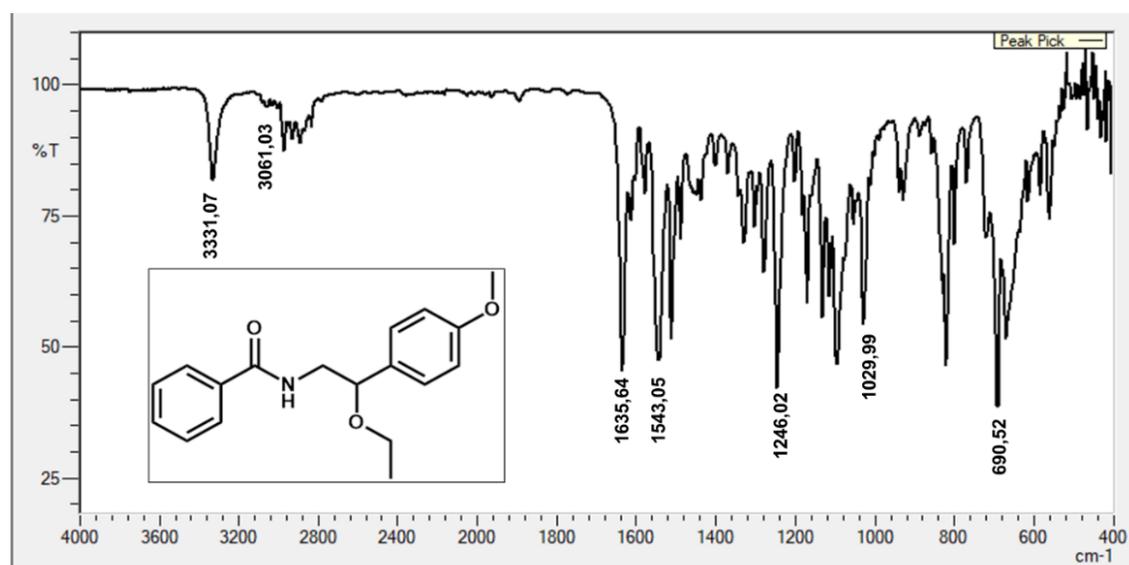


Figura 5-1. Espectro IR de compuesto **C1**

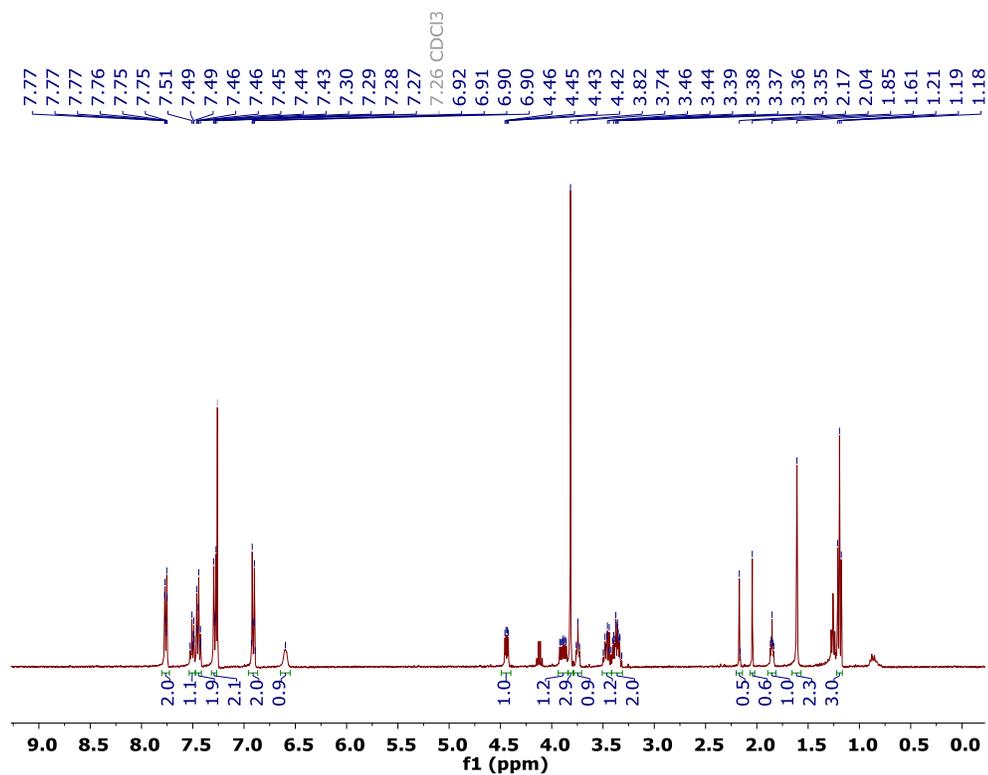


Figura 5-2. Espectro RMN¹H de compuesto **C1** (CDCl₃, 400 MHz).

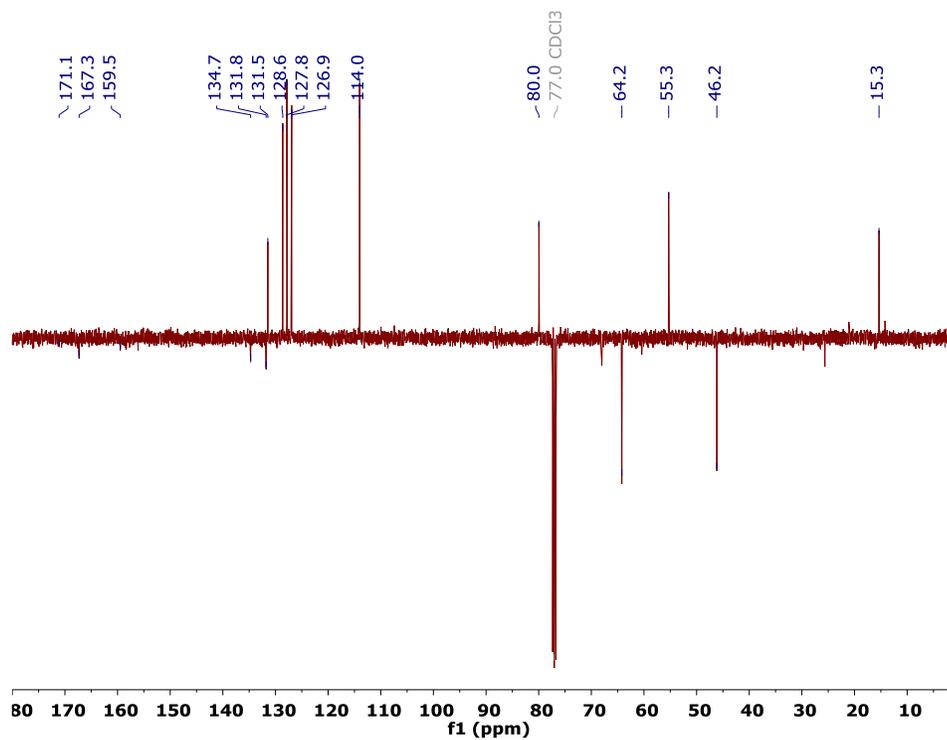


Figura 5-3. Espectro APT de compuesto **C1** (CDCl₃, 100 MHz).

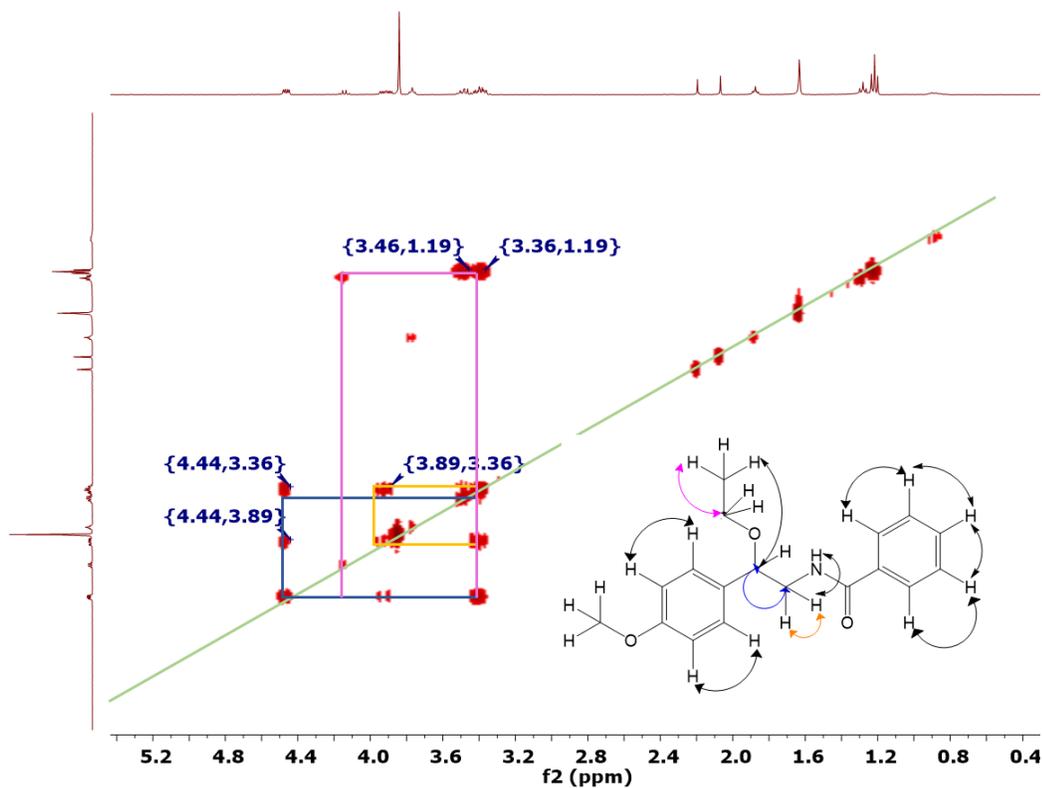


Figura 5-4. Espectro COSY de compuesto **C1** (CDCl_3).

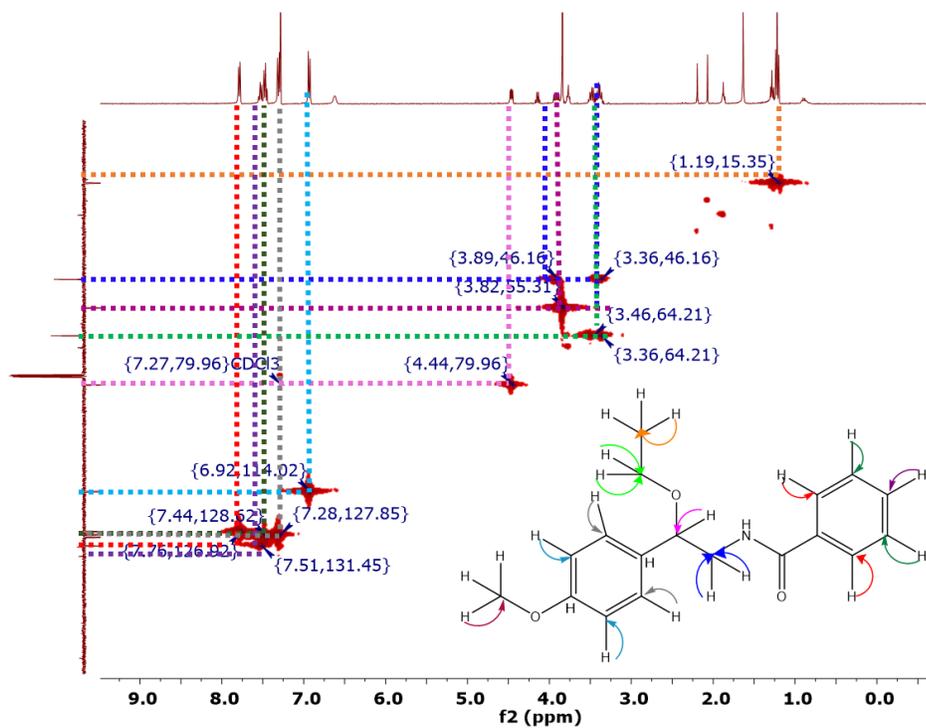


Figura 5-5. Espectro HMBC de compuesto **C1** (CDCl_3).

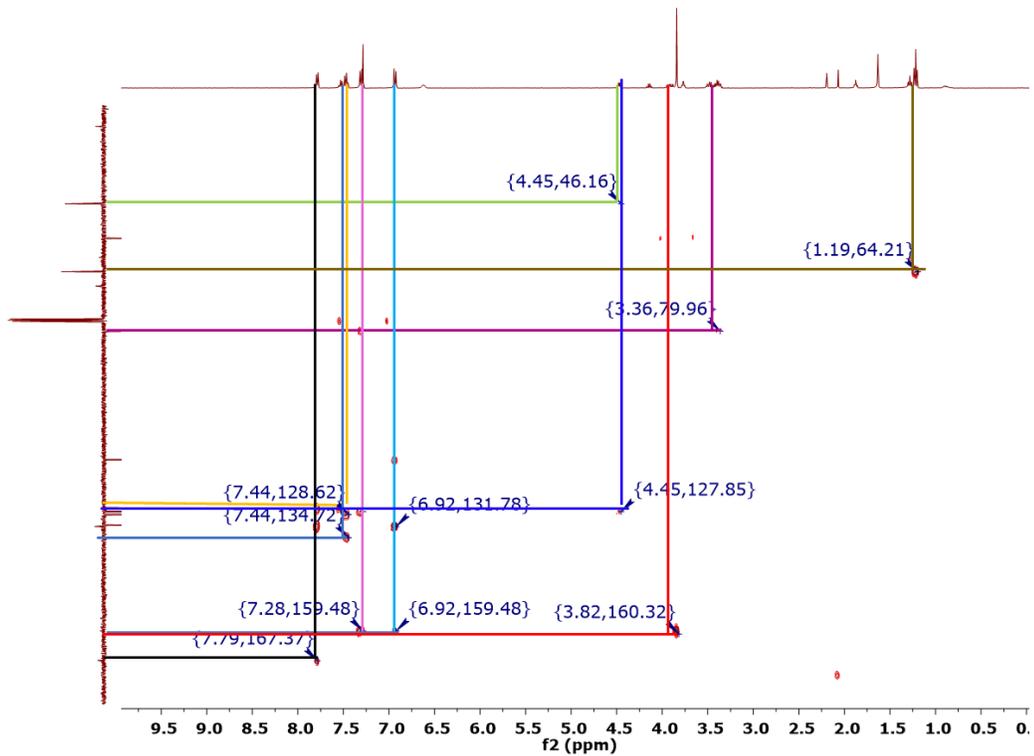


Figura 5-6. Espectro HMBC de compuesto **C1** (CDCl₃, 100 MHz).

