

## Inducción de metabolitos bioactivos en *Piper psilorhachis* C.DC. (Piperaceae) y actividad antibacteriana por quitosano

## Induction of bioactive metabolites in *Piper psilorhachis* C.DC. (Piperaceae) and antibacterial activity by chitosan

José Armando Lozada-García<sup>1</sup> , Reyna Hernández-Suárez<sup>1</sup> , Carolina Barrientos-Salcedo<sup>2</sup> ,  
Yadeneyro de la Cruz-Elizondo<sup>1</sup> , Juan Vázquez-Martínez<sup>3</sup> , Oscar Carmona-Hernández<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Facultad de Biología Xalapa, Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, CP. 91090. Xalapa, Veracruz, México.

<sup>2</sup>Facultad de Bioanálisis Veracruz, Universidad Veracruzana, Iturbide s/n, Centro, CP. 91700. Veracruz, Veracruz, México.

<sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, TecNM, Carretera Silao-Irapuato Km 12.5, El Copal, CP. 36821. Irapuato, Guanajuato, México.

\*Autor de correspondencia: ocarmona@uv.mx

### Artículo científico

Recibido: 12 de marzo 2025

Aceptado: 31 de julio 2025

**RESUMEN.** La resistencia bacteriana a los antibióticos ha propiciado la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividad biológica provenientes de plantas. Un ejemplo de estos compuestos bioactivos son las piperamidas, terpenos, alcaloides y otros, presentes en especies del género *Piper* L. Además, se ha observado que ciertos elicitores pueden modificar la producción de estos compuestos bioactivos. Para ello se evaluó el efecto inducido por quitosano en la inducción de metabolitos secundarios y la actividad antibacteriana de extractos de *Piper psilorhachis* C. DC. Se seleccionaron tres poblaciones silvestres de *P. psilorhachis*, de las cuales se asperjaron con una solución de 1 mg/mL de quitosano en 10 individuos por población. Posteriormente se colectaron las hojas y se realizaron extractos etanólicos, a los cuales se les cuantificó el contenido total de flavonoides, fenoles, alcaloides, terpenos y ácido salicílico por espectrofotometría. Asimismo, se determinó un perfil fitoquímico por GC MS. La actividad antibacteriana fue evaluada en *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) y *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 15635) por el método de dilución en placa y se estimó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM). El quitosano estimuló la producción de flavonoides, fenoles y terpenos en las tres poblaciones respecto al testigo; mientras que los alcaloides y ácido salicílico solo incrementaron significativamente en una población. Se identificaron tentativamente precursores de terpenos y amidas por GC MS. La actividad antibacteriana fue significativamente superior en los extractos tratados con quitosano, siendo *E. coli* la cepa más sensible.

**Palabras clave:** Bacterias patógenas, Elicitor, Extractos, CIM.

**ABSTRACT.** Bacterial resistance to antibiotics has driven the search for new chemical compounds with biological activity derived from plants. An example of these bioactive compounds are piperamides, terpenes, alkaloids, and others found in species of the *Piper* L genus. Additionally, it has been observed that certain elicitors can modify the production of these bioactive compounds. Therefore, the effect of chitosan on the induction of secondary metabolites and antibacterial activity of extracts from *Piper psilorhachis* C. DC. was evaluated. Three wild populations of *P. psilorhachis* were selected, and ten individuals per population were sprayed with a 1 mg/mL chitosan solution. Subsequently, leaves were collected, and ethanolic extracts were made, with the total content of flavonoids, phenols, alkaloids, terpenes, and salicylic acid quantified using spectrophotometry. Additionally, a phytochemical profile was determined by GC-MS. Antibacterial activity was evaluated against *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), and *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 15635) using the plate dilution method, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was estimated. Chitosan stimulated the production of flavonoids, phenols, and terpenes in all three populations compared to the control, while alkaloids and salicylic acid only significantly increased in one population. Terpene and amide precursors were tentatively identified by GC-MS. Antibacterial activity was significantly higher in the chitosan-treated extracts, with *Escherichia coli* being the most sensitive strain.

**Keywords:** Elicitor, extracts, MIC, pathogenic bacteria.

**Como citar:** Lozada-García JA, Hernández-Suárez R, Barrientos-Salcedo C, de la Cruz-Elizondo Y, Vázquez-Martínez J, Carmona-Hernández O (2025) Inducción de metabolitos bioactivos en *Piper psilorhachis* C.DC. (Piperaceae) y actividad antibacteriana por quitosano. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 12(2): e4542. DOI: 10.19136/era.a12n2.4542.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas de salud pública en el mundo es la resistencia bacteriana ante los antibióticos, relacionados principalmente con el uso incorrecto y excesivo de antibióticos, lo que ha fortalecido el incremento de patologías de alta duración causado por bacterias (Brüssow 2024). Una alternativa consiste en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, principalmente aquellos que son sintetizados por las plantas, como son alcaloides, fenoles, terpenos entre otros, comúnmente conocidos como metabolitos bioactivos (Alsheikh *et al.* 2020, Keita *et al.* 2022).

Ante este panorama, las especies del género *Piper* L (Piperaceae) resultan ser candidatas en la búsqueda de principios activos antibacterianos gracias a su alto contenido de compuestos fenólicos, terpénicos y alcaloides (Mgbeahuruike *et al.* 2017). Con menos del 10% de las 2 000 especies descritas, se han reportados más 700 compuestos, convirtiéndose en una fuente importante para explorar posibles moléculas bioactivas (Salehi *et al.* 2019, Carmona-Hernández *et al.* 2023), que pueden aumentar su concentración por efecto de elicitors tanto bióticos como abióticos, los cuales pueden causar estrés en las plantas induciendo una respuesta de defensa y la producción de metabolitos bioactivos (Caicedo-López *et al.* 2021, Zeier 2021).

