



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE AGENTES NATURALES COMO  
INHIBIDORES DE FACTORES RELACIONADOS  
CON LA PATOGENICIDAD BACTERIANA**

Tesis que presenta

**MARÍA CLAUDIA PEÑA GONZÁLEZ**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **María Claudia Peña González**, titulado “Evaluación de agentes naturales como inhibidores de factores relacionados con la patogenicidad bacteriana”, fue realizado en el laboratorio de Química orgánica de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de productos naturales, bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de noviembre de 2020

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

MARÍA CLAUDIA PEÑA GONZÁLEZ

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. LUIS MANUEL PEÑA RODRÍGUEZ.

## **AGRADECIMIENTOS**

El éxito alcanzado en este proyecto es el resultado de la suma de muchos esfuerzos, por tal razón, agradezco el tiempo, apoyo y paciencia a:

Al director Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por la confianza depositada y esfuerzo para hacer el seguimiento al desarrollo de este trabajo, el cual se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A la Dra. Naybi R. Muñoz Cázares, por brindarme la oportunidad de aprender a su lado, compartir su conocimiento en el tema conmigo y sus valiosos consejos.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, de la Unidad de Materiales y al Dr. Felipe Vázquez Flota, de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, CICY, por el préstamo de equipos para realizar las lecturas de los diferentes ensayos biológicos.

A los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Daisy Pérez Brito, el Dr. Israel Castillo y el Dr. Fernando Echeverri, por la oportuna corrección para el avance del proyecto.

Al técnico Gabriel Dzib, quien pertenece a la Unidad de Recursos Naturales-CICY, por su apoyo en la colecta del material vegetal.

Al Laboratorio del Plátano, de la Unidad de Biotecnología-CICY, por el préstamo de sus instalaciones donde se realizó la evaluación de la actividad antivirulencia.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este proyecto.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la financiación de este proyecto de investigación a través de una beca para estudios de maestría otorgada a María Claudia Peña González (CONACYT-730196).

## **DEDICATORIA**

A Dios.

A mis padres, Edgar Manolo y Claudia Rocío, por darme ese impulso constante y su amor infinito, por guiarme, enseñarme y acompañarme aun en la distancia, pues mi hogar siempre estuvo completo en mi corazón.

A mi eterno compañero de vida, mi hermano Edgar Julián por ser mi principal ejemplo de perseverancia.

A mis abuelas Carmen Nylia y Ernestina por su amor.

A Vidal Javier por su paciencia, amor, apoyo incondicional y visitas inesperadas.

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>TABLA DE CONTENIDO .....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>v</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
1. <b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>11</b>
1.1 <b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
1.2 <b>Natural inhibitors of quorum-sensing factors. A novel strategy to control pathogenic bacteria.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 <b>Introduction.....</b>	<b>14</b>
1.2.2 <b>Discussion.....</b>	<b>16</b>
1.2.3 <b>Conclusion .....</b>	<b>25</b>
1.3 <b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>26</b>
1.4 <b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>27</b>
1.5 <b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
1.5.1 <b>Objetivo general .....</b>	<b>28</b>
1.5.2 <b>Objetivos específicos.....</b>	<b>28</b>

---

1.6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
2	CAPITULO II.....	30
2.1	INTRODUCCIÓN.....	30
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.2.1	Material vegetal.....	32
2.2.2	Procedimientos generales .....	32
2.2.3	Obtención de extractos vegetales.....	38
2.2.4	Partición líquido-líquido del extracto metanólico de <i>C. greggii</i> .....	38
2.2.5	Separación en columna de fracción MC-8C.....	38
2.2.7	Evaluación de la actividad antivirulencia en <i>P. aeruginosa</i> .....	39
2.2.7.1	Descripción de cepas utilizadas y condiciones de cultivo.....	39
2.2.7.2	Concentración Míma Inhibitoria (CMI).....	39
2.2.7.3	Inhibición de los factores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> .....	40
2.2.8	Análisis estadístico .....	41
2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
2.3.1	Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos vegetales en <i>P. aeurginosa</i> .....	41
2.3.2	Detección e identificación de extractos con propiedades antivirulencia	43
2.3.3	Efecto de las fracciones y fracciones sempurificadas obtenidas del extracto de <i>C. greggii</i> sobre la producción de factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	
	45	