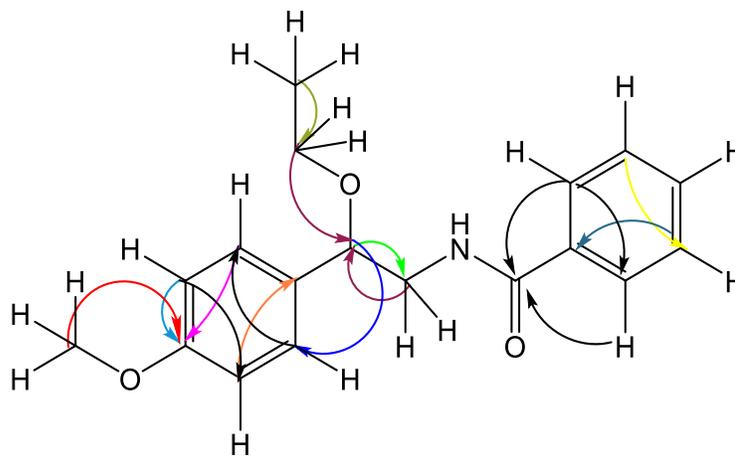


Figura 5-7. Principales correlaciones en HMBC para el compuesto **C1**.

Tabla 5-4. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C2**.

| | | |
|---|---------------------------|---|
| | Nombre: | Acetato de tembamida |
| | Estado físico: | Sólido blanco en forma de agujas |
| | Formula molecular: | C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ |
| | Punto de fusión: | 155-157 °C |
| <p>RMN¹H: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.52 (t, <i>J</i> = 7,4 Hz, 1H, H-4''), 7.46 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.36 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.93 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.44 (s, 1H, NH), 5.97 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H, H-2), 3.86 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H, H-1), 3.83 (s, 3H, MeOH), 2.12 (s, 3H, H-2''').</p> | | |
| <p>APT: (100 MHz, CDCl₃) δ 170.7 (C, C=O), 167.4 (C, C=O), 159.8 (C, C4'), 134.3 (C, C-1'') 131.6 (CH, C-3''), 129.7 (C, C-1'), 128.6 (2CH, C-6''), 127.9 (2CH, 4''), 126.9 (2CH, 2''), 114.2 (2CH, C-3'), 74.4 (CH, C-2), 55.3 (CH₃, MeOH), 45.0 (CH₂, C-1), 21.2 (CH₃, C-2''').</p> | | |
| <p>Bibliografía datos espectroscópicos: (Maxwell & Rampersad, 1989; do Nascimento et al., 2012)</p> | | |

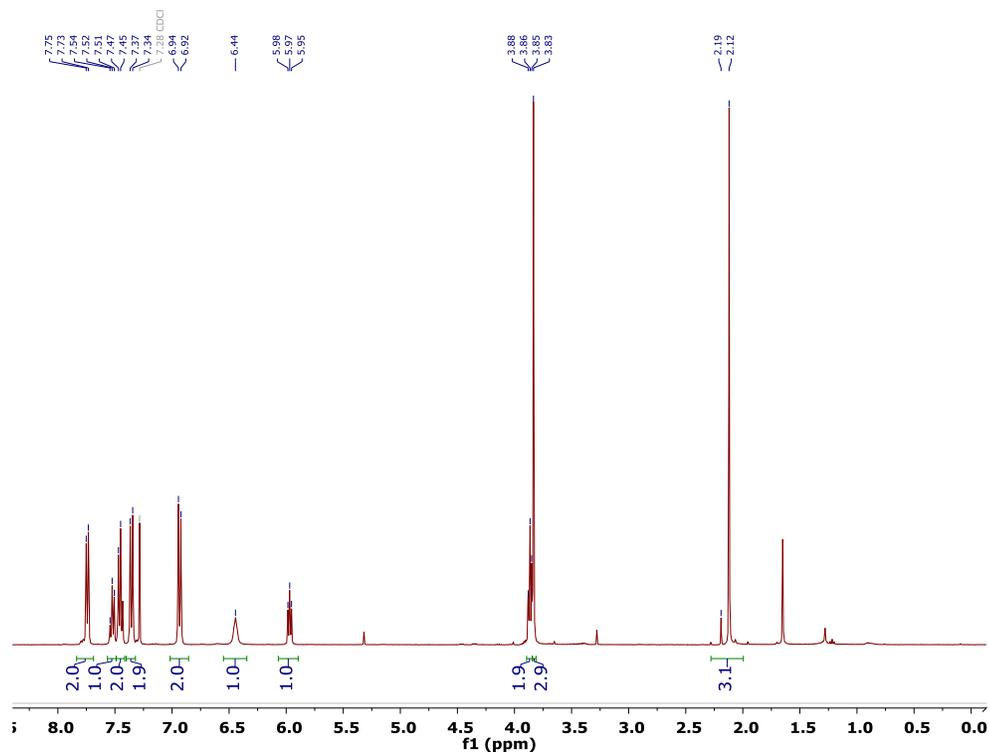


Figura 5-8. Espectro RMN¹H de compuesto **C2** (CDCl₃, 400 MHz).

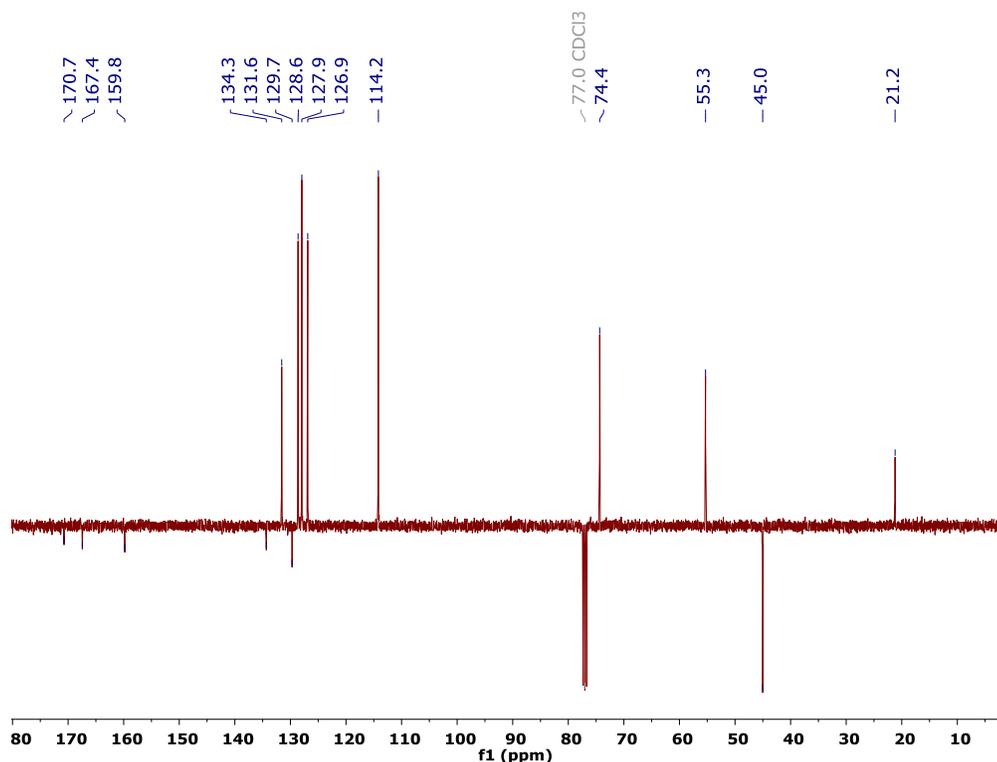


Figura 5-9. Espectro APT de compuesto **C2** (CDCl₃, 100 MHz).

Tabla 5-5. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C3**.

| | | |
|--|---------------------------|---|
| | Nombre: | cefaradiona B |
| | Estado físico: | Sólido amarillo fluorescente |
| | Formula molecular: | C ₁₈ H ₁₅ NO ₄ |
| | Punto de fusión: | 267-268°C |
| RMN¹H: (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.48 (t, 1H, H-11), 8.19 (s, 1H, H-3), 7.85 (t, 1H, H-8), 7.65 (t, 2H, H-9, H-10), 7.44 (s, 1H, H-7), 4.10 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 6H, OMe-3, OMe-4), 3.83 (s, 3H, N-Me, H-6), | | |
| APT: (100 MHz, CDCl ₃) δ 175.6 (C=O, C-4), 156.4 (C=O, C-5), 155.1 (C-1), 153.1 (C-2), 132.4 (C), 131.9 (C-6a), 129.2 (C-8), 128.2 (C-9), 127.8 (C-10, C-11), 127.1, 124.7 (C), 123.8 (C), 119.7 (C), 114.4 (C-7), 112.7 (C-3), 60.6 (C), 56.6 (C), 29.8 (N-Me, C-6), | | |
| Bibliografía datos espectroscópicos: (Desai et al., 1988) | | |

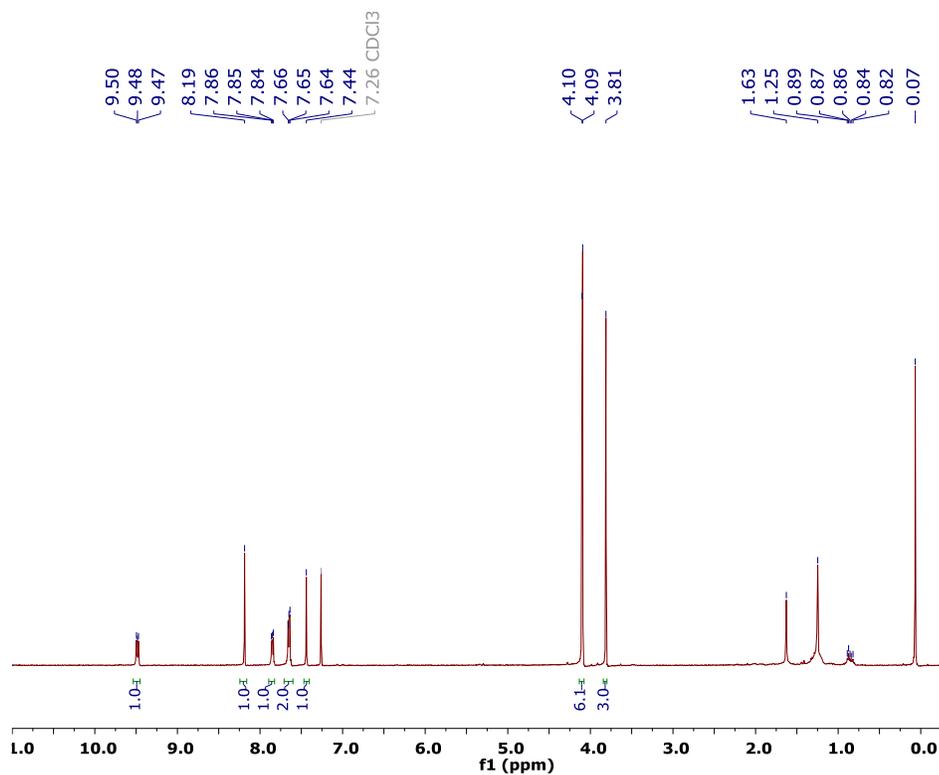


Figura 5-10. Espectro RMN¹H de compuesto **C3** (CDCl₃, 400MHz).

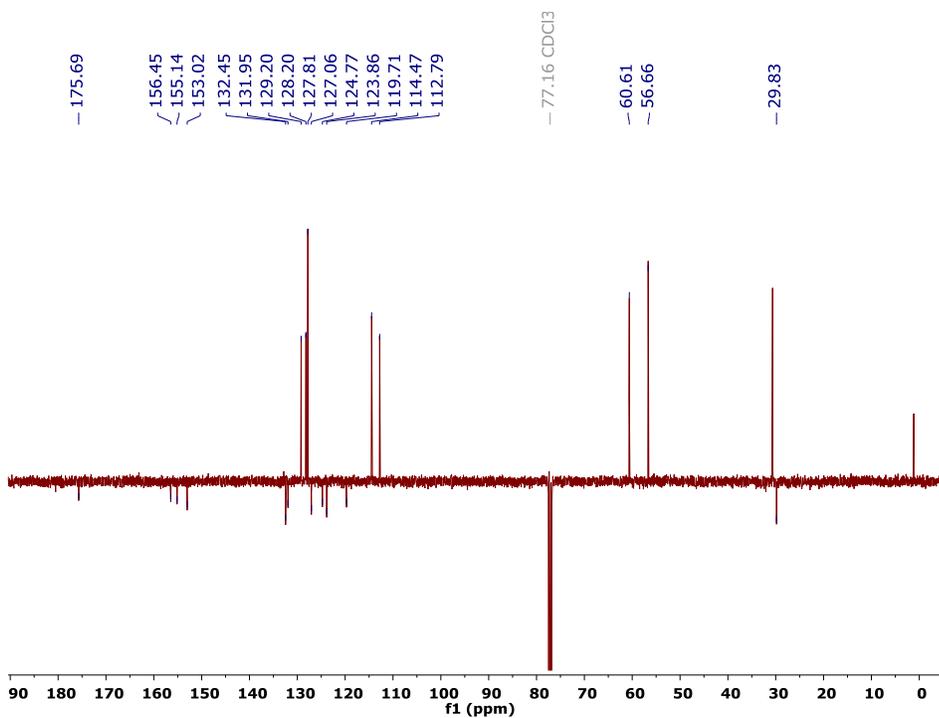
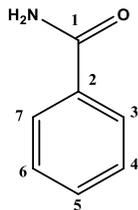


Figura 5-11. Espectro de APT compuesto **C3** (CDCl₃, 100 MHz).