El quitosano se considera un elicitor biótico dada su naturaleza de biopolímero, debido a que es un derivado de la quitina que se caracteriza por su alta biodegradabilidad, bajo costo de aplicación, nula toxicidad y alta eficiencia en la producción de moléculas asociadas al sistema de protección y defensa de las plantas (Lárez *et al.* 2019, Gallegos-Morales *et al.* 2022). Fisiológicamente las especies de *Piper* cuentan con un mecanismo de resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés), el cual se activa con el reconocimiento de la quitina o sus polímeros a través de receptores específicos tipo quinasas durante el ataque de hongos fitopatógenos, junto con los segundos mensajeros como lo son las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), ROS (especies reactivas de oxígeno) y ácido salicílico (SA) (López-Moya *et al.* 2019, Kattupalli *et al.* 2021, Trindade *et al.* 2021, Fan *et al.* 2022). La sobreexpresión de SA, es la responsable de regular la síntesis de metabolitos secundarios y principalmente fenoles y flavonoides (López-Moya *et al.* 2019, Zeier 2021), considerados responsables contra la actividad hongos y bacterias, por su capacidad de disrumpir la membrana y pared celular, así como detener las síntesis de ácido desoxirribonucleico y de proteínas (Gorniak *et al.* 2018, Aboody y Mickymaray 2020, Shamsudin *et al.* 2022, Sharma *et al.* 2023).

Se ha reportado que la aplicación directa de quitosano en plantas de *Piper auritum* Kunth propicia el aumento en el contenido de fenoles y flavonoides (Fernández 2021), así como de terpenos, pero disminuye los alcaloides, además de incrementar significativamente la actividad biológica. Por tal motivo se evaluó el efecto del quitosano en la producción de metabolitos secundarios de extractos foliares de *Piper psilorhachis* C.DC. (Piperaceae) y su efecto sobre la actividad antibacteriana en cepas de bacterias patógenas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de poblaciones y aplicación del quitosano

Se seleccionaron tres poblaciones silvestres de *P. psilorhachis* de las cuales se tomaron 24 individuos por población en la localidad de Tuzamapan, Veracruz (Tabla 1). Se eligieron 10 individuos al azar por población y cada uno de ellos separados por al menos tres metros de distancia, a estos se les denominó Grupo Q, a los cuales se les aplicó un tratamiento a base de quitosano (polímero de bajo peso molecular, marca VEPINSA: con concentración del 27% de quitosano, 80% de desacetilación, 10% de humedad, 1.8% de ceniza y 1% de viscosidad) disuelto en agua estéril a un pH de 5.5 y Tween 80 al 0.01% a una concentración de 1 mg/mL (Fernández *et al.* 2021).

**Tabla 1.** Ubicación y condiciones abióticas de las poblaciones de *Piper psilorhachis*.

| Población | Coordenada             | Tipo de vegetación     | Temperatura media anual (° C) | Clima                         | Tipo de suelo | Altura (msnm) | Evapotranspiración (mm) | Humedad del suelo en meses |
|-----------|------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------|---------------|-------------------------|----------------------------|
| 1         | 19.40561<br>-96.85747  | Selva baja caducifolia | 22                            | Semicálido húmedo a subhúmedo | Luvisol       | 843           | 900                     | 9                          |
| 2         | 19.405501<br>-96.85610 | Selva baja caducifolia | 22                            | Semicálido húmedo a subhúmedo | Luvisol       | 821           | 900                     | 9                          |
| 3         | 19.40511<br>-96.85716  | Selva baja caducifolia | 22                            | Semicálido húmedo a subhúmedo | Luvisol       | 844           | 900                     | 9                          |

Datos obtenidos del mapa interactivo del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2022)

Para el Grupo T (Testigo) fueron seleccionadas 10 individuos al azar por población y cada uno de ellos separados por al menos tres metros de distancia, los cuales fueron asperjados con solución Tween 80 al 0.01% en agua estéril con pH de 5.5. Ambos tratamientos se aplicaron una vez por semana durante un mes.

### Colecta y extracción

Al término del ensayo se colectaron aproximadamente 5 kg de hojas de los individuos tratados y no tratados, en total se obtuvieron 6 muestras de *P. psilorhachis* correspondientes a cada población. Estas fueron secadas a  $45 \pm 5$  °C y posteriormente se trituraron hasta lograr un polvo ligeramente fino. Los extractos etanólicos se obtuvieron por reflujo continuo en soxhlet durante 10 h, la proporción utilizada de material vegetal y de solvente fue 1:10 y se concentraron a presión reducida (Carmona-Hernández *et al.* 2014, Fernández *et al.* 2021).

### Cuantificación de fenoles, flavonoides, terpenos y alcaloides totales

Los fenoles totales se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu, usando de referencia una curva patrón de ácido tánico a 760 nm. Los resultados se expresaron en microgramos equivalente de ácido tánico por mg de extracto ( $\mu\text{g EAT/mg}$ ) (Blainski *et al.* 2013, Fernández *et al.* 2021). Los flavonoides totales se estimaron por el método de reducción de aluminio, teniendo como referencia una curva patrón de quercetina a una longitud de onda de 420 nm. Los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de quercetina por mg de extracto ( $\mu\text{g EQ/mg}$ ) (Blainski *et al.* 2013,

Fernández *et al.* 2021). Los alcaloides totales se cuantificaron por el método verde de bromocresol a una absorción de 470 nm y los resultados se expresaron en microgramos equivalente de cafeína ( $\mu\text{g EC/mg}$ ) por mg de extracto, para este caso se utilizó una curva patrón de cafeína (Tiwari *et al.* 2016, Fernández *et al.* 2021). Los terpenos totales se obtuvieron siguiendo la metodología de Ghorai *et al.* (2012) por el método de reducción de isoprenos y los resultados se expresaron como mg equivalente de mentol por 10 mg de extracto ( $\text{mg EM}/10 \text{ mg}$ ); estas concentraciones se estimaron con base a una curva patrón de mentol a una absorbancia de 538 nm.