---

2.4	CONCLUSIONES.....	48
3	CAPITULO III .....	49
3.1	INTRODUCCIÓN.....	49
3.2	METODOLOGÍA .....	51
3.2.1	Obtención de metabolitos de <i>A. dauci</i> .....	51
3.2.2	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	51
3.2.3	Actividad antivirulencia de los metabolitos aislados de <i>A. dauci</i> .....	52
3.2.4	Inducción de la producción de violaceína en el modelo de <i>C. violaceum</i>	
CV026	52	
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
3.4	CONCLUSIONES.....	54
4	CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....	55
4.1	CONCLUSIONES GENERALES.....	55
4.2	PERSPECTIVAS.....	55
	REFERENCIAS .....	57
	ANEXOS .....	76

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.7</b> Diseño experimental.....	29
<b>Figura 2.1</b> Efecto de los extractos metanólicos de las plantas con mayor actividad registrada sobre los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	44
<b>Figura 3.1</b> Metabolitos aislados del cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. dauci</i> .....	49

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Plantas seleccionadas.....	33
<b>Tabla 2.2</b> Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de las plantas evaluadas... ..	42
<b>Tabla 2.3</b> Efecto de las fracciones obtenidas del extracto de <i>C. greggii</i> sobre los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	46
<b>Tabla 2.4</b> Efecto de las fracciones obtenidas de la fracción de alta polaridad (MC-8C) del extracto de <i>C. greggii</i> sobre los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	47
<b>Tabla 3.1</b> Metabolitos seleccionados del cultivo de <i>A. dauci</i> .....	51
<b>Tabla 3.2</b> Descripción de cepas utilizadas.....	51
<b>Tabla 3.3</b> Efecto de los metabolitos de <i>A. dauci</i> sobre los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	53
<b>Tabla 3.4</b> Inducción de la producción de violaceína en <i>C. violaceum</i> CV026.....	54

---

## **ABREVIATURAS**

<b>AHL</b>	N-acil-homoserin lactona
<b>AI</b>	Autoinductor
<b>CCD</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>C6-HSL</b>	N-hexanoil-L-homoserin lactona
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PQ</b>	Percepción de Quórum
<b>SSA</b>	Secretaría de Salud

---

## RESUMEN

El aumento de la resistencia a los antibióticos entre los patógenos bacterianos, se ha convertido en un problema de salud grave a nivel mundial, impulsando la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento. Una opción viable se basa en la identificación de agentes antivirulencia, que tienen como propósito atenuar la patogenicidad bacteriana sin afectar la viabilidad celular, con el fin de retardar la aparición de resistencia. La percepción de quórum es uno de los principales objetivos de los agentes antivirulencia ya que juega un papel fundamental en la expresión de los factores de virulencia y resistencia durante el proceso de infección. El objetivo del presente trabajo fue identificar agentes naturales con actividad antivirulencia de plantas utilizadas en la medicina tradicional Maya, así como de un cultivo de *Alternaria dauci*.

Mediante un ensayo biodirigido se evaluó el efecto de 19 extractos de plantas utilizadas en la medicina Maya, sobre los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. De estas plantas solo *Ceiba aesculifolia*, *Colubrina greggii*, *Bursera simaruba*, *Jathropa gaumeri* y *Bonellia flammea*, mostraron actividad antivirulencia al inhibir la producción de piocianina, proteasas y biopelícula en *P. aeruginosa*. Debido a que el extracto metanólico de la raíz de *C. greggii* fue el más activo, se realizó una partición líquido-líquido, y la fracción butanólica fue la que inhibió los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, por lo que se hizo una semipurificación por cromatografía líquida al vacío. De las 15 fracciones obtenidas, MC-21C y MC-21G, inhibieron la expresión de los factores de virulencia en *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos coinciden con el uso tradicional de la raíz de *C. greggii* para combatir infecciones, mediante una propiedad alterna a la bactericida. La actividad antivirulencia encontrada en el extracto y fracciones de *C. greggii*, revela la presencia de metabolitos que podrían ser usados como agentes antiinfecciosos, por lo que futuros estudios se centrarán en su purificación e identificación. Por otra parte, se evalúo la actividad antivirulencia de tres metabolitos aislados de un cultivo *in vitro* de *Alternaria dauci*. En los ensayos, estos metabolitos no inhibieron los factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Como el efecto encontrado fue de inducción, analizamos si la actividad estaba relacionada con su potencial como moléculas inductoras, por lo que se utilizó el modelo de inducción de violaceína descrito en *Chromobacterium violaceum* CV026. Ninguno de los metabolitos mostró actividad, por lo que no pueden considerarse moléculas inductoras en el modelo utilizado.