Tabla 5-6. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C4**.

| | | |
|---|---------------------------|----------------------------------|
|  | Nombre: | Benzamida |
| | Estado físico: | Solido blanco |
| | Formula molecular: | C ₇ H ₇ NO |
| | Punto de fusión: | 120°C |
| RMN¹H: (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.85- 7.79 (m, 2H, H-3,7), 7.57 – 7.51 (m, 1H, H-5), 7.45 (dd, <i>J</i> = 8.2, 6.7 Hz, 2H, H-4,6), 6.04 (d, <i>J</i> = 73.1 Hz, 2H, NH). | | |
| APT: (100 MHz, CDCl ₃) δ 169.5 (C-1), 133.4 (C-2), 132.1 (C-5), 128.7 (C-4,6), 127.4 (C-3,7) | | |
| Bibliografía datos espectroscópicos: (Lignier et al., 2011) | | |

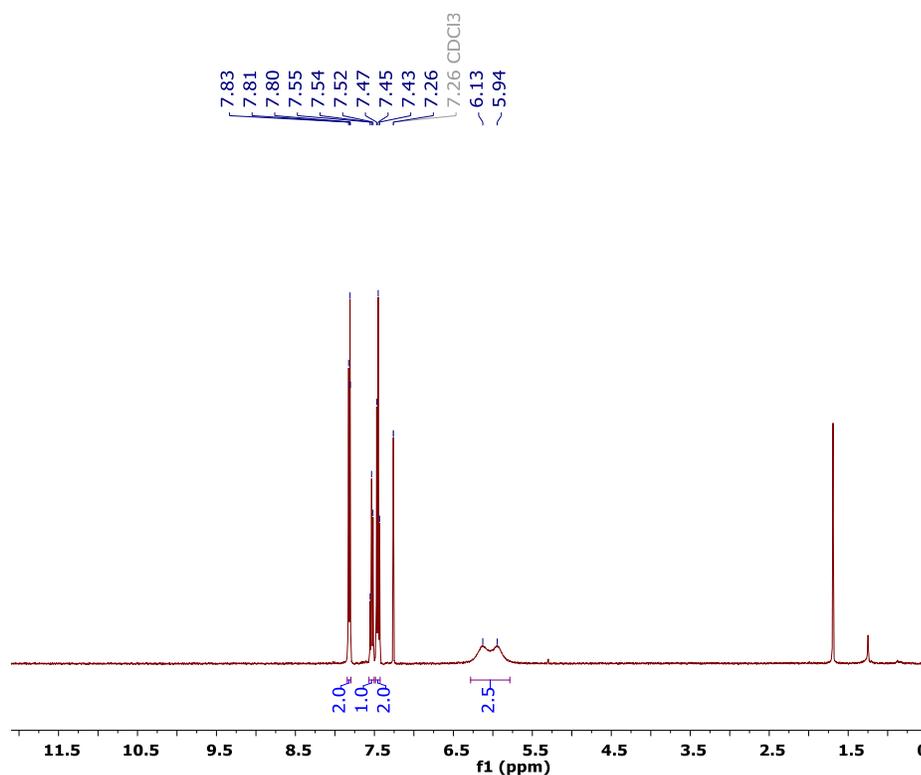


Figura 5-12. Espectro RMN¹H de compuesto **C4** (CDCl₃. 400 MHz).

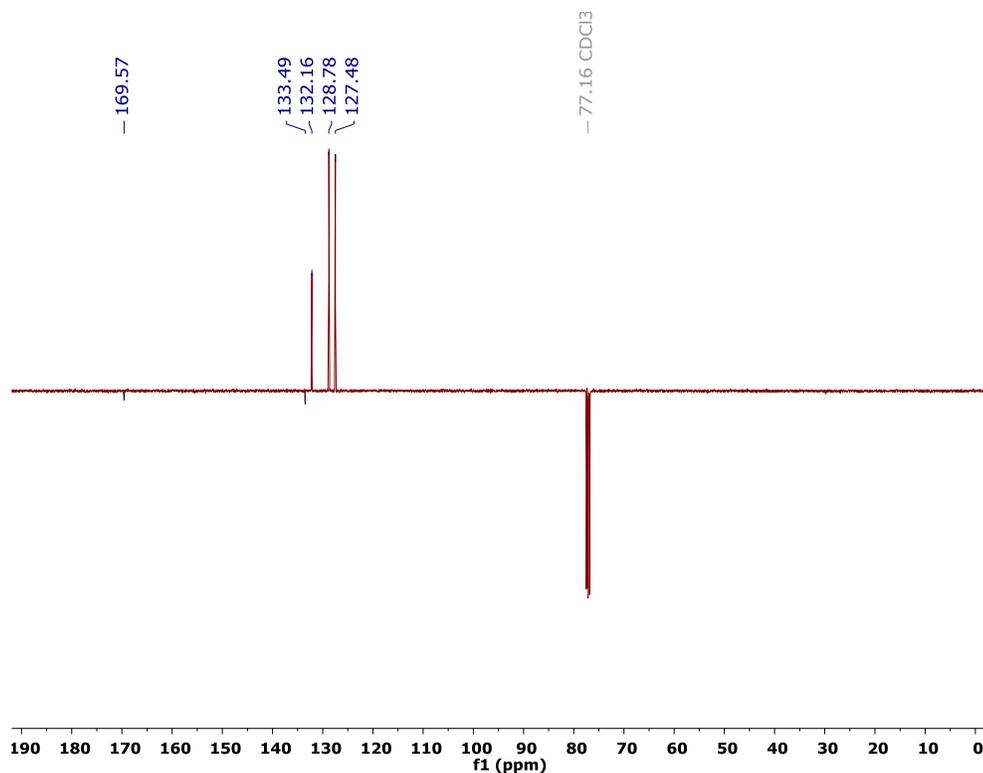


Figura 5-13. Espectro APT de compuesto **C4** (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabla 5-7. Datos espectroscópicos y constantes físicas del compuesto **C5**.

| | | |
|--|---------------------------|---|
| | Nombre: | Tembamida |
| | Estado físico: | Sólido blanco en forma de agujas |
| | Formula molecular: | $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ |
| | Punto de fusión: | 155-156°C |
| <p>RMN¹H: (400 MHz, Metanol-d₄) δ 7.78 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.55 – 7.50 (m, 1H, H-4''), 7.44 (m, 2H, H-5''), 7.34 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-2', H-6'), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 4.85 (dd, $J = 7.8, 5.1$ Hz, OH), 3.78 (s, 3H, H-MeOH), 3.57 (qd, $J = 13.5, 6.4$ Hz, 2H, H-1).</p> | | |
| <p>APT: (100 MHz, Metanol-d₄) δ 169.1 (C, C=O), 159.3 (CH_3, C-4'), 134.5 (C, C-1''), 134.2 (C, C-1'), 131.2 (CH, C-4''), 128.1 (2CH, C-3'', C-5''), 127.0 (2CH, C-2', C-6'), 126.8 (2CH, C-2'', C-6''), 113.3 (2CH, C-3', C-5'), 71.7 (CH, C-2), 54.2 (CH_3), 47.2 (CH_2, C-1).</p> | | |
| <p>Bibliografía datos espectroscópicos: (H. A. da Silva et al., 2018)</p> | | |

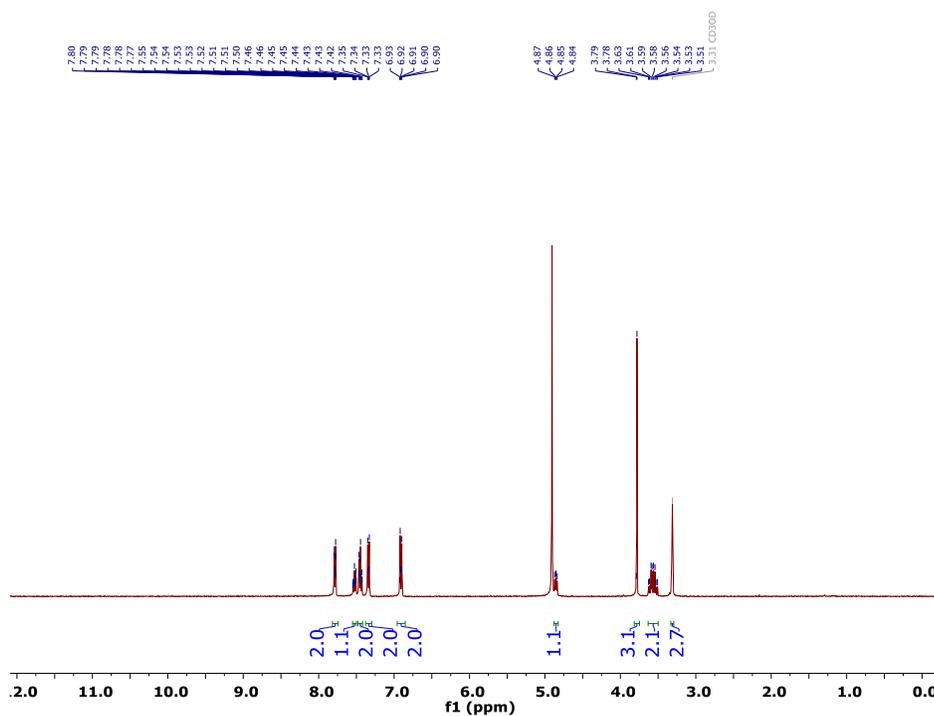


Figura 5-14. Espectro RMN¹H de compuesto **C5** (Metanol-d₄. 400 MHz).

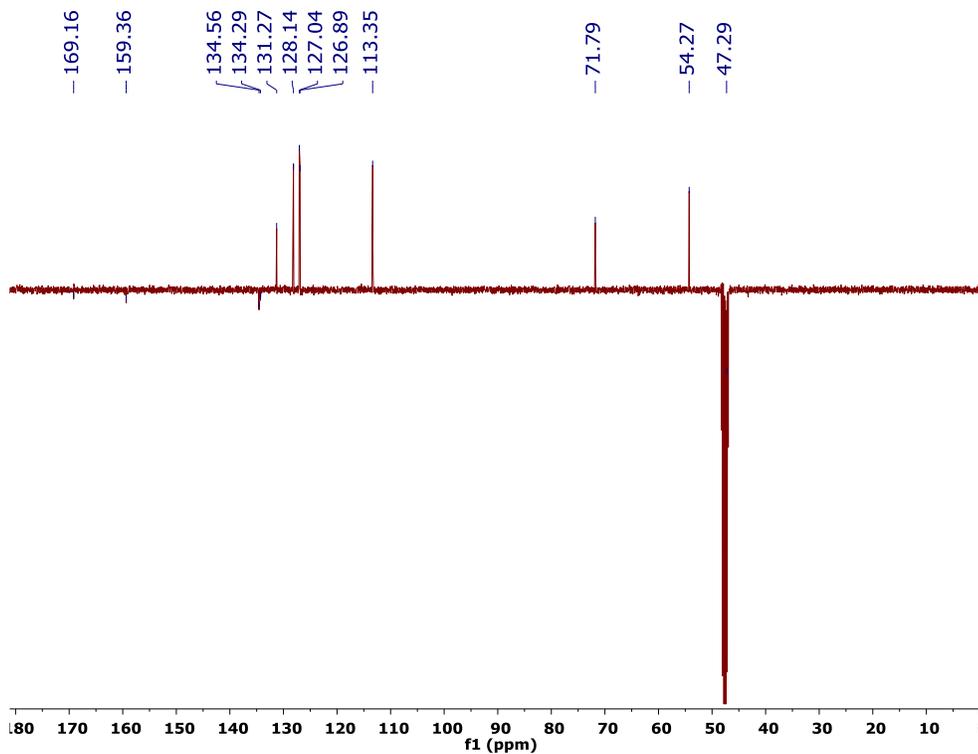


Figura 5-15. Espectro APT de compuesto **C5** (Metanol-d₄. 100 MHz).

5.4 Potencial de los compuestos de *Piper* en la producción de factores de virulencia y formación de biopelícula de *P. aeruginosa*.