### Cuantificación de ácido salicílico

El contenido de ácido salicílico (SA) en las poblaciones se determinó por el método de reducción férrica (Rahman *et al.* 2016). A una solución de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de extracto etanólico se le añadió 50  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro férrico al 1% y 950  $\mu\text{L}$  de agua, el complejo formado se midió a 450 nm. Se utilizó como referencia una curva patrón de ácido salicílico, los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de ácido salicílico por mg de extracto ( $\mu\text{g EAS mg}^{-1}$ ). Para todos los casos se realizaron cinco repeticiones.

### Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrómetro de Masas con Impacto Electrónico (GC-MS)

El análisis de GC-MS se realizó usando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 580, asociado a detector de masas Perkin Elmer 560s. La separación de los compuestos se realizó en una columna Aligent J&W-1MSUI (60 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ ), el gas acarreador fue helio a flujo constante de 1 mL/min. La temperatura de inyección fue de 270 °C. La programación de la corrida fue la siguiente: inicio 50 °C por cinco minutos, una rampa de temperatura con aumento de 8°C min<sup>-1</sup> hasta 100 °C por dos minutos. Después, una segunda rampa consistió en el aumento de 15°C min<sup>-1</sup> hasta 280 °C durante cuatro minutos, manteniendo esas condiciones por 4 minutos. Finalmente se aplicó una rampa con aumento de 20°C min<sup>-1</sup> hasta 310 °C manteniéndose esta temperatura durante 10 min. La temperatura de la línea de transferencia se ajustó a 230 °C. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV de energía. Las mediciones se realizaron en modo SCAN con el de m/z (masa cargas) ajustado a 40-500. La temperatura de la fuente de iones y del cuadrupolo fue de 190 °C, con 2.9 escaneos por segundo.

Los datos obtenidos por el GC-MS fueron analizados por el software TurboMass (Perkin Elmer, Inc.). Para la anotación tentativamente de los compuestos se utilizó el software AMDIS y la base de datos NIST MS Search verison 2.0 (National Institute Standard and Technology).

### Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos de ambos tratamientos se evaluó con las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* ATCC (29212) y *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 15635). Las cepas utilizadas para el ensayo se encontraban a una concentración  $0.5 \times 10^8$  en la escala de McFarland (Roman *et al.* 2023). Para la prueba de sensibilidad se inocularon cajas Petri con agar Mueller-Hinton y se colocaron sensidiscos con concentraciones de 2, 3, 4, 5 y 6 mg mL<sup>-1</sup>, más un control positivo (rifaximina 0.2 mg por disco) y el vehículo (etanol) como control negativo. Se realizaron 3 réplicas para cada cepa bacteriana, así

como por población y tratamiento. Las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 24 h, transcurrido el tiempo se realizó la medida de los halos de inhibición (Balfe *et al.* 2023).

El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula propuesta por Corzo (2012):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{mm halo del extracto} - \text{mm halo control negativo}}{\text{mm halo control positivo} - \text{mm halo control negativo}} * 100$$

La concentración mínima inhibitoria fue interpretada como la concentración mínima del antimicrobiano, contenida en el tubo de la serie que inhibió el crecimiento visible de la bacteria, misma que se sometió a espectrofotometría a 575 nm (Wong *et al.* 2015).

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza no paramétrico (Kruskall Wallis) y una prueba de post hoc de Dunn, para los datos obtenidos en las concentraciones de metabolitos. Mientras que los porcentajes de inhibición bacteriana se analizaron mediante Anova y una prueba de Tukey en el programa Paleontological Statistics (PAST.4) (Hammer y Harper 2001, Little y Hills 2008).

## RESULTADOS

### Contenido total de fenoles, flavonoides, terpenos y alcaloides totales

El análisis de resultados mostró diferencias significativas en la producción de metabolitos secundarios entre los extractos de las poblaciones de *P. psilorhachis* con y sin aplicación de quitosano. La población Q uno incrementó su concentración de fenoles en 116.39 µg EAT mg<sup>-1</sup> respecto a su testigo con 45.87 µg EAT mg<sup>-1</sup>, la población Q tres fue la que presentó menor concentración de fenoles (76.02 µg EAT mg<sup>-1</sup>), sin embargo, los individuos tratados aumentaron la concentración de estos compuestos respecto al testigo. Los flavonoides se vieron favorecidos en las poblaciones uno y dos con 74.17 y 59.63 µg EQ mg<sup>-1</sup>, respectivamente; por el contrario, la población tres presentó menor concentración. Para el caso particular de terpenos, se observó que en las tres poblaciones aumentó su concentración respecto a los testigos, siendo la población tres la que presentó una concentración estimada de 2.93 mg EM 10 mg<sup>-1</sup> (Tabla 2).

La cantidad de alcaloides presentes en los extractos de las poblaciones uno (462 µg EC mg<sup>-1</sup>) y dos (123 µg EC mg<sup>-1</sup>), tratadas con quitosano disminuyeron su contenido respecto a sus testigos (528 y 121 µg EC mg<sup>-1</sup>); por el contrario, la población tres aumentó su concentración (451 µg EC mg<sup>-1</sup>) comparada con el resto de las muestras y su testigo. Este mismo fenómeno ocurrió con el ácido salicílico que solo incrementó su concentración en la población dos, en el resto hubo disminución tras la aplicación del quitosano.

### Análisis GC-MS

En la caracterización química tentativa de los extractos etanólicos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), se registraron compuestos de naturaleza terpénica, lactonas y amidas. En el caso particular de la población Q uno, se encontraron cinco compuestos, entre los que destacan 2-propenamida 3-glicoxilamida, oxima y O-benziloxima pentanal, ambas



consideradas amidas, grupo característico del género *Piper*. Por el contrario, en la población T uno se obtuvo siete compuestos, de los cuales sobresalen el (-)-espatulenol y benzenehexamina. Para la población T dos, se identificó  $\delta$ -valerolactona,  $\alpha$ -cadinol, particularmente en el grupo experimental se encontró  $\beta$ -eudesmeno y un precursor de la ruta de fenoles el ácido malónico, 2-(2,3-dihidrobenczo[b]furano). Finalmente, la población Q tres se determinaron tentativamente metilglioxal, talifolin y 2-piperrazina; por el contrario, en la población no tratada se presentaron  $\alpha$ -gurjuneno, 6-piperidinediona, 4-etil-4-meti entre otros terpenos (Tabla 3).