---

## ABSTRACT

The increase of antibiotic resistance among bacterial pathogens has become a global health problem, encouraging the search for new alternatives to treatment. A viable option is based on the identification of antivirulence agents, which are intended to attenuate bacterial pathogenicity without affecting bacterial growth, therefore avoiding the spread of resistance. Quorum sensing is one of the main targets of antivirulence agents since it plays a fundamental role in the expression of virulence and resistance factors during the infection process. The objective of the present work was to identify natural agents with antivirulence activity from plants used in traditional Mayan medicine, as well as from a culture of *Alternaria dauci*.

Through a bio-guided assay, the effect of methanol extracts of 19 plants used in traditional Mayan medicine over the virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. Of these plants only *Ceiba aesculifolia*, *Colubrina greggii*, *Bursera simaruba*, *Jathropa gaumeri* and *Bonellia flammea* showed antivirulence activity by inhibiting the production of pyocyanin, proteases, and biofilm formation in *P. aeruginosa*. Since the methanolic extract from the roots of *C. greggii* was the most active, a liquid-liquid partition was carried out, being the butanolic fraction (MC-8C) the one that inhibited the virulence factors of *P. aeruginosa*, proceeding to a semi-purification by vacuum liquid chromatography. Of the 15 fractions obtained, the MC-21C and MC-21G fractions inhibited the expression of virulence factors in *P. aeruginosa*. The results obtained coincide with the traditional use of the roots of *C. greggii* to fight infections, through an alternative property than bactericidal. The antivirulence activity found in the extract and fractions of *C. greggii* reveals the presence of metabolites that could be used as anti-infective agents, so future studies will focus on their purification and identification. In addition, the antivirulence activity of three metabolites isolated from an *in vitro* culture of *Alternaria dauci* was evaluated. In the assays, these metabolites did not inhibit the virulence factors of *P. aeruginosa*. As the effect found was of induction, we analyzed if the activity was related to their potential to be inducer molecules, so the model of violacein induction described in *Chromobacterium violaceum* CV026 was used. None of the metabolites showed activity, thus they cannot be considered as inducer molecules in the model used.

## INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y desarrollo de antibióticos durante el siglo XX, representó el mayor avance científico en la lucha contra las infecciones bacterianas (Gould, 2016); sin embargo, su uso indiscriminado ha acelerado el proceso natural de evolución, dando lugar al desarrollo de cepas resistentes (Muñoz-Cazares *et al.*, 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) atribuye a estas bacterias la persistencia de infecciones graves y a menudo letales, que surgen en los hospitales hoy en día, siendo una amenaza significativa para la salud pública a nivel mundial (WHO, 2016).

En México, de acuerdo con la Secretaría de Salud (SSA), desde el año 2010 se implementan medidas para evitar el uso inapropiado de los antibióticos y erradicar la automedicación (SSA, 2018). Además, se han enlistado los principales géneros bacterianos causantes de infecciones nosocomiales en el país, con el fin de identificar la incidencia de la resistencia bacteriana (Gutiérrez *et al.*, 2017). Así mismo, se ha desarrollado la “Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los antimicrobianos” (DOF, 2018), integrándose al Plan de Acción Mundial para controlar la Resistencia a los Antimicrobianos, propuesto por la OMS, que se centra en la concienciación, vigilancia e investigación sobre la resistencia bacteriana y fomenta la inversión en investigación y desarrollo de nuevos productos para el tratamiento de infecciones resistentes (WHO, 2017).