Tabla 5-8. Efecto de los compuestos provenientes de especies de *Piper* en la formación de biopelícula y producción de los factores de virulencia de *P. aeruginosa*

| Código | Especie | Compuesto | Ensayo | 250 ppm | 125 ppm | 62.5 ppm | 31.25 ppm | 15.62 ppm |
|--------|--------------------------|----------------------|------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-----------|
| C1 | <i>P. pertomentillum</i> | etiltembamida | Biofilm | 63.3 ± 18.9 | 71.8 ± 10.4 | 72.9 ± 21.3 | 56.4 ± 12.7 | |
| | | | Piocianina | 81.7 ± 30.1 | 90.9 ± 19.7 | 95.8 ± 11.7 | 102.6 ± 7.6 | |
| | | | Proteasas | 81.7 ± 23.7 | 76.7 ± 27.1 | 89.1 ± 21.4 | 100.3 ± 20.1 | |
| | | | Elastasas | 104.5 ± 20.5 | 111.6 ± 19.3 | 76.1 ± 14.7 | 97.6 ± 3.7 | |
| C2 | <i>P. pertomentillum</i> | acetato de tembamida | Biofilm | 93.1 ± 8.3 | 53.4 ± 3.6 | 64.3 ± 10.2 | 66.6 ± 4.3 | |
| | | | Piocianina | 68.4 ± 14.4 | 77.3 ± 12.2 | 94.2 ± 13.1 | 110.8 ± 13.1 | |
| | | | Proteasas | 94.3 ± 8.3 | 98.9 ± 4.8 | 83.2 ± 19.8 | 85.8 ± 20.4 | |
| | | | Elastasas | 91.9 ± 19.6 | 66.8 ± 18.1 | 60.1 ± 9.9 | 62.7 ± 7.4 | |
| C3 | <i>P. pertomentillum</i> | cefaraadiona B | Biofilm | 44.2 ± 7.9 | 45.4 ± 4.9 | 46.7 ± 13.6 | 41.5 ± 8.9 | |
| | | | Piocianina | 34.6 ± 2.5 | 59.3 ± 17.2 | 47.9 ± 13.7 | 102.1 ± 16.1 | |
| | | | Proteasas | 77.1 ± 6.1 | 86.9 ± 7.1 | 79.9 ± 15.6 | 81.1 ± 8.7 | |
| | | | Elastasas | 58.8 ± 9.2 | 80.7 ± 15.3 | 57.1 ± 12.7 | 63.8 ± 11.5 | |
| C4 | <i>P. pertomentillum</i> | Benzamida | Biofilm | 135.9 ± 36.8 | 102.4 ± 17.7 | 35.6 ± 4.9 | 34.2 ± 3.1 | |
| | | | Piocianina | 93.5 ± 9.9 | 76.9 ± 20.8 | 79.2 ± 10.6 | 55.6 ± 14.1 | |

13 Efecto inhibitorio de sustancias provenientes de especies del género *Piper* sobre Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

| | | | | | | | | |
|-----------|--------------------------|------------------------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--|
| | | | Proteasas | 91.2 ± 12.4 | 89.1 ± 7.5 | 89.5 ± 10.6 | 83.9 ± 6.3 | |
| | | | Elastasas | 84.8 ± 19.9 | 74.1 ± 13.3 | 69.1 ± 18.4 | 68.3 ± 20.1 | |
| C5 | <i>P. pertomentillum</i> | tembamida | Biofilm | 41.2 ± 6.9 | 59.1 ± 8.7 | 66.1 ± 13.6 | 81.9 ± 18.1 | |
| | | | Piocianina | 71.7 ± 15.4 | 78.8 ± 22.6 | 108.1 ± 12.9 | 82.1 ± 19.6 | |
| | | | Proteasas | 81.3 ± 15.8 | 95.5 ± 11.3 | 103.9 ± 2.4 | 95.6 ± 8.5 | |
| | | | Elastasas | 68.7 ± 19.1 | 87.1 ± 15.7 | 88.2 ± 5.3 | 82.7 ± 14.1 | |
| C6 | <i>P. bogotense</i> | ácido 4-metoxi-3-farnesilbenzoico | Biofilm | 207.5 ± 10.3 | 155.2 ± 28.8 | 112.5 ± 38.6 | | |
| | | | Piocianina | 78.3 ± 17.2 | 81.7 ± 2.3 | 81.4 ± 15.3 | | |
| | | | Proteasas | 91.1 ± 1.1 | 92.7 ± 4.4 | 93.3 ± 2.1 | | |
| | | | Elastasas | 87.8 ± 22.3 | 99.1 ± 13.3 | 95.4 ± 18.2 | | |
| C7 | <i>P. bogotense</i> | ácido 4-hidroxi-3-farnesilbenzoico | Biofilm | 82.3 ± 29.9 | 178.3 ± 24.2 | 157.1 ± 13.4 | | |
| | | | Piocianina | 54.1 ± 20.1 | 58.8 ± 18.7 | 39.7 ± 7.8 | | |
| | | | Proteasas | 80.6 ± 16.4 | 79.6 ± 19.2 | 87.8 ± 16.3 | | |
| | | | Elastasas | 60.2 ± 16.4 | 88.1 ± 13.5 | 101.6 ± 17.5 | | |
| C8 | <i>P. bogotense</i> | 2-farnesilhidroquinona | Biofilm | 142.8 ± 20.8 | 115.8 ± 4.2 | 73.3 ± 11.1 | | |
| | | | Piocianina | 33.2 ± 20.1 | 69.6 ± 21.3 | 78.9 ± 2.5 | | |
| | | | Proteasas | 73.9 ± 13.9 | 84.3 ± 11.1 | 101.2 ± 4.3 | | |
| | | | Elastasas | 44.3 ± 18.3 | 100.8 ± 20.8 | 93.9 ± 22.4 | | |
| C9 | <i>P. nigrum</i> | Piperina | Biofilm | 63.4 ± 15.5 | 61.5 ± 12.9 | 98.1 ± 29.1 | | |
| | | | Piocianina | 27.1 ± 6.5 | 27.6 ± | 95.8 ± | | |

| | | | | | | | | |
|------------|------------------------|--------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|
| | | | a | | 5.3 | 18.5 | | |
| | | | Proteasas | 58.8 ± 3.1 | 57.2 ± 2.6 | 98.5 ± 11.9 | | |
| | | | Elastasas | 39.2 ± 0.8 | 43.3 ± 9.6 | 113.5 ± 30.9 | | |
| C10 | <i>P. nigrum</i> | Piperlonguminina | Biofilm | 51.4 ± 14.7 | 42.9 ± 7.9 | 71.3 ± 21.9 | | |
| | | | Piocianina | 35.2 ± 9.2 | 85.9 ± 22.2 | 80.9 ± 20.6 | | |
| | | | Proteasas | 64.2 ± 10.8 | 99.8 ± 7.1 | 97.1 ± 9.6 | | |
| | | | Elastasas | 43.8 ± 7.4 | 69.4 ± 6.5 | 65.5 ± 12.9 | | |
| C11 | <i>P. nigrum</i> | iso-piperina | Biofilm | 164.4 ± 15.9 | 141.2 ± 20.1 | 113.1 ± 19.6 | | |
| | | | Piocianina | 114.1 ± 7.3 | 69.5 ± 48.2 | 81.5 ± 41.2 | | |
| | | | Proteasas | 95.3 ± 24.4 | 74.5 ± 19.2 | 87.7 ± 25.1 | | |
| | | | Elastasas | 73.5 ± 22.5 | 55.7 ± 21.1 | 61.7 ± 29.1 | | |
| C12 | <i>piper peltatum</i> | 4-nerolidilcatecol | Biofilm | 542.6 ± 11.3 | 355.3 ± 9.1 | 142.7 ± 17.4 | | |
| | | | Piocianina | 66.2 ± 17.9 | 72.7 ± 33.9 | 61.6 ± 13.5 | | |
| | | | Proteasas | 100.1 ± 12.7 | 97.4 ± 1.3 | 102.4 ± 6.7 | | |
| | | | Elastasas | 83.1 ± 20.7 | 62.5 ± 18.3 | 65.4 ± 8.9 | | |
| C13 | <i>piper eriopodon</i> | Eriopodol | Biofilm | 193.6 ± 22.1 | 177.7 ± 6.5 | 53.2 ± 14.7 | | |
| | | | Piocianina | 93.4 ± 21.8 | 116.6 ± 25.5 | 134.6 ± 28.9 | | |
| | | | Proteasas | 93.3 ± 3.1 | 95.3 ± 3.1 | 99.3 ± 3.1 | | |
| | | | Elastasas | 108.5 ± 21.5 | 124.7 ± 24.3 | 141.3 ± 21.4 | | |
| C14 | <i>piper eriopodon</i> | Gibbilimbo I | Biofilm | 191.4 ± 5.7 | 177.6 ± 14.1 | 70.9 ± 15.7 | 40.5 ± 9.9 | 28.1 ± 2.6 |
| | | | Piocianina | 24.2 ± 4.8 | 22.7 ± | 43.8 ± 2.7 | 35.4 ± 6.8 | 48.5 ± |

| | | | | | | | | |
|------------|--------------------------|--|-------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|------------|
| | | | a | | 4.5 | | | 13.9 |
| | | | Proteasas | 79.1 ± 5.7 | 80.3 ± 14.1 | 93.8 ± 1.9 | 84.1 ± 16.5 | 92.2 ± 5.2 |
| | | | Elastasas | 51.2 ± 7.9 | 60.9 ± 15.9 | 66.1 ± 14.6 | 61.1 ± 16.6 | 70.7 ± 7.1 |
| C15 | <i>P. pesaresanum</i> | Ácido 4-metoxinervogénico | Biofilm | 177.9 ± 10.3 | 78.7 ± 17.3 | 44.1 ± 7.8 | 38.6 ± 10.2 | |
| | | | Piocianina | 80.1 ± 14.9 | 68.2 ± 19.1 | 53.3 ± 15.8 | 70.6 ± 30.6 | |
| | | | Proteasas | 79.3 ± 24.1 | 94.7 ± 5.8 | 79.6 ± 20.1 | 84.1 ± 19.9 | |
| | | | Elastasas | 72.7 ± 21.3 | 71.8 ± 8.5 | 58.1 ± 16.1 | 69.1 ± 18.6 | |
| C16 | <i>P. pesaresanum</i> | ácido 3-(3'.3'-dimetilalil-1'-oxo)-5-(3".3"-dimetilalil)-4-hidroxibenzoico | Biofilm | 50.6 ± 9.6 | 62.9 ± 14.9 | 106.1 ± 17.6 | | |
| | | | Piocianina | 67.2 ± 23.3 | 49.1 ± 24.3 | 49.2 ± 32.9 | | |
| | | | Proteasas | 77.2 ± 23.7 | 57.3 ± 17.1 | 67.2 ± 28.1 | | |
| | | | Elastasas | 81.1 ± 39.7 | 73.1 ± 38.2 | 67.5 ± 42.4 | | |
| C17 | <i>P. ceanothifolium</i> | 1,4-dihidroxi-2-(3'-hidroxi-3'7'-dimetil-1'-oxo-6'-octenil)benzeno | Biofilm | 137.1 ± 13.6 | 47.5 ± 9.6 | 46.2 ± 7.7 | 53.1 ± 16.5 | |
| | | | Piocianina | 95.4 ± 16.1 | 72.3 ± 18.1 | 70.2 ± 18.4 | 64.4 ± 19.1 | |
| | | | Proteasas | 86.4 ± 19.1 | 89.9 ± 6.2 | 84.1 ± 16.3 | 79.4 ± 17.9 | |
| | | | Elastasas | 67.5 ± 13.7 | 81.7 ± 15.7 | 65.2 ± 17.3 | 64.4 ± 14.2 | |
| C18 | <i>P. ceanothifolium</i> | Debromocymopolina | Biofilm | 159.2 ± 9.8 | 52.9 ± 3.50 | 40.6 ± 10.9 | 43.9 ± 4.1 | |
| | | | Piocianina | 60.5 ± 13.5 | 44.3 ± 8.8 | 55.4 ± 5.2 | 32.6 ± 2.1 | |
| | | | Proteasas | 79.3 ± 7.2 | 49.7 ± 10.6 | 82.1 ± 15.1 | 93.1 ± 3.5 | |
| | | | Elastasas | 47.1 ± 6.3 | 25.9 ± 14.4 | 62.5 ± 32.5 | 68.3 ± 14.1 | |
| C19 | <i>P.</i> | 1,4- | Biofilm | 104.7 ± | 44.2 ± | 90.6 ± | | |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------|---|--------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--|
| | <i>P. ceanothifolia</i> | dihidroxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-Z-6'-octadienil) benceno | | 24.5 | 5.3 | 23.4 | | |
| | | | Piocianin a | 44.1 ± 12.4 | 84.5 ± 21.8 | 101.3 ± 15.4 | | |
| | | | Proteasas | 68.7 ± 25.8 | 87.5 ± 4.1 | 88.1 ± 4.4 | | |
| | | | Elastasas | 40.2 ± 2.5 | 103.9 ± 13.3 | 118.7 ± 17.5 | | |
| C20 | <i>P. ceanothifolia</i> | Lhotzcromeno | Biofilm | 151.9 ± 23.2 | 102.3 ± 29.8 | 132.4 ± 34.1 | | |
| | | | Piocianin a | 53.5 ± 25.1 | 84.5 ± 17.6 | 63.1 ± 30.6 | | |
| | | | Proteasas | 75.2 ± 21.3 | 94.1 ± 14.4 | 78.6 ± 17.7 | | |
| | | | Elastasas | 73.1 ± 19.5 | 123.4 ± 13.7 | 82.6 ± 19.14 | | |
| C21 | <i>P. ceanothifolia</i> | 1,4-dihidroxi-2-(1'-hidroxi-1'-metil-1'-etil) benceno | Biofilm | 200.9 ± 13.1 | 146.6 ± 20.8 | 51.8 ± 15.1 | 44.5 ± 10.1 | |
| | | | Piocianin a | 55.4 ± 17.1 | 58.2 ± 20.8 | 53.9 ± 14.8 | 58.8 ± 16.7 | |
| | | | Proteasas | 95.2 ± 10.2 | 91.4 ± 4.6 | 78.3 ± 19.3 | 79.3 ± 13.1 | |
| | | | Elastasas | 63.7 ± 13.7 | 77.3 ± 17.5 | 56.1 ± 16.3 | 47.2 ± 12.5 | |

*Los datos se presentan como porcentaje de producción ± la desviación estándar de cinco réplicas de una repetición independiente. Según la prueba estadística Duncan ($p < 0.05$). los recuadros de color rojo no tienen un efecto significativo en la producción de los factores de virulencia y los verdes son significativamente diferentes.