**Tabla 2.** Concentración de metabolitos secundarios y ácido salicílico en extractos etanólicos de *Piper psilorrhachis* con/sin quitosano.

| Metabolito       | Tratamiento | Población 1         | $\sigma\bar{x}$ | Población 2         | $\sigma\bar{x}$ | Población 3         | $\sigma\bar{x}$ |
|------------------|-------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Fenoles          | Q           | 116.39 <sup>a</sup> | 2.51            | 112.41 <sup>a</sup> | 2.74            | 76.02 <sup>a</sup>  | 0.92            |
|                  | T           | 45.87 <sup>b</sup>  | 2.12            | 67.63 <sup>b</sup>  | 0.96            | 58.92 <sup>b</sup>  | 1.19            |
| Flavonoides      | Q           | 74.17 <sup>a</sup>  | 4.56            | 59.53 <sup>a</sup>  | 1.34            | 38.03 <sup>a</sup>  | 1.41            |
|                  | T           | 57.74 <sup>b</sup>  | 0.39            | 37.33 <sup>b</sup>  | 0.39            | 34.90 <sup>b</sup>  | 2.23            |
| Alcaloides       | Q           | 462 <sup>a</sup>    | 6.04            | 123 <sup>a</sup>    | 8.45            | 541 <sup>a</sup>    | 11.02           |
|                  | T           | 528 <sup>b</sup>    | 17.4            | 121 <sup>a</sup>    | 8.71            | 73 <sup>b</sup>     | 6.40            |
| Terpenos         | Q           | 2.22 <sup>a</sup>   | 0.15            | 2.74 <sup>a</sup>   | 0.16            | 2.93 <sup>a</sup>   | 0.11            |
|                  | T           | 1.10 <sup>b</sup>   | 0.15            | 1.29 <sup>b</sup>   | 0.10            | 0.85 <sup>b</sup>   | 0.11            |
| Ácido Salicílico | Q           | 176.76 <sup>a</sup> | 2.27            | 176.5 <sup>a</sup>  | 3.11            | 136.44 <sup>a</sup> | 2.53            |
|                  | T           | 191.92 <sup>b</sup> | 6.28            | 128.13 <sup>b</sup> | 0.98            | 261.92 <sup>b</sup> | 3.17            |

Q: con quitosano, T: sin quitosano. Fenoles:  $\mu\text{g}$  EAT/mg, Flavonoides:  $\mu\text{g}$  EQ/mg, Alcaloides:  $\mu\text{g}$  EC/mg, Terpenos mg EM/10 mg, Ácido salicílico:  $\mu\text{g}$  ESA/mg. Las diferentes letras en los superíndices indican diferencias significativas (KW post hoc Dunn  $p < 0.05$ ).

### Actividad antibacteriana

La actividad biológica de las plantas incrementó tras la aplicación del elicitor, los extractos etanólicos de *P. psilorrhachis* mostraron mayor porcentaje de inhibición sobre los extractos de las poblaciones T (Tabla 4). En particular los extractos de *P. psilorrhachis* a 6 mg mL<sup>-1</sup> fueron efectivos contra *P. fluorescens*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. coli*; contrario a los extractos de las poblaciones T. Estadísticamente se encontraron diferencias significativas (KW  $p < 0.05$ ) entre las concentraciones de los extractos provenientes de poblaciones tratadas y no tratadas.

La concentración mínima inhibitoria fue de 0.5 mg mL<sup>-1</sup> para *P. fluorescens* en las tres poblaciones con el tratamiento de quitosano. En el testigo la CMI fue de 2 mg mL<sup>-1</sup> en la población uno, un mg mL<sup>-1</sup> para la población dos y 0.5 mg mL<sup>-1</sup> en la población tres. En *S. aureus* la CMI fue para ambos tratamientos de 2 mg mL<sup>-1</sup>. Mientras para *E. coli* fue de 0.5 mg mL<sup>-1</sup> en los extractos de *P. psilorrhachis* tratados, y de 2 mg mL<sup>-1</sup> en los extractos testigos. Para finalizar, *E. faecalis* se inhibió con 0.5 mg mL<sup>-1</sup> para tratamiento con quitosano, respeto a los testigos.