La inhibición de la virulencia bacteriana en lugar de la viabilidad celular, representa una estrategia prometedora para la identificación de nuevos antimicrobianos, ya que retardan la aparición de resistencia al disminuir la presión de selección (Trastoy *et al.*, 2018; Rampioni *et al.*, 2017; Defoirdt, 2016; Shukla y Bhathena, 2016). Esta nueva clase de agentes antivirulencia inhiben la expresión fenotípica de los factores asociados a la virulencia bacteriana, incluyendo la formación de la biopelícula, el desplazamiento o motilidad, la producción de enzimas líticas, fenazinas y sideróforos, elementos fundamentales en los procesos de colonización, adhesión, invasión, diseminación y resistencia en el hospedero (Defoirdt, 2018; Muñoz-Cazares *et al.*, 2017; LaSarre y Federle, 2013; Casadevall y Pirofski, 1999).

Diferentes especies bacterianas, regulan su virulencia y patogenicidad mediante las señales químicas denominadas autoinductores (AI). Estos AI al alcanzar una concentración umbral, se unen a su receptor afín, activando una cascada de transducción de señales que

conducen a la expresión de varios genes, relacionados con diferentes procesos como la bioluminiscencia, la esporulación, la producción de antibióticos, la expresión de factores de virulencia, entre otros (Astfour, 2018; Torres *et al.*, 2017; Rutterford y Bassler, 2011).

En los últimos años, la bacteriana patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* ha sido adoptada como modelo para la identificación y el desarrollo de agentes antivirulencia, ya que la expresión de sus factores de virulencia como elastasas, proteasas, piocianina y formación de biopelicula, está regulada por la percepción de quórum (PQ) (Baldelli *et al.*, 2020; D'Angelo *et al.*, 2018). *P. aeruginosa* causa infecciones agudas en los pulmones y en el tracto urinario, además de proliferar en quemaduras y heridas (Kordbacheh *et al.*, 2017; Muñoz-Cazares *et al.*, 2017; Adonizio *et al.*, 2006); esta bacteria presenta altos niveles de resistencia a diferencia antibióticos por lo que está clasificada por la OMS como un patógeno de prioridad crítica (WHO, 2017).

Debido a lo anterior, el descubrimiento de nuevos inhibidores de virulencia, capaces de interferir con la PQ en *P. aeruginosa*, representa una alternativa prometedora para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos, por lo que en este trabajo se estableció el potencial de algunas especies vegetales usadas en la medicina tradicional Maya, así como de metabolitos provenientes de un cultivo de *Alternaria dauci*, como fuentes de agentes naturales con propiedades antivirulencia.

## 1. CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Resumen

El uso inadecuado y generalizado de antibióticos convencionales para el tratamiento de enfermedades infecciosas, ha provocado la aparición de cepas resistentes de microorganismos patógenos y esto, a su vez, ha impulsado la búsqueda de metabolitos antibacterianos con nuevos mecanismos de acción. El uso de agentes antivirulencia, que se centran en atenuar la patogenicidad bacteriana en lugar de afectar la viabilidad celular, representa un enfoque alternativo e interesante para el tratamiento de infecciones bacterianas. La PQ es uno de los principales objetivos de los agentes antivirulencia, ya que juega un papel fundamental en la expresión de factores de virulencia y resistencia durante el proceso de infección. Considerando que los productos naturales representan una fuente potencialmente importante de agentes antivirulencia, esta revisión describe metabolitos secundarios de plantas y microorganismos que inhiben la PQ, particularmente sobre el patógeno oportunista *P. aeruginosa*, uno de los patógenos humanos más problemáticos y que, debido a su resistencia intrínseca a los antibióticos, se ha adoptado como modelo para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos.

<sup>1</sup>Este capítulo ha sido aceptado como un artículo de revisión, en la Revista Brasileira de Farmacognosia. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00112-7>

## **1.2 Natural inhibitors of quorum-sensing factors. A novel strategy to control pathogenic bacteria**

María Claudia Peña-González,<sup>†</sup> Naybi Rosario Muñoz-Cázares,<sup>†</sup>

Luis Manuel Peña-Rodríguez\*

Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná, Mérida, Yucatán, México  
97205

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to the preparation of this review

Corresponding author:

Luis Manuel Peña-Rodríguez

[lmanuel@cicy.mx](mailto:lmanuel@cicy.mx)

ORCID ID

María Claudia Peña-González: 0000-0002-7639-0901

Naybi Muñoz-Cázares: 0000-0002-6243-7983

Luis Manuel Peña Rodríguez: 0000-0001-6511-5122

### **Acknowledgments**

Naybi Muñoz-Cázares and María Claudia Peña-González wish to thank CONACYT-México for their postdoctoral fellowship and postgraduate scholarship numbers 740301 and 730196, respectively.