6. Bibliografía

- Adonizio, A. L., Downum, K., Bennett, B. C., & Mathee, K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, *105*(3), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.025>
- Aguilar, F. R., Aguilar, S. L., Cubas, D. M., Coaguila, L. Á., Fernández, D. A., Mario, M. M., Campos, R., Guevara-Vásquez, G., & Díaz, R. S. (2016). Portadores de bacterias multirresistentes de importancia clínica en áreas críticas (UCI-UCIN) de un hospital al norte del Perú. *Horizonte Médico (Lima)*, *16*(3), 50–57. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2016000300008
- Ahator, S., & Zhang, L. H. (2019). Small Is Mighty—Chemical Communication Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annu Rev Microbiol*, *73*, 559–578. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-020518-120044>
- Ahmed, A. A., & Salih, F. A. (2019). Quercus infectoria gall extracts reduce quorum sensing-controlled virulence factors production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* recovered from burn wounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2594-5>
- Ahmed, S. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* and the multifactorial antibiotic resistance. *Eurasian Medical Research Periodical*, *11*, 85–94. <https://www.geniusjournals.org/index.php/emrp/article/view/2096/1834>
- Aleanizy, F. S., Alqahtani, F. Y., Eltayb, E. K., Alrumikan, N., Almebki, R., Alhossan, A., Almangour, T. A., & AlQahtani, H. (2021). Evaluating the effect of antibiotics sub-inhibitory dose on *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing dependent virulence and its phenotypes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(1), 550–559. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.10.040>
- Aleksic, I., Ristivojevic, P., Pavic, A., Radojević, I., Čomić, L. R., Vasiljevic, B., Opsenica, D., Milojković-Opsenica, D., & Senerovic, L. (2018). Anti-quorum sensing activity, toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and phytochemical characterization of *Trapa natans* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *222*, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.005>

- Alikhani, M. Y., Karimi Tabar, Z., Mihani, F., Kalantar, E., Karami, P., Sadeghi, M., Ahdi Khosroshahi, S., & Farajnia, S. (2014). Antimicrobial Resistance Patterns and Prevalence of blaPER-1 and blaVEB-1 Genes Among ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in West of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1). <https://doi.org/10.5812/JJM.8888>
- Aljeldah, M. M. (2022). Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat. *Antibiotics*, 11(8), 1082. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11081082>
- Alva, P. P., Suresh, S., Nanjappa, D. P., James, J. P., Kaverikana, R., Chakraborty, A., Sarojini, B. K., & Premanath, R. (2021). Isolation and identification of quorum sensing antagonist from *Cinnamomum verum* leaves against *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sciences*, 267. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118878>
- Amrutha, B., Sundar, K., & Shetty, P. H. (2017). Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 152–159. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.01.031>
- Antunes, C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C., & Finlay, B. B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. En *Microbiology* (Vol. 156, Issue 8, pp. 2271–2282). <https://doi.org/10.1099/mic.0.038794-0>
- Araujo Baptista, L. M., Rondón Rivas, M. E., Cruz Tenempaguay, R. E., Guayanlema Chávez, J. D., Vargas Córdova, C. A., Morocho Zaragocin, S. v., & Cornejo Sotomayor, S. X. (2019). Antimicrobial activity of the essential oil of *Piper amalago* L. (Piperaceae) collected in coastal Ecuador. *Pharmacology Online*, 3, 15–27.
- Atiax, E., Ahmad, F., Sirat, H. M., & Arbain, D. (2006). Antibacterial Activity and Cytotoxicity Screening of Sumatran Kaduk (*Piper sarmentosum* Roxb.). *Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 10(5). <http://ijpt.iuims.ac.ir>
- Baguley, B., Biggar, R., Beland, F., Blanco, E., Betz, J., Cunningham, M., Dunnick, J., Lachenmeier, D., Guo, L., Lunn, R., Jameson, C., Marques, M., Karagas, M., McCormick, D., Knight, T., Singh, S., Singh, S., Stewart, B., Tseng, C.-H., & Zavadil, J. (2016). IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some Drugs and Herbal Products*, 108, 1-422.
- Bahari, S., Zeighami, H., Mirshahabi, H., Roudashti, S., & Haghi, F. (2017). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 21–28. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2017.03.006>

- Bahmani, M., Saki, K., Shahsavari, S., Rafieian-Kopaei, M., Sepahvand, R., & Adineh, A. (2015). Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(10), 858–864. <https://doi.org/10.1016/J.APJT.2015.06.004>
- Baker, R. E., Mahmud, A. S., Miller, I. F., Rajeev, M., Rasambainarivo, F., Rice, B. L., Takahashi, S., Tatem, A. J., Wagner, C. E., Wang, L. F., Wesolowski, A., & Metcalf, C. J. E. (2021). Infectious disease in an era of global change. *Nature Reviews Microbiology* 2021 20:4, 20(4), 193–205. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z>
- Banerjee, M., Moulick, S., Bhattacharya, K. K., Parai, D., Chattopadhyay, S., & Mukherjee, S. K. (2017). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, virulence and biofilm formation by extracts of *Andrographis paniculata*. *Microbial Pathogenesis*, 113, 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.10.023>
- Başaran, T. I., Berber, D., Gökalsın, B., Tramice, A., Tommonaro, G., Abbamondi, G. R., Erginer Hasköylü, M., Toksoy Öner, E., Iodice, C., & Sesal, N. C. (2020). Extremophilic *Natrinema versiforme* Against *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00079/FULL>
- Bassetti, S., Tschudin-Sutter, S., Egli, A., & Osthoff, M. (2022). Optimizing antibiotic therapies to reduce the risk of bacterial resistance. *European Journal of Internal Medicine*, 99, 7–12. <https://doi.org/10.1016/J.EJIM.2022.01.029>
- Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell*, 125(2), 237–246. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.04.001>
- Bernal, R. (2022). *Piper*. Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/genero/piper/>
- Bertini, E. V. (2018). *Importancia de los mecanismos de quorum sensing en las interacciones entre microorganismos endofíticos*. Universidad Nacional de Tucumán.
- Bhattarai, S., Sharma, B. K., Subedi, N., Ranabhat, S., & Baral, M. P. (2021). Burden of Serious Bacterial Infections and Multidrug-Resistant Organisms in an Adult Population of Nepal: A Comparative Analysis of Minimally Invasive Tissue Sampling Informed Mortality Surveillance of Community and Hospital Deaths. *Clinical Infectious Diseases*, 73(Suppl 5), S415. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAB773>

- Bodí, M., & Garnacho, J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia. *Medicina Intensiva*, 31(2), 83–87. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912007000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Borges, A., Abreu, A. C., Dias, C., Saavedra, M. J., Borges, F., & Simões, M. (2016). New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms. *Molecules*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21070877>
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>
- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J., & Bakri, Y. (2017). Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 729–743. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.021>
- Bramhachari, P. V. (2019). *Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry* (P. V. Bramhachari, Ed.). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9409-7>
- Brazão, M. A. B., Brazão, F. v, Maia, J. G. S., & Monteiro, M. C. (2014). Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6), 517–526. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85632545002>
- Brown-Joel, Z. O., Collieran, E. S., & Stone, M. S. (2018). Inflammatory sebotropic reaction associated with kava kava ingestion. *JAAD Case Reports*, 4(5), 437–439. <https://doi.org/10.1016/J.JDCR.2017.12.011>
- Bru, J.-L., Rawson, B., Trinh, C., Whiteson, K., Molin Høyland-Krogsho, N., & Siryaporn, A. (2019). PQS Produced by the *Pseudomonas aeruginosa* Stress Response Repels Swarms Away from Bacteriophage and Antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 201(23). <https://doi.org/10.1128/JB>
- Brum-Bousquet, M., Tillequin, F., Koch, M., & Sévenet, T. (1985). Alkaloids from *Sarcomelicope argyrophylla*. *Planta Medica*, 51(06), 536–537. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969594>
- Brunel, A.-S., & Guery, B. (2017). Multidrug resistant (or antimicrobial-resistant) pathogens - alternatives to new antibiotics? *Swiss Medical Weekly*, 147(47–48). <https://doi.org/10.4414/SMW.2017.14553>

- Bruschi, P., Mancini, M., Mattioli, E., Morganti, M., & Signorini, M. A. (2014). Traditional uses of plants in a rural community of Mozambique and possible links with Miombo degradation and harvesting sustainability. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-59/TABLES/7>
- Cabral, V., Luo, X., Junqueira, E., Costa, S. S., Mulhovo, S., Duarte, A., Couto, I., Viveiros, M., & Ferreira, M. J. U. (2015). Enhancing activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus*: *Zanthoxylum capense* constituents and derivatives. *Phytomedicine*, 22(4), 469–476. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2015.02.003>
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med*, 38(2), 149–158. <http://www.foxitsoftware.comForevaluationonly>.
- Cáceres, A., & Kato, M. J. (2014). Importance of a multidisciplinary evaluation of *Piper* genus for development of new natural products in Latin America. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 1(1), 4–4. <https://doi.org/10.15171/IJPN.2014.04>
- Calderón, Á. I., Romero, L. I., Ortega-Barría, E., Solís, P. N., Zacchino, S., Gimenez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., Guerra, C., Espinosa, A., Correa, M., & Gupta, M. P. (2010a). Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. <Http://Dx.Doi.Org/10.3109/13880200903193344>, 48(5), 545–553. <https://doi.org/10.3109/13880200903193344>
- Camou, T., Zunino, P., & Hortal, M. (2017). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev Méd Urug*, 33(4), 277–284. <https://doi.org/10.29193/RMU.34.3.6>
- Carette, J., Nachtergaeel, A., Duez, P., Jaziri, E., & Rasamiravaka, T. (2020). *Natural Compounds Inhibiting Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation by Targeting Quorum Sensing Circuitry*. www.intechopen.com
- Carlson, T. J. (2002). Medical ethnobotanical research as a method to identify bioactive plants to treat infectious diseases. *Advances in Phytomedicine*, 1(C), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S1572-557X\(02\)80012-5](https://doi.org/10.1016/S1572-557X(02)80012-5)
- Carmona-Hernández, Ó., Del, M., Fernández, S., Palmeros-Sánchez, B., Armando, J., García, L., & Aguirre Beltrán, G. (2014). Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve Piperaceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30, 67–73.

- Carreño, P. (2016). *La etnobotánica y su importancia como herramienta para la articulación entre conocimientos ancestrales y científicos*. Universidad Distrital Fransisco José de Caldas.
- Castañeda, M. L., Martínez Químico, J. R., & Stanshenko, E. E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia Et Technica*, *XIII*(33), 165–166. <http://cenivam.uis.edu.co/informacion/historia.html>
- Castillo-Juárez, I., García-Contreras, R., Velázquez-Guadarrama, N., Soto-Hernández, M., & Martínez-Vázquez, M. (2013). Amphypterygium adstringens Anacardic Acid Mixture Inhibits Quorum Sensing-controlled Virulence Factors of Chromobacterium violaceum and Pseudomonas aeruginosa. *Archives of Medical Research*, *44*(7), 488–494. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2013.10.004>
- Cathcart, G. R. A., Quinn, D., Greer, B., Harriott, P., Lynas, J. F., Gilmore, B. F., & Walker, B. (2011). Novel inhibitors of the Pseudomonas aeruginosa virulence factor LasB: A potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(6), 2670–2678. https://doi.org/10.1128/AAC.00776-10/SUPPL_FILE/GC_AAC_SUPPLEMENTARY_INFORMATION.ZIP
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, *26*(1), 97–106. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Chaired By Jim O'Neill. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. *Review on Antimicrobial Resistance*.
- Chakraborty, D., & Shah, B. (2011). Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *3*(3), 192–199.
- Chbib, C. (2020). Mechanism and Types of Quorum Sensing Inhibitors. En *Trends in Quorum Sensing and Quorum Quenching* (1a ed., pp. 199–214). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429274817-15>
- Chen, I. S., Chen, Y. C., & Liao, C. H. (2007). Amides with anti-platelet aggregation activity from Piper taiwanense. *Fitoterapia*, *78*(6), 414–419. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2007.04.009>

- Cheng, M. J., Lee, K. H., Tsai, I. L., & Chen, I. S. (2005). Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *13*(21), 5915–5920. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2005.07.050>
- Chioro, A., Coll-Seck, A. M., Høie, B., Moeloek, N., Motsoaledi, A., Rajatanavin, R., & Touraine, M. (2015). Antimicrobial resistance: A priority for global health action. *Bulletin of the World Health Organization*, *93*(7), 439. <https://doi.org/10.2471/BLT.15.158998>
- Chou, S.-C., Su, C.-R., Ku, Y.-C., & Wu, T.-S. (2009). The Constituents and Their Bioactivities of *Houttuynia cordata*. *Chem. Pharm. Bull*, *57*(11), 1227–1230.
- Choudhury, S., Medina-Lara, A., & Smith, R. (2022). Antimicrobial resistance and the COVID-19 pandemic. *Bulletin of the World Health Organization*, *100*(5), 295. <https://doi.org/10.2471/BLT.21.287752>
- Christine, Dipl.-P., & Maurer, K. (2015). *Biological Evaluation of Novel Quorum Sensing Inhibitors as Anti-infectives Against Pseudomonas aeruginosa*. Universität des Saarlandes.
- CLSI. (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (CLSI standard M07, Ed.; M07-11a eds., Vol. 38). www.clsi.org.
- Corehtash, Z. G., Khorshidi, A., Firoozeh, F., Akbari, H., & Aznaveh, A. M. (2015). Biofilm formation and virulence factors among *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(10). <https://doi.org/10.5812/jjm.22345>
- Costa, G. M., Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Nakamura, T. U., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2016). Antimicrobial effects of *Piper hispidum* extract, fractions and chalcones against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, *26*(3), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.03.002>
- da Costa, J. G., Campos, A. R., Brito, S. A., Pereira, C. K. B., Souza, E. O., & Rodrigues, F. F. G. (2010). Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. *Pharmacognosy Magazine*, *6*(24), 331. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.71792>
- da Silva, H. A., Yamaguchi, L. F., Young, M. C. M., Ramos, C. S., Amorim, A. M. A., Kato, M. J., & Batista, R. (2018). Antifungal piperamides from *piper mollicomum kunth* (Piperaceae). *Ecletica Quimica*, *43*(1), 33–38. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v43.1.33-38>