**Tabla 3.** Compuestos químicos identificados tentativamente por GC-MS en los extractos de *P. psilorrhachis*

| Población | Tratamiento | Nombre                                                 | TR      | PM  | Fórmula                                                        | CAS         |
|-----------|-------------|--------------------------------------------------------|---------|-----|----------------------------------------------------------------|-------------|
| 1         | Q           | 2-Propenamida, 3-glicoxilamido-, oxima                 | 20.4073 | 157 | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>    | 3552-37-2   |
|           |             | 3,4,4-Trimetil-isoazol-5(4H)-ona                       | 22.3145 | 127 | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                  | 15731-98-3  |
|           |             | O-benziloxima pentanal                                 | 22.8597 | 191 | C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO                             | 72399-21-4  |
|           |             | α-Cadinol                                              | 23.2274 | 222 | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O                              | 481-34-5    |
|           |             | Terpinoleno                                            | 23.2529 | 136 | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                                | 586-62-9    |
|           | T           | Pinocarvona                                            | 19.721  | 150 | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O                              | 30460-92-5  |
|           |             | Propanamida, N-metil-                                  | 23.341  | 87  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO                               | 1187-58-2   |
|           |             | (-)-Espatuleno                                         | 22.6522 | 220 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O                              | 77171-55-2  |
|           |             | Benzenhexanamina                                       | 23.6431 | 177 | C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N                              | 17734-20-2  |
|           |             | Elaol                                                  | 25.1312 | 278 | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>                 | 84-74-2     |
|           |             | 4-metil-2,4-bis(4'-trimetilsililoxifenilo)penteno-1    | 25.4588 | 412 | C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> |             |
|           |             | 4-Piridona                                             | 26.8263 | 95  | C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> NO                               | 626-64-2    |
| 2         | Q           | 1,2-benzenodiol, O-acetoxiacetilo-O'-(4-butilbencilo)- | 21.3521 | 370 | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>                 |             |
|           |             | β-Eudesmeno                                            | 21.8938 | 204 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                                | 17066-67-0  |
|           |             | 2,3-Dioxabicyclo[2.2.1]heptano                         | 22.1529 | 100 | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                   | 279-35-6    |
|           |             | Ácido malónico, 2-(2,3-dihidrobenczo[b]furano)         | 25.9544 | 266 | C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>                 |             |
|           |             | 4-Metil-2,4-bis(4'-trimetilsililoxifenilo) penteno     | 27.5450 | 412 | C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> |             |
|           | T           | δ-Valerolactona                                        | 22.5571 | 100 | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                   | 542-28-9    |
|           |             | α-Cadinol                                              | 23.2199 | 222 | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O                              | 481-34-5    |
|           |             | 4-metil-2,4-bis(4'-trimetilsililoxifenilo)penteno-1    | 25.2287 | 412 | C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> |             |
|           |             | Metilglioxal                                           | 25.5938 | 72  | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                   | 78-98-8     |
|           |             | Trimetil[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenoxi]silano     | 27.2349 | 278 | C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> OSi                            | 78721-87-6  |
|           | Q           | cis-3-Hexenilactato                                    | 22.2330 | 172 | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>                  | 61931-81-5  |
|           |             | 2-Piperazinona                                         | 22.5921 | 100 | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O                 | 5625-67-2   |
|           |             | Metilglioxal                                           | 25.6988 | 72  | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                   | 78-98-8     |
|           |             | 4-Metil-2,4-bis(4'-trimetilsililoxifenilo)penteno-1    | 26.1445 | 412 | C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> |             |
|           |             | Quinuclidona                                           | 27.0299 | 125 | C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO                              | 3731-38-2   |
|           |             | Talifolin                                              | 27.3044 | 207 | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>                | 21796-15-6  |
|           |             | α-Gurjuneno                                            | 22.0184 | 204 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                                | 489-40-7    |
| 3         | T           | 2,6-Piperidinediona, 4-etil-4-metil-                   | 22.0784 | 155 | C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                 | 64-65-3     |
|           |             | 2-Propanono, 1,1,3,3-tetrabutoxi-                      | 22.1224 | 346 | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>                 | 113358-61-5 |
|           |             | α-Cubebeno                                             | 22.2474 | 204 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                                | 17699-14-8  |
|           |             | Espatuleno                                             | 22.6556 | 220 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O                              | 6750-060-3  |
|           |             | γ-Eudesmol                                             | 23.0848 | 222 | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O                              | 1209-71-8   |
|           |             | Cyclopentanona, 2-acetil-3,3-dimetil-2                 | 23.1233 | 167 | C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NOSi                            |             |
|           |             | Ácido Malónico 2-(2,3-dihidrobenczoil [b] furan 5)-2   | 25.9744 | 266 | C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>                 |             |
|           |             | Fitol                                                  | 26.2645 | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O                              | 150-86-7    |

Similitud: con el espectro reportado con máxima similitud en la base de datos NIST.