### **Data availability statement**

All the data used to prepare this review are included in the manuscript.

### **Declaration of interest**

The authors report no conflict of interest.

### **Funding**

The preparation of this review did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Author contribution**

NRMC and MCPG carried out the literature search and prepared the first draft of the manuscript. MCPG designed and drew the figures. NRMC, MPCG, and LMPR revised the final draft of the manuscript.

### **Abstract**

The inappropriate and widespread use of conventional antibiotics for the treatment of infectious diseases, has resulted in the emergence of resistant strains of pathogenic microorganisms and this, in turn, has promoted the search for antibacterial metabolites with new mechanisms of action. The use of antivirulence agents, which focus on attenuating bacterial pathogenicity rather than affecting cell viability, represents an alternate and interesting approach for treating bacterial infections. Quorum sensing is one of the main targets of antivirulence agents, since it plays a fundamental role in the expression of virulence and resistance factors during the infection process. Considering that natural products represent a potentially important source of antivirulence agents, this review describes secondary metabolites from plants and microorganisms reported to inhibit quorum sensing, particularly over the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, one of the most problematic human pathogens and one that, because of its intrinsic resistance to antibiotics, has been adopted as a model for the discovery of new antimicrobial agents.

**Key words:** Antibiotic resistance, Antivirulence agents, Bacterial pathogenicity, Biofilm, Human pathogens, Pyocyanin.

### 1.2.1 Introduction

The discovery and development of antibiotics during the twentieth century represented the greatest scientific breakthrough against bacterial infections (Sun et al. 2016; Hutchings et al. 2019). Since the introduction of sulfonamides and penicillin for clinical use, at least 20 classes of antibiotics and numerous analogues have been discovered and marketed (Powers 2004; Hutchings et al. 2019; López Romo and Quirós 2019), targeting bacterial physiology and biochemistry to cause microbial cell death or growth cessation (Sengupta et al. 2013). Nevertheless, the indiscriminate use of antibiotics has accelerated the natural process of evolution, leading to the emergence of resistant strains of pathogenic microorganisms (Gould 2016).

In recent years, bacterial resistance, defined as the ability of bacteria to defeat the drugs designed to kill them, has become a global public health problem (CDC 2020). Although the emergence of resistance is a natural process that occurs from genetic mutations or by horizontal gene transfer, the emergence and spread of multidrug-resistant bacteria has been accelerated by the widespread and inappropriate use of antibiotics as therapeutic agents in human medicine and the livestock industry (Trastoy et al. 2018; Pacios et al. 2020). Currently, multi-drug resistant bacteria are threatening our ability to treat common bacterial diseases (Lu et al. 2019) and this situation requires immediate actions on a global scale to address antibiotic resistance; recently, the World Health Organization adopted the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, which is focused on improving awareness, surveillance, and research on bacterial resistance, and encourages investment in research and development of new products for the treatment of resistant infections (WHO 2016).

After the “golden age” of antibiotics in the 1940s to the 1960s, the discovery and development of new classes of antibiotics has not kept up with the emergence of resistant strains, and this has led some experts to warn of a “post-antibiotic” era (Alanis 2005; Colson 2008; Hutchings et al. 2019). Natural products have proved to be an impressive source of therapeutic agents against pathogenic bacteria; nevertheless, the growing incidence of resistant infections obviously shows the need for novel natural products leads to overcome antibiotic resistance (Rossiter et al. 2017). Even though 162 natural and synthetic antibacterial agents were approved between 1981 and 2019 (Newman and Cragg 2019), only five of them, daptomycin (lipopeptide), retapamulin (pleuromutilin), linezolid (oxazolidinones), fidaxomicin (lipiarmycin) and bedaquiline ( diarylquinoline), represent new

classes of antibiotics (Colson et al. 2008; Hutchings et al. 2019; Newman and Cragg 2020). Furthermore, and even though a number of antimicrobials with novel mechanisms of action are in clinical trials targeting lipid and cell membrane biosynthesis, cell division, the 50S ribosomal subunit, and the type II topoisomerase of bacteria (Hutchings et al. 2019), the majority still target mainly Gram-positive bacteria and few are active against pathogens considered by the WHO as a critical threat (WHO 2017; Hutchings et al. 2019). Since affecting bacterial viability cannot solve the problem of emerging resistance, it is important to continue the search and development of agents with new mechanisms of action to treat bacterial infections (Coulson et al. 2011; Trastoy et al. 2018).