- da Silva, J. K. R., Pinto, L. C., Burbano, R. M. R., Montenegro, R. C., Guimarães, E. F., Andrade, E. H. A., & Maia, J. G. S. (2014). Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops & Products, Complete*(58), 55–60. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.04.006>
- da Silva Pinto, A. C., Silva, L. F. R., Cavalcanti, B. C., Melo, M. R. S., Chaves, F. C. M., Lotufo, L. V. C., de Moraes, M. O., de Andrade-Neto, V. F., Tadei, W. P., Pessoa, C. O., Vieira, P. P. R., & Pohlit, A. M. (2009). New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry, 44*(6), 2731–2735. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2008.10.025>
- Dane. (2022). *Estadísticas Vitales (EEVV) Bogotá DC 28 de junio de 2022*.
- Datta, S., Jana, D., Maity, T. R., Samanta, A., & Banerjee, R. (2016). Piper betle leaf extract affects the quorum sensing and hence virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *3 Biotech, 6*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0348-8>
- del Barrio-Tofiño, E., Zamorano, L., Cortes-Lara, S., López-Causapé, C., Sánchez-Diener, I., Cabot, G., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Group, G.-S. P. study, Galán, F., Gracia, I., Rodríguez, M. A., Martín, L., Sánchez, J. M., Viñuela, L., García, M. V., Lepe, J. A., Aznar, J., ... Oteo, J. (2019). Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 74*(7), 1825–1835. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKZ147>
- Delgado, W., Avella, E., & de Díaz, A. (1998). Alcaloides bencilisoquinolínicos del tallo *Piper augustum* Rudge. *Revista Colombiana de Química, 27*(1).
- Denisuk, A. J., Garbutt, L. A., Golden, A. R., Adam, H. J., Baxter, M., Nichol, K. A., Lagacé-Wiens, P., Walkty, A. J., Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Mulvey, M. R., & Zhanel, G. G. (2019). Antimicrobial-resistant pathogens in Canadian ICUs: results of the CANWARD 2007 to 2016 study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 74*(3), 645–653. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKY477>
- Deryabin, D., Galadzhieva, A., Kosyan, D., & Duskaev, G. (2019). Plant-Derived Inhibitors of AHL-Mediated Quorum Sensing in Bacteria: Modes of Action. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 5588, 20*(22), 5588. <https://doi.org/10.3390/IJMS20225588>
- Desai, S. J., Prabhu, B. R., & Mulchandani, N. B. (1988). Aristolactams and 4,5-dioxoaporphines from *Piper longum*. *Phytochemistry, 27*(5), 1511–1515.
- do Nascimento, J. C., de Paula, V. F., David, J. M., & David, J. P. (2012). Occurrence, biological activities and ¹³C NMR data of amides from Piper

- (Piperaceae). *Química Nova*, 35(11), 2288–2311. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100037>
- Durant-Archibold, A. A., Santana, A. I., & Gupta, M. P. (2018). Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus Piper in Panama: A review. En *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 217, pp. 63–82). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.008>
- Eggimann, P., & Pittet, D. (2001). Infection control in the ICU. *Chest*, 120(6), 2059–2093. <https://doi.org/10.1378/CHEST.120.6.2059>
- El-Mowafy, S. A., Abd El Galil, K. H., Habib, E. S. E., & Shaaban, M. I. (2017). Quorum sensing inhibitory activity of sub-inhibitory concentrations of β -lactams. *African Health Sciences*, 17(1), 199–207. <https://doi.org/10.4314/ahs.v17i1.25>
- El-Shaer, S., Shaaban, M., Barwa, R., & Hassan, R. (2016). Control of quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* using phenylalanine arginyl β -naphthylamide. *Journal of Medical Microbiology*, 65(10), 1194–1204. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000327>
- Espinoza, D. I., & Esparza, G. F. (2021). Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista Chilena de Infectología*, 38(1), 69–80. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000100069>
- Farfan, J. P., & Paladines, J. A. (2019). *Prevalencia y tasa de letalidad de infecciones por microorganismos multirresistentes en los pacientes sépticos en la unidad de cuidados intensivos del hospital general iess quevedo en el periodo del 2017-2018*. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.
- Farhana Syed Ab Rahman, S. (2016). Piper sarmentosum Roxb. : A Mini Review of Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 2(5). <https://doi.org/10.15406/japlr.2016.02.00031>
- Filloux A, & Ramos J. (2014). *Pseudomonas Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1149* (A. Filloux & J.-L. Ramos, Eds.; Vol. 1149). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0>
- Fonnegra G., R., & Jiménez R., S. L. (1999). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. *Salud y Enfermedad. Lecturas Básicas En Sociología de La Medicina*, 3–22. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UI.JS>
- Fosberg, F. R., Schultes, R. E., & Raffauf, R. F. (1990). The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. En *undefined* (Vol. 40, Issue 1). Wiley. <https://doi.org/10.2307/1222960>

- Friedrich, U., Siems, K., Solis, P. N., Gupta, M. P., & Jenett-Siems, K. (2005). New prenylated benzoic acid derivatives of *Piper hispidum*. *Die Pharmazie*, *60*(6), 455–457. <https://doi.org/10.1002/CHIN.200541203>
- Galvis, M., & Torres, M. (2017). Etnobotánica y usos de las plantas de la comunidad rural de Sogamoso, Boyacá, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, *8*(2).
- García Barriga, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia : botánica médica*. Instituto de Ciencias Naturales,.
- Germen. (2019). *Perfiles de sensibilidad a antibióticos de Pseudomonas aeruginosa en UCI*. http://www.grupogermen.org/pdf/pseudomonas_aeruginosa_12_14.pdf
- Ghosh, R., Darin, K., Nath, P., & Deb, P. (2014). An Overview of Various Piper Species for Their Biological Activities. *International Journal of Pharma Research & Review*, *3*(1), 67–75.
- Gómez-Calvario, V., & Rios, M. Y. (2019). ¹H and ¹³C NMR data, occurrence, biosynthesis, and biological activity of Piper amides. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *57*(12), 994–1070. <https://doi.org/10.1002/MRC.4857>
- González, B., Mora, M., & Clavijo, M. (2001). Estudio etnobotánico de las plantas medicinales empleadas por la comunidad rural de Zaque-municipio de Gachetá, Cundinamarca. *Tecné, Episteme y Didaxis: TED*, *0*(9). <https://doi.org/10.17227/ted.num9-5621>
- González, J. M. (2019). Auge, caída y resurgimiento de las enfermedades infecciosas. *Biomédica*, *39*(2), 5–7. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572019000600005
- Gupta, M. P., Correa A, M. D., Solis, P. N., Jones, A., Galdames, C., & Guionneau-Sinclair, F. (1993). Medicinal plant inventory of Kuna Indians: Part 1. *Journal of Ethnopharmacology*, *40*(2), 77–109. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90054-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90054-9)
- Gupta, P., Balwani, S., Kumar, S., Aggarwal, N., Rossi, M., Paumier, S., Caruso, F., Bovicelli, P., Saso, L., DePass, A. L., Prasad, A. K., Parmar, V. S., & Ghosh, B. (2010). β -sitosterol among other secondary metabolites of *Piper galeatum* shows inhibition of TNF α -induced cell adhesion molecule expression on human endothelial cells. *Biochimie*, *92*(9), 1213–1221. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2010.06.005>
- Haque, S., Ahmad, F., Dar, S. A., Jawed, A., Mandal, R. K., Wahid, M., Lohani, M., Khan, S., Singh, V., & Akhter, N. (2018). Developments in strategies for

- Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. *Microbial Pathogenesis*, 121, 293–302. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.05.046>
- Hashim, N. A., Ahmad, F., Salleh, W. M. N. H. W., & Khamis, S. (2019). A New Amide From *Piper maingayi* Hk.F. (Piperaceae). *Natural Product Communications*, 14(6), 1934578X1985582. <https://doi.org/10.1177/1934578X19855826>
- Hernández, T., García-Bores, A. M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores-Ortiz, C. M., & Lira, R. (2015). Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.003>
- Hertiani, T., Tunjung Pratiwi, S. U., Rihardini, M. I., & Cahyaningrum, P. K. (2018). Investigation on Inhibitory Potential of *Myrmecodia tuberosa* on Quorum Sensing-related Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Staphylococcus aureus* Cowan I Strains. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 21(3), 101–109. <https://doi.org/10.3923/PJBS.2018.101.109>
- Hidalgo, J., & Woc-Colburn, L. (2020). *Highly Infectious Diseases in Critical Care* (J. Hidalgo & L. Woc-Colburn, Eds.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-33803-9>
- Hirakawa, H., & Tomita, H. (2013). Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAY). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2013.00114>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.12.011>
- Holden, M., Swift, S., & Williams, P. (2000). New signal molecules on the quorum-sensing block. *Trends in Microbiology*, 8(3), 101–103. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01718-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01718-2)
- Hortal, M. (2015). Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes: información actualizada. *Rev Méd Urug*, 31(4), 52–58.
- Hossain, M. A., Sattenapally, N., Parikh, H. I., Li, W., Rumbaugh, K. P., & German, N. A. (2020). Design, synthesis, and evaluation of compounds capable of reducing *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111800. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.111800>

- Ignak, S., Nakipoglu, Y., & Gurler, B. (2017). Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13756-017-0244-6/TABLES/5>
- INS. (2022). *Boletín epidemiológico semanal: Semana epidemiológica 24 12 al 18 de junio de 2022*.
- Jakobsen, T. H., Bragason, S. K., Phipps, R. K., Christensen, L. D., van Gennip, M., Alhede, M., Skindersoe, M., Larsen, T. O., Høiby, N., Bjarnsholt, T., & Givskov, M. (2012). Food as a source for quorum sensing inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2410–2421. <https://doi.org/10.1128/AEM.05992-11>
- James Bound, D., Murthy, P. S., Negi, P. S., & Srinivas, P. (2020). Evaluation of anti-quorum sensing and antimutagenic activity of 2,3-unsaturated and 2,3-dideoxyglucosides of terpene phenols and alcohols. *LWT*, 122. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108987>
- Jaramillo, M. A., Callejas, R., Davidson, C., Smith, J. F., Stevens, A. C., & Tepe, E. J. (2008). A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron psbJ-petA. *Systematic Botany*, 33(4), 647–660. <https://doi.org/10.1600/036364408786500244>
- Jeyanthi, V., Velusamy, P., Kumar, G. V., & Kiruba, K. (2021). Effect of naturally isolated hydroquinone in disturbing the cell membrane integrity of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 741 and *Staphylococcus aureus* MTCC 740. *Heliyon*, 7(5). <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E07021>
- Karakonstantis, S., Kritsotakis, E. I., & Gikas, A. (2020). Pandrug-resistant gram-negative bacteria: A systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. En *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 75, Issue 2, pp. 271–282). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz401>
- Karatuna, O., & Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(12), 1770–1775. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2010.03177.X>
- Karbasizade, V., Dehghan, P., Sichani, M. M., Shahanipoor, K., Sepahvand, S., Jafari, R., & Yousefian, R. (2017). Evaluation of three plant extracts against biofilm formation and expression of quorum sensing regulated virulence

- factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2(Suppl.)), 585–589. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28650325/>
- Kostylev, M., Kim, D. Y., Smalley, N. E., Salukhe, I., Peter Greenberg, E., & Dandekar, A. A. (2019). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 7027–7032. https://doi.org/10.1073/PNAS.1819796116/SUPPL_FILE/PNAS.1819796116.SAPP.PDF
- Kothari, V., Sharma, S., & Padia, D. (2017). Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 744–752. <https://doi.org/10.1016/J.APJTM.2017.07.022>
- Kushwaha, M., Jain, S. K., Sharma, N., Abrol, V., Jaglan, S., & Vishwakarma, R. A. (2018). Establishment of LCMS Based Platform for Discovery of Quorum Sensing Inhibitors: Signal Detection in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *ACS Chemical Biology*, 13(3), 657–665. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMBIO.7B00875/SUPPL_FILE/CB7B00875_SI_001.PDF
- Lakshmanan, D., Nanda, J., & Jeevaratnam, K. (2018). Inhibition of Swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by Methanol extracts of *Alpinia officinarum* Hance. and *Cinnamomum tamala* T. Nees and Eberm. *Natural Product Research*, 32(11), 1307–1311. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1340289>
- Leal, A., Arturo, C., Jorge, Á., Cortes María, A., & Ovalle, V. (2017). Análisis de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2016. Componente pediátrico y adulto. *Boletín Informativo GREBO*, 9. www.grebo.org
- Leal, A. L., Arturo, C., Jorge, Á., Cortes, A., & Ovalle, M. V. (2014). Análisis de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2013. Componente pediátrico y adulto. *Boletín Informativo GREBO*. www.grebo.org
- Leal, S. M., Pino, N., Stashenko, E. E., Martínez, J. R., & Escobar, P. (2013). Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 25(6), 512–519. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.820669>
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>

- Li, D. lin, & Xing, F. wu. (2016). Ethnobotanical study on medicinal plants used by local Hoklos people on Hainan Island, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 358–368. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2016.07.050>
- Li, Q., Mao, S., Wang, H., & Ye, X. (2022). The Molecular Architecture of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. *Marine Drugs* 2022, Vol. 20, Page 488, 20(8), 488. <https://doi.org/10.3390/MD20080488>
- Lignier, P., Estager, J., Kardos, N., Gravouil, L., Gazza, J., Naffrechoux, E., & Draye, M. (2011). Swift and efficient sono-hydrolysis of nitriles to carboxylic acids under basic condition: Role of the oxide anion radical in the hydrolysis mechanism. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.04.006>
- Lin, R. J., Wu, M. H., Ma, Y. H., Chung, L. Y., Chen, C. Y., & Yen, C. M. (2014). Anthelmintic activities of aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosa-plena* against *Hymenolepis nana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3624–3639. <https://doi.org/10.3390/IJMS15033624>
- Liu, C. M., Kao, C. L., Wu, H. M., Li, W. J., Huang, C. T., Li, H. T., & Chen, C. Y. (2014). Antioxidant and anticancer aporphine alkaloids from the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosa-plena*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 17829–17838. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES191117829>
- López, A., Ming, D. S., & Towers, G. H. N. (2002). Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. *Journal of Natural Products*, 65(1), 62–64. <https://doi.org/10.1021/np010410g>
- López-Causapé, C., Cabot, G., del Barrio-Tofiño, E., & Oliver, A. (2018). The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 685. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00685/BIBTEX>
- Lozano, R. (2017). *Nuevas estrategias en la lucha contra la resistencia a los antibióticos: Inhibición del quorum sensing*. Universidad Complutense.
- Lu, L., Li, M., Yi, G., Liao, L., Cheng, Q., Zhu, J., Zhang, B., Wang, Y., Chen, Y., & Zeng, M. (2022). Screening strategies for quorum sensing inhibitors in combating bacterial infections. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2021.03.009>
- Luís, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., & Duarte, A. P. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 79, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>