**Tabla 4.** Porcentajes de inhibición de los extractos de *Piper psilorrhachis* tratados con y sin quitosano

| Cepa                  | Concentración<br>Población | Sin tratamiento de quitosano |                    |                    |                    |                    | Con tratamiento de quitosano |                    |                    |                    |                    |
|-----------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                       |                            | 2                            | 3                  | 4                  | 5                  | 6                  | 2                            | 3                  | 4                  | 5                  | 6                  |
| <i>P. fluorescens</i> | 1                          | 18.52 <sup>a</sup>           | 13.08 <sup>a</sup> | 22.52 <sup>a</sup> | 13.04 <sup>a</sup> | 19.14 <sup>a</sup> | 21.27 <sup>a</sup>           | 19.99 <sup>a</sup> | 20.58 <sup>a</sup> | 23.14 <sup>a</sup> | 20.26 <sup>a</sup> |
|                       | 2                          | 22.97 <sup>a</sup>           | 27.34 <sup>a</sup> | 28.80 <sup>a</sup> | 18.54 <sup>a</sup> | 20.27 <sup>a</sup> | 22.06 <sup>a</sup>           | 33.46 <sup>a</sup> | 37.93 <sup>a</sup> | 24.60 <sup>a</sup> | 23.36 <sup>a</sup> |
|                       | 3                          | 25.44 <sup>a</sup>           | 12.70 <sup>a</sup> | 24.63 <sup>a</sup> | 15.67 <sup>a</sup> | 7.39 <sup>a</sup>  | 35.12 <sup>a</sup>           | 36.05 <sup>a</sup> | 17.24 <sup>a</sup> | 15.63 <sup>a</sup> | 25.05 <sup>a</sup> |
| <i>S. aureus</i>      | 1                          | 32.69 <sup>b</sup>           | 54.95 <sup>b</sup> | 39.62 <sup>a</sup> | 45.05 <sup>a</sup> | 33.23 <sup>a</sup> | 25.77 <sup>a</sup>           | 47.28 <sup>a</sup> | 41.64 <sup>a</sup> | 65.39 <sup>a</sup> | 57.29 <sup>a</sup> |
|                       | 2                          | 29.19 <sup>c</sup>           | 40.87 <sup>a</sup> | 50.42 <sup>a</sup> | 53.40 <sup>a</sup> | 44.69 <sup>a</sup> | 47.88 <sup>a</sup>           | 46.92 <sup>a</sup> | 63.69 <sup>a</sup> | 59.66 <sup>a</sup> | 57.54 <sup>a</sup> |
|                       | 3                          | 26.02 <sup>a</sup>           | 25.66 <sup>a</sup> | 32.57 <sup>a</sup> | 20.59 <sup>a</sup> | 27.85 <sup>a</sup> | 36.52 <sup>a</sup>           | 29.68 <sup>a</sup> | 39.76 <sup>a</sup> | 26.78 <sup>a</sup> | 22.89 <sup>a</sup> |
| <i>E. faecalis</i>    | 1                          | 11.32 <sup>a</sup>           | 17.13 <sup>c</sup> | 19.13 <sup>b</sup> | 8.88 <sup>b</sup>  | 22.11 <sup>b</sup> | 29.48 <sup>b</sup>           | 32.06 <sup>a</sup> | 31.43 <sup>a</sup> | 30.36 <sup>a</sup> | 35.63 <sup>a</sup> |
|                       | 2                          | 14.86 <sup>a</sup>           | 15.98 <sup>d</sup> | 14.06 <sup>c</sup> | 11.49 <sup>c</sup> | 19.64 <sup>c</sup> | 28.51 <sup>c</sup>           | 36.27 <sup>a</sup> | 37.27 <sup>a</sup> | 28.19 <sup>a</sup> | 48.11 <sup>a</sup> |
|                       | 3                          | 19.60 <sup>a</sup>           | 23.15 <sup>a</sup> | 17.58 <sup>a</sup> | 34.14 <sup>d</sup> | 15.7 <sup>d</sup>  | 28.49 <sup>a</sup>           | 51.22 <sup>b</sup> | 39.26 <sup>a</sup> | 55.37 <sup>a</sup> | 29.38 <sup>a</sup> |
| <i>E. coli</i>        | 1                          | 37.95 <sup>a</sup>           | 23.72 <sup>a</sup> | 24.29 <sup>d</sup> | 25.05 <sup>e</sup> | 26.76 <sup>e</sup> | 28.32 <sup>d</sup>           | 20.89 <sup>a</sup> | 41.77 <sup>a</sup> | 37.97 <sup>a</sup> | 34.18 <sup>a</sup> |
|                       | 2                          | 20.33 <sup>a</sup>           | 19.62 <sup>a</sup> | 18.91 <sup>a</sup> | 25.30 <sup>f</sup> | 36.17 <sup>f</sup> | 47.52 <sup>a</sup>           | 26.71 <sup>c</sup> | 28.13 <sup>a</sup> | 50.12 <sup>a</sup> | 69.2 <sup>a</sup>  |
|                       | 3                          | 16.67 <sup>d</sup>           | 5.49 <sup>e</sup>  | 17.62 <sup>e</sup> | 17.30 <sup>a</sup> | 19.30 <sup>g</sup> | 53.89 <sup>e</sup>           | 25.05 <sup>d</sup> | 34.54 <sup>b</sup> | 66.03 <sup>b</sup> | 28.84 <sup>b</sup> |

Concentración en: mg/mL de extracto crudo. Inhibición en: %. Letras diferentes indican diferencias significativas (KW post hoc Dunn  $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

El tratamiento con quitosano mostró efectos significativos sobre los metabolitos secundarios de las poblaciones de *P. psilorrhachis*, siendo los flavonoides, fenoles y terpenos los grupos que aumentaron su concentración en las tres poblaciones después de la aplicación del elicitor, mientras que los alcaloides y el ácido salicílico aumentaron en al menos una población. Lo anterior concuerda con lo reportado para *P. auritum* donde el quitosano indujo mayor síntesis de terpenos, flavonoides, fenoles, pero difiere en el incremento de ácido salicílico, pues en ese estudio aumentó la concentración de esta molécula, mientras que los alcaloides tuvieron una disminución tras la aplicación del tratamiento con elicitor (Fernández *et al.* 2021). Los resultados también concuerdan con lo reportado para *Mentha piperita* L (Lamiaceae) y *Coffea arabica* L., Sp. Pl. (Rubiaceae) donde el quitosano incrementó la producción de fenoles y flavonoides (Salimgandomi y Shabrangi 2016, López-Velázquez *et al.* 2023), en *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) incrementaron los terpenos (Kim *et al.* 2005) y para los alcaloides en dos poblaciones hubo modificación en la concentración como se ha reportado en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) (Pliankong *et al.* 2018).

Cabe mencionar que el ácido salicílico tiene la capacidad de inducir y modular muchos genes en las plantas asociados a la respuesta sistémica adquirida, por lo que puede estimular la síntesis de diferentes metabolitos bioactivos (Klessing *et al.* 2018) como los flavonoides y fenoles que pueden ser responsables de la actividad microbiana, sin descartar a los alcaloides y terpenos. Se ha asociado que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de penetrar la membrana bacteriana y provocar lisis (Rodríguez *et al.* 2017). También se sabe que pueden disrumpir la membrana, detener el cuórum bacteriano, así como la síntesis de DNA y proteínas, por la inhibición de helicasas y topoisomerasas (Gorniak 2019). Los alcaloides, en especial las amidas de *Piper* suelen causar mutaciones en secuencias diana que conducen a la apoptosis celular si no son reparadas (Bezerra



*et al.* 2009). Por lo anterior, se puede asociar que los extractos de las poblaciones tratadas con quitosano se vieron favorecidas con el aumento de fenoles. Particularmente la población tres tratada con quitosano presentó los porcentajes más altos de inhibición en las cuatro bacterias evaluadas, resaltando que en el extracto se identificó tentativamente talifolin un flavonoide que pudiera ser responsable de dicha actividad (Alois *et al.* 2022) y que se encuentra presente en aristoloquias, parientes filogenéticos de las piperáceas. Por último, en este extracto se determinó metilglioxal una molécula que señala estrés celular, que se presenta en plantas cuando son alteradas por factores bióticos y abióticos, por lo cual se puede sugerir que el quitosano indujo alguna respuesta en las plantas (Li 2016). Aunado a esto, se tienen reportes de que esta molécula es capaz de inducir la muerte celular en bacterias (Rabie *et al.*, 2016). A pesar de que en la población dos del testigo presentó este compuesto, quizá la interacción sinérgica con otros compuestos bioactivos inhibió su capacidad antibacteriana.