Inhibition of bacterial virulence instead of bacterial viability represents a promising strategy for the identification of novel antimicrobials, since it reduces the emergence of resistance by lowering the selective pressure (Heras et al. 2015; Fleitas Martínez et al. 2019). This new class of antivirulence agents inhibit the expression of phenotypic factors associated with bacterial virulence, including biofilm formation, motility, production of lytic enzymes, phenazines, and siderophores, that play a key role in the processes of colonization, adhesion, invasion, dissemination and resistance in the host (Casadevall and Pirofski 1999; LaSarre and Federle 2013; Muñoz-Cazares et al. 2017; Defoirdt 2018). It is known that several species of pathogenic bacteria regulate their virulence and pathogenicity by quorum sensing, a system of chemical communication that coordinates gene expression in response to population density (Dong et al. 2001; Miller and Bassler 2001; Muimhneacháin et al. 2018), which has been recognized as an attractive target for antivirulence agents.

Quorum sensing involves the synthesis of, detection of, and response to chemical signaling molecules known as autoinducers, which accumulate extracellularly; once the autoinducers reach a certain threshold concentration, gene expression is triggered to control different processes such as bioluminescence, sporulation, antibiotic production, biofilm formation, and virulence factor secretion, among others (Miller and Bassler 2001; Williams and Cámarra, 2009; Rutterford and Bassler 2012; Torres et al. 2017; Asfour 2018). By using quorum sensing systems, bacteria coordinate their communal behavior and adopt certain phenotypes that are essential to resisting environmental stress, as well as to improving their defense mechanisms against other microorganisms or as part of the eukaryotic host-defense (Netotea et al. 2009; Delago et al. 2016; Zhao et al. 2020). Because of this, if an antivirulence agent can disrupt this communication system without affecting cell viability like antibiotics do, the emergence of resistance can be avoided (Yin et al. 2015; Asfour 2018).

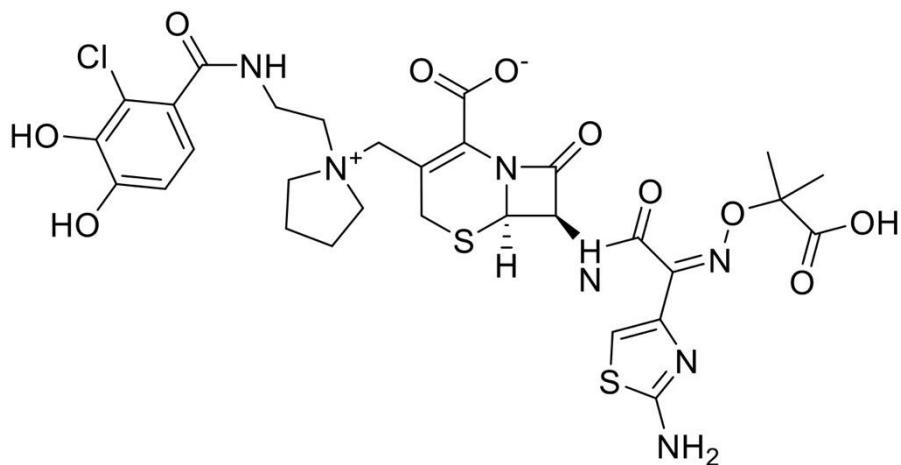
Recently, the use of antivirulence agents has been proposed for the control of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, since the expression of its virulence factors are controlled by quorum sensing (Delago et al. 2016; Kordbacheh et al. 2017; Muimhneacháin et al. 2018). This bacterium proliferates in wounds and burns, but it can also cause acute infections in the lungs and the urinary tract (Pang et al. 2019); it is highly resistant to different antibiotics and it is classified as a pathogen of critical priority by the WHO (2017). In view of this, the potential discovery of new virulence inhibitors, capable of interfering with quorum sensing signaling in *P. aeruginosa*, represents a promising alternative for the discovery of new antimicrobial agents (Adonizio et al. 2006; Kordbacheh et al. 2017; Muimhneacháin et al. 2018). Furthermore, in this review, different approaches in modulating quorum sensing and biofilm formation as nonlethal methods are also discussed.