- Luján Roca, D. Á. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), 465–474.
- 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0176883>
- Maciej, S., Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. v, ... Sambanis, N. (2011). Introduction, Phytochemistry, traditional uses and biological activity of genus Piper: A review. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 2(2), 130–144. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Mahavy, C. E., Duez, P., ElJaziri, M., & Rasamiravaka, T. (2020). African Plant-Based Natural Products with Antivirulence Activities to the Rescue of Antibiotics. *Antibiotics*, 9(11), 830. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110830>
- Majik, M. S., Naik, D., Bhat, C., Tilve, S., Tilvi, S., & D'Souza, L. (2013). Synthesis of (R)-norbgugaine and its potential as quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(8), 2353–2356. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2013.02.051>
- Majolo, C., Monteiro, P. C., Nascimento, A. V. P. do, Chaves, F. C. M., Gama, P. E., Bizzo, H. R., & Chagas, E. C. (2019). Essential Oils from Five Brazilian Piper Species as Antimicrobials Against Strains of *Aeromonas hydrophila*. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1645047>, 22(3), 746–761. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1645047>
- Malgaonkar, A., & Nair, M. (2019). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhlR is regulated by a small RNA PhrD. *Scientific Reports*, 9(1), 432. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36488-9>
- Martín-Rodríguez, A. J., Ticona, J. C., Jiménez, I. A., Flores, N., Fernández, J. J., & Bazzocchi, I. L. (2015). Flavonoids from *Piper delineatum* modulate quorum-sensing-regulated phenotypes in *Vibrio harveyi*. *Phytochemistry*, 117, 98–106. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2015.06.006>
- Maxwell, A., & Rampersad, D. (1989). B-phenylethylamine-derived amides from *Piper guayranum*. *Journal of Natural Products*, 52(2), 411–414.

- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology (Reading, England)*, 143 (Pt 12)(12), 3703–3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- Mendoza, J. G., Maguiña, C., & González, F. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio . *Acta Med Peru*, 36(2), 145–151.
- Mohabi, S., Kalantar-Neyestanaki, D., & Mansouri, S. (2017). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by *Quercus infectoria* gall extracts. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(1), 26. [/pmc/articles/PMC5534001/](https://doi.org/10.1007/s13337-017-0001-1)
- Mohajeri, M., Ebrahimi, S. N., Gholamnia, M., & Bayati, M. (2023). Naturally Occurring Quorum Sensing Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa* by Molecular Modeling. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(2). <https://doi.org/10.33263/BRIAC132.147>
- Molina, F. J., Díaz, C. A., Barrera, L., de La Rosa, G., Dennis, R., Dueñas, C., Granados, M., Londoño, D., Ortiz, G., Rodríguez, F., & Jaimes, F. (2011). Perfil microbiológico de la Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos de Colombia (EPISEPSIS Colombia). *Medicina Intensiva*, 35(2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2010.11.003>
- Muñoz, D. R., Sandoval-Hernandez, A. G., Delgado, W. A., Arboleda, G. H., & Cuca, L. E. (2018). In vitro anticancer screening of Colombian plants from *Piper* genus (Piperaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(9), 174–181. <https://doi.org/10.5897/JPP2018.0509>
- Muñoz-Schick, M., Moreira-Muñoz, A., & Moreira Espinoza, S. (2012). Origen del nombre de los géneros de plantas vasculares nativas de Chile y su representatividad en Chile y el mundo. *Gayana. Botánica*, 69(2), 309–359. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432012000200011>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nagori, K., Singh, K., Alexander, A., Kumar, T., Dewangan, D., Badwaik, H., & Tripathi, D. K. (2011). *Piper betle* L.: A review on its ethnobotany,

- phytochemistry, pharmacological profile and profiling by new hyphenated technique DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry). *Journal of Pharmacy Research*, 4(9), 2991–2997. www.jpronline.info
- Namaki, M., Habibzadeh, S., Vaez, H., Arzanlou, M., Safarirad, S., Bazghandi, S. A., Sahebkar, A., & Khademi, F. (2022). Prevalence of resistance genes to biocides in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Molecular Biology Reports*, 49(3), 2149–2155. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-07032-2/TABLES/4>
- Navickiene, H. M. D., Morandim, A. de A., Alécio, A. C., Regasini, L. O., Bergamo, D. C. B., Telascra, M., Cavalheiro, A. J., Lopes, M. N., Bolzani, V. da S., Furlan, M., Marques, M. O. M., Young, M. C. M., & Kato, M. J. (2006). Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Química Nova*, 29(3), 467–470. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000300012>
- Niewiadomska, A. M., Jayabalasingham, B., Seidman, J. C., Willem, L., Grenfell, B., Spiro, D., & Viboud, C. (2019). Population-level mathematical modeling of antimicrobial resistance: a systematic review. *BMC Medicine* 2019 17:1, 17(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12916-019-1314-9>
- Noriega, P., Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Ankuash, E., & Manfredini, S. (2019). Chemical Composition and Biological Activity of Five Essential Oils from the Ecuadorian Amazon Rain Forest. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 1637, 24(8), 1637. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24081637>
- Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., Gea González, M., Becario, " ", & México, P. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 70(2), 138–150. www.medigraphic.org.mx
- Olivero V, J. T., Pájaro C, N. P., & Stashenko, E. (2011). Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus *Piper*. *Vitae*, 18(1), 77–82.
- Olivero-Verbel, J., Güette-Fernandez, J., & Stashenko, E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5), 419–427. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611977008>

- OMS. (2003). *Prevención de las infecciones nosocomiales: guía práctica / revisores: G. Ducl, J. Fabry y L. Nicolle*. Organización Mundial de La Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67877>
- OMS. (2017, febrero 27). *La OMS publica lista de bacterias para las que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS. (2020, diciembre 9). *Las 10 principales causas de muerte*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- OMS. (2021). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report*.
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*.
- Orjala, J., Erdelmeier, C. A. J., Wright, A. D., Rali, T., & Sticher, O. (1993). Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, *34*(3), 813–818. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85364-W](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85364-W)
- Orjala, J., Wright, A., Rali, T., & Sticher, O. (2006). Aduncamide, a Cytotoxic and Antibacterial b-Phenylethylamine-Derived Amide from *Piper aduncum*. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10575639308043814](http://Dx.Doi.Org/10.1080/10575639308043814), *2*(3), 231–236. <https://doi.org/10.1080/10575639308043814>
- Othman, A. F. M., Rukayadi, Y., & Radu, S. (2019). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum sensing by *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Extract. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *13*(3), 1335–1347. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.05>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *47*. <https://doi.org/10.3791/2437>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, *28*(3), 449–461. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1998.00797.X>
- Ouyang, J., Feng, W., Lai, X., Chen, Y., Zhang, X., Rong, L., Sun, F., & Chen, Y. (2020). Quercetin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via the vfr-mediated lasIR system. *Microbial Pathogenesis*, *149*, 104291. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104291>

- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019a). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.013>
- Paniagua, S. M. (2019). *Factores de riesgo asociados a itu por pseudomonas aeruginosa multirresistente en pacientes hospitalizados - Hospital Nacional Dos De Mayo, 2017*. Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum-Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(9), 576. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2016.89>
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O. D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., & Boll, P. M. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2)
- Parra Amin, J. E., Cuca, L. E., & González-Coloma, A. (2019). Antifungal and phytotoxic activity of benzoic acid derivatives from inflorescences of *Piper cumanense*. *Natural Product Research*, 35(16), 2763–2771. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1662010>
- Parra, J. E., Delgado, W. A., & Cuca, L. E. (2011). Cumanenic acid, a new chromene isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 4(3), 280–282. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2011.04.015>
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4360–4365. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.8.4360/ASSET/3B04D4E7-6DEB-4984-B12A-716C44025169/ASSETS/GRAPHIC/PQ0790513005.JPEG>
- Patiño, W. R., Prieto, J. A., Suárez, L. E. C., Ávila, M. C., & Patiño, O. J. (2018). Caracterización química y biológica de los extractos etanólicos de *Piper asperiusculum* y *Piper pertomentellum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(1). <http://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/576/241>
- Patiño-Bayona, W. R., Nagles Galeano, L. J., Bustos Cortes, J. J., Delgado Ávila, W. A., Herrera Daza, E., Cuca Suárez, L. E., Prieto-Rodríguez, J. A., Patiño-Ladino, O. J., Galeano, N., Bustos Cortes, L. J., Delgado Ávila, J. J., Herrera Daza, W. A., Suárez, E., Prieto-Rodríguez, L. E. C., & Patiño-Ladino, J. A. (2021). Effects of Essential Oils from 24 Plant Species on *Sitophilus zeamais*

- Motsch (Coleoptera, Curculionidae). *Insects* 2021, Vol. 12, Page 532, 12(6), 532. <https://doi.org/10.3390/INSECTS12060532>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., Vázquez-López, R., Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
- Peerzada, Z., Kanhed, A. M., & Desai, K. B. (2022). Effects of active compounds from *Cassia fistula* on quorum sensing mediated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, 12(24), 15196–15214. <https://doi.org/10.1039/D1RA08351A>
- Pejin, B., Iodice, C., Tommonaro, G., Stanimirovic, B., Ciric, A., Glamoclija, J., Nikolic, M., Rosa, S., & Sokovic, M. (2014). Further in vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of the Marine Sesquiterpene Hydroquinone Avarol. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(6), 583–588. <https://doi.org/10.2174/138920101506140910152253>
- POWO. (2022). Plants of the World Online. En *Facilitado por Royal Botanic Gardens, Kew*. <https://powo.science.kew.org/cite-us>
- Puzi, S., Sama, O., & Sule, A. (2011). Actividad antimicrobiana selectiva de *Piper sarmentosum* (kaduk) contra *Pseudomonas aeruginosa*. *Temas Actuales En Investigación Nutracéutica*, 9, 31–34. https://www.researchgate.net/publication/289653857_Selective_antimicrobial_activity_of_Piper_sarmentosum_kaduk_against_Pseudomonas_aeruginosa
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1, 7(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Rai, N., Rai, R., & Venkatesh, K. v. (2015). Quorum Sensing Biosensors. En *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight* (pp. 173–183). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8_16
- Rajkumari, J., Borkotoky, S., Murali, A., & Busi, S. (2018). Anti-quorum sensing activity of *Syzygium jambos* (L.) Alston against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and identification of its bioactive components. *South African Journal of Botany*, 118, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.004>

- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & el Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by pseudomonas aeruginosa: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. En *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(2), 117–128. <https://doi.org/10.1038/nrd3013>
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Inhibition of biofilm and quorum sensing-regulated virulence factors in Pseudomonas aeruginosa by Cuphea carthagenensis (Jacq.) J. F. Macbr. Leaf extract: An in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113699. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113699>
- Rather, M. A., Saha, D., Bhuyan, S., Jha, A. N., & Mandal, M. (2022). Quorum Quenching: A Drug Discovery Approach Against Pseudomonas aeruginosa. *Microbiological Research*, 264, 127173. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127173>
- Ratridewi, I., Dzulkarnain, S. A., Wijaya, A. B., Huwae, J. T. R., Putra, D. S. M., Barlianto, W., Santoso, S., & Santosaningsih, D. (2021). Effects of Piper betle Leaf Extract on Biofilm and Rhamnolipid Formation of Pseudomonas aeruginosa. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(10), 5182–5186. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00901>
- Razakova, D. M., Bessonova, I. A., & Yunusov, S. Y. (1984). Components of Haplophyllum obtusifolium. *Chemistry of Natural Compounds* 1985 20:5, 20(5), 599–600. <https://doi.org/10.1007/BF00580074>
- Rekha, P. D., Vasavi, H. S., Vipin, C., Saptami, K., & Arun, A. B. (2017). A medicinal herb Cassia alata attenuates quorum sensing in Chromobacterium violaceum and Pseudomonas aeruginosa. *Letters in Applied Microbiology*, 64(3), 231–238. <https://doi.org/10.1111/LAM.12710>
- Restrepo, M. I., Babu, B. L., Reyes, L. F., Chalmers, J. D., Soni, N. J., Sibila, O., Faverio, P., Cilloniz, C., Rodriguez-Cintron, W., Aliberti, S., Aruj, P. K., Attorri, S., Barimboim, E., Caeiro, J. P., Garzón, M. I., Cambursano, V. H., Ceccato, A., Chertcoff, J., Lascar, F., ... Labra, L. (2018). Burden and risk factors for Pseudomonas aeruginosa community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. *European Respiratory Journal*, 52(2). <https://doi.org/10.1183/13993003.01190-2017>
- Rivera, M. L. C., Hassimotto, N. M. A., Bueris, V., Sircili, M. P., de Almeida, F. A., & Pinto, U. M. (2019). Effect of Capsicum Frutescens Extract, Capsaicin, and