Cabe mencionar que, en los perfiles fitoquímicos, los compuestos identificados tentativamente difirieron en las mismas poblaciones, así como entre los tratamientos, esto pudo deberse a la expresión y supresión por parte del quitosano (elicitador) en la fisiología de la planta. Se ha documentado que algunas especies de *Piper* sp., modifican la expresión de metabolitos dependiendo del estrés al cual han sido sometidos, un caso particular es el de *P. nigrum*, en el cual se ha documentado que bajo el estrés de micorrizas arbusculares y *Phytophthora capsici* se reduce la producción de aceites esenciales y otros metabolitos, esto se debe a variaciones metabólicas específicas espacio-temporales de los tejidos que se encuentra bajo una infección (Kattupalli *et al.* 2021, Fan *et al.* 2022, Sarathambal *et al.* 2023) e inclusive en el desarrollo vegetal se regula la expresión de ciertos metabolitos, que pueden verse afectados por la presencia de un elicitador, como se reporta en *Peperomia pellucida* Kunth (Alves *et al.* 2022). Lo anterior pudiera explicar por qué la presencia de fitoquímicos varió entre las poblaciones, dado que estas son silvestres y presentaban diferentes estadios fisiológicos e interacciones medioambientales no controladas.

## CONCLUSIONES

La aplicación de quitosano mostró efecto positivo en la producción de metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides y terpenos, en todas las poblaciones de *P. psilorrhachis* tratadas y en al menos en una población se incrementó el ácido salicílico. El análisis por GC MS se identificaron tentativamente metabolitos bioactivos que podrían estar asociados a la actividad antibacteriana que mostraron, especialmente en el extracto de la población tres tratada con quitosano contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* y *E. coli*. Finalmente se sugiere que el quitosano podría estimular la producción de metabolitos bioactivos con potencial antibacteriano, que posiblemente pueda atribuirse a la inducción de una respuesta sistémica.

## CONFLICTO DE INTERÉS

No existe conflicto de interés por parte de los autores

## LITERATURA CITADA

- Aboody MSA, Mickymaray S (2020) Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics* 9 (45) 9(2): e45. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045>
- Alois KM, Sangiwa GC, Marciale CM, Sahini MG (2022) Phytochemical constituents and larvicidal efficacy of leaf extracts of *Aristolochia elegans* (Aristolochiaceae). *South African Journal of Botany* 146: 383-394. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.015>
- Alsheikh HMA, Sultan I, Kumar V, Rather IA, Al-sheikh H, Jan AT, Haq QMR (2020) Plant-based phytochemicals as possible alternative to antibiotics in combating bacterial drug resistance. *Antibiotics* 9(8): e480. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080480>
- Alves NSF, Kaory ISG, Carneiro AR, Albino UB, Setzer WN, Maia JG, Andrade EH, da Silva JKR (2022) Variation in *Peperomia pellucida* growth and secondary metabolism after rhizobacteria inoculation. *PloS One* 17(1): e0262794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262794>
- Balfe E, Kowalski E, Leavitt SA (2023) Kirby-Bauer disc diffusion method indicates absence of antimicrobial properties in *Ariolimax columbianus* Mucus. *Humboldt Journal of Microbiology* 23(1).
- Bezerra DP, Vasconcellos MC, Machado MS, Villela IV, Rosa RM, Moura DJ, Pessoa C, Moraes MO, Riveira ER, Lima MAS, Aquino NC, Henriques JAP, Saffi J, Costa-Lotufo LV (2009) Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 677(1-2): 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.04.007>
- Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP (2013) Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Brüssow H (2024) The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics. *Microbial Biotechnology* 17(7): e14510. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14510>
- Caicedo-López LH, Aranda ALV, Sáenz de la O D, Gómez CEZ, Márquez EE, Zepeda HR (2021) Elicitors: implicaciones bioéticas para la agricultura y la salud humana. *Revista Bioética* 29(1): 76-86. <https://doi.org/10.1590/1983-80422021291448>
- Carmona-Hernández O, Fernández MS, Palmeros-Sánchez B, Lozada-García JA (2014) Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* L.) en *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30: 67-73.
- Carmona-Hernández O, Laccetti L, Martínez-Hernández MJ, Luna-Rodríguez M, Fernández MS, Guerrero-Analco JA, Asselin H, Scopece G, Lozada-García JA (2023). Plant conservation in the Mesoamerican biodiversity hotspot: a case study on the *Piper* genus in Veracruz (Mexico). *Tropical Ecology* 64(2): 324-336. <https://doi.org/10.1007/s42965-022-00271-9>
- Corzo D (2012) Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas* 43(3): 81-86
- Fan R, Tao XY, Xia ZQ, Sim S, Hu LS, Wu BD, Wang QH, Hao CY (2022). Comparative transcriptome and metabolome analysis of resistant and susceptible *Piper* species upon infection by the oomycete *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science* 13: e864927. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.864927>
- Fernández MDS, Hernández-Ochoa F, Carmona-Hernández O, Luna-Rodríguez M, Barrientos-Salcedo C, Asselin H, Lozada-García JA (2021) Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the in vitro fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(1): 1-9. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-6>
- Gallegos-Morales G, Sánchez-Yáñez JM, Hernández-Castillo FD (2022) Chitosan in the protection of agricultural crops against phytopathogens agents. *Horticulture International Journal* 6(3): 168-175.