### **1.2.2 Discussion**

#### **Bacterial resistance**

One of the major concerns in hospital and community settings is the ESKAPEEc pathogens, a group of bacteria made up of *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* species and *Escherichia coli* (Pendleton et al. 2013; Santajit and Indrawattana 2016, De Angelis et al. 2018). These bacteria, together with *Burkholderia cepacia* and *Neisseria gonorrhoeae* (Ohnishi et al. 2011; Rhodes and Schweizer 2016), are characterized by their ability to evade the action of antibiotics through one or more resistance mechanisms which include affecting the antibiotic target or the antibiotic molecule (Santajit and Indrawattana 2016), activating the efflux pumps (Lira-Ricárdez and Pereda-Miranda 2020), or the formation of biofilm (Maiden et al. 2019; Pacios et al. 2020). The prevalence of this group of bacteria in nosocomial infections requires new therapeutic approaches for their treatment, especially for Gram negative bacteria like *A. baumanii* and *P. aeruginosa*, in which their higher intrinsic resistance due to the presence of a protective double-layer of lipid membranes in the cell wall -not present in Gram-positive microorganisms-, and the abundance of efflux pumps (Venter et al. 2015), makes it difficult for a new antibacterial agent to penetrate (Mukherjee et al. 2017; Domalaon et al. 2019; Gupta and Datta, 2019). To overcome the resistance mechanisms of ESKAPEEc pathogens, a combination of antibiotics and antibiotic hybrids have been designed (Tevyashova et al. 2015; Domalaon et al. 2018; Gupta and Datta 2019);

the antibiotic hybrids are synthetic constructs of two antibiotics covalently linked, or an antibiotic with an adjuvant that enhances the access to the target site of antibiotics, but is not bactericidal in itself (WHO 2017; Gupta and Datta 2019). An example of an antibiotic hybrid is cefiderocol, a cephalosporin attached to a siderophore (Fig. 1), that uses the iron transport mechanism in bacteria to facilitate uptake of the drug that is actively transported into the bacterial cell (Dobias et al. 2017; Falagas et al. 2017; Katsube et al. 2017; WHO 2017); however, the use of these types of hybrid still cannot prevent the emergence of resistant strains (Tomaras et al. 2013; WHO 2017).

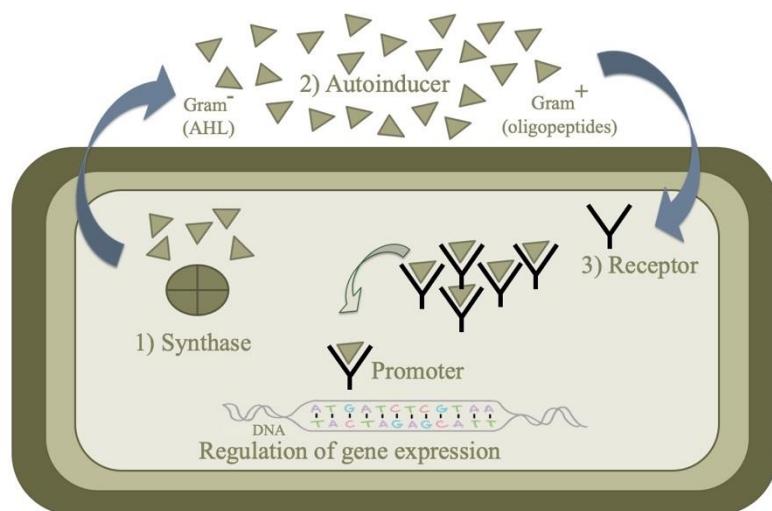


**Fig. 1** Chemical structure of cefiderocol, the first siderophore antibiotic to be approved by the U.S. Food and Drug Administration to treat adults with complicated urinary tract infections caused by Gram-negative bacteria. This product uses the bacteria's own iron-transport system to be transported into the cell.