- Luteolin on Quorum Sensing Regulated Phenotypes. *Journal of Food Science*, 84(6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14648>
- Rocha, A. J., de Oliveira Barsottini, M. R., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., de Moraes, F. L. L., & da Rocha, S. L. (2019). *Pseudomonas Aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, 1–15. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180503>
- Roersch, C. M. F. B. (2010). *Piper umbellatum* L.: a comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(3), 522–537. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.07.045>
- Saeki, E. K., Kobayashi, R. K. T., & Nakazato, G. (2020). Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104068. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104068>
- Salehi, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K., Khan, T., Sharifi-Rad, J., Ozleyen, A., Turkdonmez, E., Valussi, M., Tumer, T. B., Fidalgo, L. M., Martorell, M., & Setzer, W. N. (2019). *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. En *Molecules* (Vol. 24, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>
- Salinas, C., Hernández, A., Oropeza, R., Olvera, C., Poblano, M., & Franco, J. (2010). Colistin en el tratamiento de infección por *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente. *Revista de La Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva*, XXIV(4), 173–177.
- Salmanov, A., Litus, V., Vdovychenko, S., Litus, O., Davtian, L., Ubogov, S., Bisyuk, Y., Drozdova, A., & Vlasenko, I. (2019). Healthcare-associated infections in intensive care units. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 72(5 cz 2), 963–969. <https://doi.org/10.36740/wlek201905201>
- Samame, L. M., & Samalvides, F. (2014). Eficacia del proceso de limpieza y desinfección de los endoscopios en un hospital de nivel III. *Revista Medica Herediana*, 25(4), 208–214. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2014000400005
- Santhakumari, S., & Ravi, A. v. (2019). Targeting quorum sensing mechanism: An alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections. *South African Journal of Botany*, 120, 81–86. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2018.09.028>

- Sen, S., Dayanandan, S., Davis, T., Ganesan, R., Jagadish, M. R., Mathew, P. J., & Ravikanth, G. (2019). Origin and evolution of the genus *Piper* in Peninsular India. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *138*, 102–113. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2019.05.033>
- Serra-Valdés, M. Á. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, *402–419*. <https://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>
- Sethupathy, S., Ananthi, S., Selvaraj, A., Shanmuganathan, B., Vigneshwari, L., Balamurugan, K., Mahalingam, S., & Pandian, S. K. (2017). Vanillic acid from *Actinidia deliciosa* impedes virulence in *Serratia marcescens* by affecting S-layer, flagellin and fatty acid biosynthesis proteins. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7(1)*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16507-x>
- Sethupathy, S., Prasath, K. G., Ananthi, S., Mahalingam, S., Balan, S. Y., & Pandian, S. K. (2016). Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production. *Journal of Proteomics*, *145*, 112–126. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2016.04.019>
- Siddiqui, B. S., Gulzar, T., Begum, S., Afshan, F., & Sattar, F. A. (2005). Insecticidal amides from fruits of *Piper nigrum* Linn. *Natural Product Research*, *19(2)*, 143–150. <https://doi.org/10.1080/14786410410001704750>
- Siges, T. H., Hartemink, A. E., Hebinck, P., & Allen, B. J. (2005). The Invasive Shrub *Piper aduncum* and Rural Livelihoods in the Finschhafen Area of Papua New Guinea. *Human Ecology 2005 33:6*, *33(6)*, 875–893. <https://doi.org/10.1007/S10745-005-8214-7>
- Silalahi, M., Supriatna, J., Walujo, E. B., & Nisyawati. (2015). Local knowledge of medicinal plants in sub-ethnic Batak Simalungun of North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*, *16(1)*, 44–54. <https://doi.org/10.13057/BIODIV/D160106>
- Silva, A., Silva, V., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Chapter 17: Carbapenems and *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and epidemiology. En *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment: Volume 1 in the Advances in Environmental Pollution Research Series* (Vol. 1, pp. 253–268). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00017-6>
- Singh, N., Patil, A., Prabhune, A., & Goel, G. (2016). Inhibition of quorum-sensing-mediated biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* strains. *Microbiology*

- (United Kingdom), 162(9), 1708–1714.
<https://doi.org/10.1099/MIC.0.000342/CITE/REFWORKS>
- Skariyachan, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T., & Challapilli, S. B. (2018). Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica* 2018 63:4, 63(4), 413–432.
<https://doi.org/10.1007/S12223-018-0585-4>
- Smith, K. F., Goldberg, M., Rosenthal, S., Carlson, L., Chen, J., Chen, C., & Ramachandran, S. (2014). Global rise in human infectious disease outbreaks. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(101).
<https://doi.org/10.1098/RSIF.2014.0950>
- Smith, K., & Hunter, I. S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 8), 966–973. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.47668-0>
- Solomon, S. L., & Oliver, K. B. (2014). Antibiotic Resistance Threats in the United States: Stepping Back from the Brink. *Number*, 89. www.aafp.org/afp.
- Sommer, R., Rox, K., Wagner, S., Hauck, D., Henrikus, S. S., Newsad, S., Arnold, T., Ryckmans, T., Brönstrup, M., Imberty, A., Varrot, A., Hartmann, R. W., & Titz, A. (2019). Anti-biofilm Agents against *Pseudomonas aeruginosa*: A Structure-Activity Relationship Study of C-Glycosidic LecB Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(20), 9201–9216.
https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.9B01120/SUPPL_FILE/JM9B01120_SI_002.CSV
- Song, D., Bi, F., Zhang, N., Qin, Y., Liu, X., Teng, Y., & Ma, S. (2020). Design, synthesis of novel 4,5-dihydroisoxazole-containing benzamide derivatives as highly potent FtsZ inhibitors capable of killing a variety of MDR *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(21), 115729.
<https://doi.org/10.1016/J.BMC.2020.115729>
- Sotelo, H. (2016). *Estado del arte en el uso potencial de extractos vegetales del género piper para el control de plagas agrícolas* [Universidad Nacional Abierta y a Distancia].
<https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/13255/16609297.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Steindler, L., & Venturi, V. (2007). Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00501.X>

- Straif-Bourgeois, S., Ratard, R., & Kretzschmar, M. (2014). Infectious Disease Epidemiology. *Handbook of Epidemiology*, 2041. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09834-0_34
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470011149>
- Suroowan, S., & Mahomoodally, M. F. (2016). A comparative ethnopharmacological analysis of traditional medicine used against respiratory tract diseases in Mauritius. *Journal of Ethnopharmacology*, 177, 61–80. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2015.11.029>
- Suwanphakdee, C., Simpson, D. A., Hodkinson, T. R., Chantaranonthai, P., & Suwanphakdee, C. (2016). *Taxonomic notes on the genus Piper (Piperaceae)*. <https://doi.org/10.5061/dryad.qp50f>
- Sweileh, W. M. (2022). Global research activity on mathematical modeling of transmission and control of 23 selected infectious disease outbreak. *Globalization and Health*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12992-022-00803-X/TABLES/6>
- Tabak, Y. P., Merchant, S., Ye, G., Vankeepuram, L., Gupta, V., Kurtz, S. G., & Puzniak, L. A. (2019). Incremental clinical and economic burden of suspected respiratory infections due to multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *The Journal of Hospital Infection*, 103(2), 134–141. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2019.06.005>
- Tan, L. Y., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2013). Piper nigrum, Piper betle and Gnetum gnemon- Natural food sources with anti-quorum sensing properties. *Sensors (Switzerland)*, 13(3), 3975–3985. <https://doi.org/10.3390/s130303975>
- Tangarife-Castaño, V., Correa-Royero, J. B., Roa-Linares, V. C., Pino-Benitez, N., Betancur-Galvis, L. A., Durán, D. C., Stashenko, E. E., & Mesa-Arango, A. C. (2014). Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. *Journal of Essential Oil Research*, 26(3), 221–227. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.882279>
- Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2017). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 75, 255–261. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.12.014>
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-

- Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81.
<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.10.032>
- The plant list. (2021). *The Plant List*. . <http://www.theplantlist.org/>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671.
<https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tillotson, G. S., & Zinner, S. H. (2017). Burden of antimicrobial resistance in an era of decreasing susceptibility. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/14787210.2017.1337508*, 15(7), 663–676.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1337508>
- Torres-Hormaza, T., Baquero, A., Jaramillo, A., & Fajardo-Gutiérrez, F. (2020). Flora de Bogotá: Piperaceae. *Revista Del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis*, 21(1). www.perezarbelaezia.jbb.gov.co
- Trivedi, M. N., Khemani, A., Vachhani, U. D., Shah, C. P., & Santani, D. D. (2011). Pharmacognostic, phytochemical analysis and antimicrobial activity of two piper species. *Pharmacie Globale*, 7(5).
<https://www.researchgate.net/publication/228486454>
- Trujillo, W., & Vargas, V. (2022). *Las especies de Piper: en la vertiente amazónica de los Andes, Caquetá. Guía de campo*. (Universidad de la Amazonía, Ed.; 1a ed., Vol. 1).
- Turkina, M. v., & Vikström, E. (2019). Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Journal of Innate Immunity*, 11(3), 263–279. <https://doi.org/10.1159/000494069>
- Ugurlu, A., Karahasan Yagci, A., Ulusoy, S., Aksu, B., & Bosgelmez-Tinaz, G. (2016). Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(6), 698–701.
<https://doi.org/10.1016/J.APJT.2016.06.008>
- Usman, A. B., Abubakar, S., Alaku, C., & Nnadi, O. (2014). Plant: A Necessity of Life. *International Letters of Natural Sciences*, 20, 151–159.
<https://doi.org/10.18052/WWW.SCIPRESS.COM/ILNS.20.151>
- Vadakkan, K. (2020). Molecular Mechanism of Bacterial Quorum Sensing and Its Inhibition by Target Specific Approaches. *ACS Symposium Series*, 1374, 21–234. <https://doi.org/10.1021/BK-2020-1374.CH012>
- Vallejo, A., Feitosa, A., Goullart, A., Pires, L., & Mosquera, O. (2014). Tamizaje de acción antimicrobiana de 34 extractos vegetales contra bacilos

- gramnegativos. *Salud Soc. Uptc*, 1, 34–39. https://revistas.uptc.edu.co/index.php/salud_sociedad/article/view/3257/3121
- van Duijn, P. J., Verbrugghe, W., Jorens, P. G., Spöhr, F., Schedler, D., Deja, M., Rothbart, A., Annane, D., Lawrence, C., Jereb, M., Seme, K., Šifrer, F., Tomič, V., Estevez, F., Carneiro, J., Harbarth, S., & Bonten, M. J. M. (2022). The effects of antibiotic cycling and mixing on acquisition of antibiotic resistant bacteria in the ICU: A post-hoc individual patient analysis of a prospective cluster-randomized crossover study. *PLoS ONE*, 17(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265720>
- Vandeputte, O. M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., Jaziri, M. el, & 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01059-09>
- Vasavi, H. S., Arun, A. B., & Rekha, P. D. (2016). Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.03.012>
- Vásquez-Giraldo, D. F., Libreros-Zúñiga, G. A., Crespo-Ortiz, M. del P., Vásquez-Giraldo, D. F., Libreros-Zúñiga, G. A., & Crespo-Ortiz, M. del P. (2017). Effects of biocide exposure on *P. Aeruginosa*, *E. coli* and *A. Baumannii* complex isolates from hospital and household environments. *Infectio*, 21(4), 243–250. <https://doi.org/10.22354/IN.V21I4.687>
- Vázquez-Martínez, J., Buitemea-Cantúa, G. v., Gutierrez-Villagomez, J. M., García-González, J. P., Ramírez-Chávez, E., & Molina-Torres, J. (2020). Bioautography and GC-MS based identification of piperine and trichostachine as the active quorum quenching compounds in black pepper. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03137>
- Victoria-Munoz, F., Sanchez-Cruz, N., Medina-Franco, J. L., & Lopez-Vallejo, F. (2022). Cheminformatics analysis of molecular datasets of transcription factors associated with quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, 12(11), 6783–6790. <https://doi.org/10.1039/D1RA08352J>
- Vijendra Kumar, N., Murthy, P. S., Manjunatha, J. R., & Bettadaiah, B. K. (2014). Synthesis and quorum sensing inhibitory activity of key phenolic compounds of ginger and their derivatives. *Food Chemistry*, 159, 451–457. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.03.039>

- Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., & Reinhart, K. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, *302*(21), 2323–2329. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2009.1754>
- Wang, H., Abbas, K., Abbasifard, M., Abbasi, M., Abbastabar, H., Abd, F., Abdelalim, A., Abolhassani, H., Abreu, L., & Abrigo, M. (2020). Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)*, *396*(10258), 1160. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30977-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30977-6)
- Weldon, I., Rogers Van Katwyk, S., Burci, G. L., Giur, D., de Campos, T. C., Eccleston-Turner, M., Fryer, H. R., Giubilini, A., Hale, T., Harrison, M., Johnson, S., Kirchhelle, C., Lee, K., Liddell, K., Mendelson, M., Ooms, G., Orbinski, J., Piddock, L. J. v, Røttingen, J.-A., ... Hoffman, S. J. (2022). Governing Global Antimicrobial Resistance: 6 Key Lessons From the Paris Climate Agreement. *American Journal of Public Health*, *112*(4), 553–557. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2021.306695>
- Wolff, T., Santos, P. F. P., Valente, L. M. M., Magalhães, A., Tinoco, L. W., Pereira, R. C. A., & Guimarães, E. F. (2015). Piperamides from *Piper ottonoides* by NMR and GC-MS Based Mixture Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *26*(11), 2321–2330. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150226>
- Zahin, M., Hasan, S., Aqil, F., Sajjad Ahmad Khan, M., Mabood Husain, F., & Ahmad, I. (2010). Screening of certain medicinal plants from India for their anti-quorum sensing activity. En *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 48).
- Zaki, A. A. (2013). Assessment of Anti-Quorum Sensing Activity for Some Ornamental and Medicinal Plants Native to Egypt. *Scientia Pharmaceutica*, *81*(1), 251–258. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1204-26>
- Zhao, X., Yu, Z., & Ding, T. (2020). Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms* *2020*, Vol. 8, Page 425, *8*(3), 425. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030425>
- Zhong, L., Ravichandran, V., Zhang, N., Wang, H., Bian, X., Zhang, Y., & Li, A. (2020). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Natural Products: Virtual Screening, Evaluation and Biomolecular Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* *2020*, Vol. 21, Page 2190, *21*(6), 2190. <https://doi.org/10.3390/IJMS21062190>

Zúñiga Carrasco, I. R., & Caro Lozano, J. (2017). Cultivos ambientales y de superficie: una estrategia de detección oportuna de infecciones nosocomiales. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30(4), 147–150. www.medigraphic.org.mxFinanciamiento:Ninguno.Conflicto de intereses:Ninguno.Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/rlip>