- Ghorai N, Chakraborty S, Gucchait S, Kumar S, Biswas S (2017) Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. Protocol Exchange. <https://doi.org/10.1038/protex.2012.055>
- Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J (2019) Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews* 18: 241-272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Hammer Ø, Harper DA (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica* 4(1).
- INEGI. (2022) Mapa digital de México. <https://www.inegi.org.mx/temas/mapadigital/>. Fecha de consulta: 02 de Septiembre de 2023
- Kattupalli D, Pinski A, Sreekumar S, Usha A, Girija A, Beckmann M, Jose MLA, Eppurathu SV (2021) Non-targeted metabolite profiling reveals host metabolomic reprogramming during the interaction of black pepper with *Phytophthora capsici*. *International Journal of Molecular Sciences* 22(21): e11433. <https://doi.org/10.3390/ijms222111433>
- Keita K, Darkoh C, Okafor F (2022) Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. *SN Applied Sciences* 4(8): e209. <https://doi.org/10.1007/s42452-022-05084-y>
- Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC (2005) Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(9): 3696-3701 <https://doi.org/10.1021/jf0480804>
- Klessig DF, Choi HW, Dempsey DA (2018) Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31(9): 871-888. <https://doi.org/10.1094/mpmi-03-18-0067-cr>
- Lárez VC, Rojas PM, Chirinos A, Rojas AL (2019) Nuevos retos en agricultura para los biopolímeros de quitina y quitosano. Parte 1: Efectos beneficiosos para los cultivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales* 20(3): 118-136.
- Li ZG (2016) Methylglyoxal and glyoxalase system in plants: old players, New Concepts. *Botanical Review* 82(2): 183-203. <https://doi.org/10.1007/s12229-016-9167-9>
- Little TM, Hills FJ (2008) Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. 2da edición. Editorial Trillas. México. 270p.
- López-Moya F, Suarez-Fernández M, López-Llorca LV (2019) Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2): e332. <https://doi.org/10.3390/ijms20020332>
- López-Velázquez JC, García-Morales S, López-Sánchez, GP, Montero-Cortés MI, Uc-Vázquez A, Qui-Zapata JA (2023) High-density chitosan induces a biochemical and molecular response in *Coffea arabica* during infection with *Hemileia vastatrix*. *International Journal of Molecular Sciences* 24(22): e16165. <https://doi.org/10.3390/ijms242216165>
- Mgbeahuruike EE, Yrjönen T, Vuorela H, Holm Y (2017) Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South African Journal of Botany* 112: 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>
- Pliankong P, Suksa P, Wannakrairoj S (2018) Chitosan elicitation for enhancing of vincristina and vinblastina accumulation in cell culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of Agricultural Science* 10(12): 287-293.
- Rabie E, Serem JC, Oberholzer HM, Gaspar ARM, Bester MJ (2016) How methylglyoxal kills bacteria: An ultrastructural study. *Ultrastructural Pathology* 40(2): 107-111. <https://doi.org/10.3109/01913123.2016.1154914>
- Rahman A, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S (2016) Induction of systemic resistance in cotton by the neem cake and *Pseudomonas aeruginosa* under salinity stress and *Macrophomina phaseolina* infection. *Pakistan Journal of Botany* 48 (4): 1681-1689.

- Rodríguez PNC, Zarate SAG, Sánchez LLC (2017) Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. NOVA 15(27): 119-129. <https://doi.org/10.22490/24629448.1963>
- Roman H, Niculescu AG, Lazăr V, Mitache MM (2023) Antibacterial efficiency of *Tanacetum vulgare* essential oil against ESKAPE pathogens and synergisms with antibiotics. Antibiotics 12(11): e1635. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111635>
- Salehi, B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, Khan T, Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Turkdonmez E, Valussi M, Tumer TB, Fidalgo LM, Martorell M, Setzer WN (2019) *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. Molecules 24(7): e1364. <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>
- Salimgandomi S, Shabrangi A (2016) The effect of chitosan on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha piperita* L. Journal of Pharmaceutical and Health Sciences 4(2): 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100651>
- Sarathambal C, Jeevalatha A, Sivaranjani R, Biju CN, Charles S, Srinivasan V, George P, Perter B, Radhika R (2023) Arbuscular mycorrhizal colonization alters biochemical, molecular defense responses and root exudate composition against *Phytophthora capsici* infection in black pepper. Rhizosphere 25: e100651. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100651>
- Shamsudin NF, Ahmed QU, Mahmood S, Ali SSA, Khatib A, Mukhtar S, Alsharif MA, Parveen H, Zakaria ZA (2022) Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: A comparative interpretation. Molecules 27(4): e1149. <https://doi.org/10.3390/molecules27041149>
- Sharma A, Kohli SK, Khanna K, Ramakrishnan M, Kumar V, Bhardwaj, Brestic M, Landi M, Zheng B. (2023). Salicylic acid: A phenolic molecule with multiple roles in salt-stressed plants. Journal of Plant Growth Regulation 42(8): 4581-4605. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10902-z>
- Tiwari RK, Udayabhanu M, Chanda S (2016) Quantitative analysis of secondary metabolites in aqueous extract of *Clerodendrum serratum*. International Research Journal of Pharmacy 7: 61-65. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0712148>
- Trindade R, Almeida L, Xavier L, Andrade EH, Maia JG, Mello A, Setzer WN, Ramos A, da-Silva, JKR (2021) Influence on secondary metabolism of *Piper nigrum* L. by co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Microorganisms 9(3): e484. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030484>
- Wong KY, Vikram P, Chiruvella KK, Mohammed A (2015) Phytochemical screening and antimicrobial potentials of *Borreria* sp (Rubiaceae). Journal of King Saud University - Science 27(4): 302-311. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.12.001>
- Zeier J (2021) Metabolic regulation of systemic acquired resistance. Current Opinion in Plant Biology 62: e102050. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102050>