### Quorum sensing

The term quorum sensing was introduced in 1994 to describe the ability of bacteria to monitor their population density through the use of signaling molecules called autoinducers (Dong et al. 2001; Miller and Bassler 2001), and by modulating gene expression (Fuqua et al. 1994, 2001; Papenfort and Bassler 2016). Quorum sensing allows bacteria to act as one multicellular organism when recognizing and responding, in a coordinated manner, to environmental changes such as temperature, pH, oxidative conditions, nutrient availability,

and the presence of antimicrobial agents (Whitehead et al. 2001; Kang et al. 2016). The autoinducers are continually produced by a synthase and accumulate extracellularly as the bacterial population density increases (Dong et al. 2001; Miller and Bassler 2001; Muimhneacháin et al. 2018); once a threshold concentration is reached, the autoinducer binds with a receptor, activating the expression of different genes (Figure 2) (Papenfort and Bassler 2016; Abisado et al. 2018) to regulate physiological processes such as bioluminescence, biocorrosion, sporulation and antibiotic production, as well as phenotypic behaviors like pathogenicity, swarming, and biofilm formation (Bacha et al. 2016; Kalia and Purohit, 2011; Kang et al. 2016). Autoinducers of Gram-negative bacteria are different to those from Gram-positive bacteria (Papenfort and Bassler 2016; Asfour 2018); whereas N-acyl homoserine lactones (AHLs, 1) are the major class of autoinducers or signaling molecules produced by Gram-negative bacteria to monitor population density and modulate gene expression, Gram-positive bacteria use modified oligopeptides (2) for intercellular communication (Ng and Bassler 2009; Asfour 2018; Kalia et al. 2018). In addition to these two major groups of signaling molecules, plant and human pathogens like *Xanthomonas campestris* and *Burkholderia cepacia* communicate using simple fatty acid derivatives (3) known as diffusible signal factors (DSFs) (Cheng et al. 2010; Zhang and Li 2016); finally a furanosylborate diester molecule (4) has been identified as an interspecies signal which is used by both Gram-negative and Gram-positive bacteria (Chen et al. 2002), and a quinolone (5) has been identified as a signaling molecule in *P. aeruginosa* (Zhang and Li 2016).



**Fig. 2** Quorum sensing system in bacteria. The quorum sensing system present differences between bacterial groups; however, these systems include three main components: 1) a synthase that

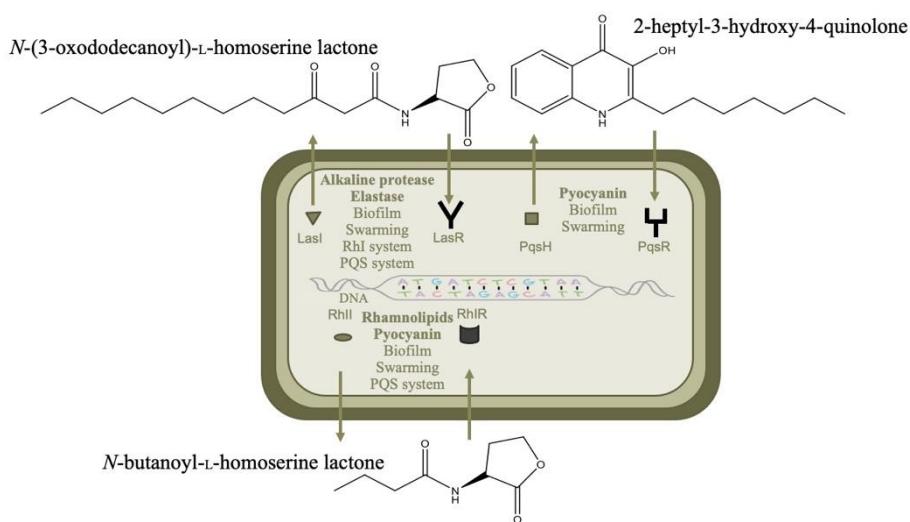
produces a freely diffusible chemical signal, 2) an autoinducer that accumulates extracellularly and reaches a threshold value, and 3) a receptor which interacts with the autoinducer to regulate gene expression.

Since it is now known that pathogenic bacteria use a wide range of signal molecules to communicate with each other and to regulate the expression of virulence factors (Muñoz Cazares et al. 2018), interfering with the synthesis, accumulation and detection of these autoinducers represents an attractive strategy to develop new antivirulence agents that can affect quorum sensing systems without affecting the viability of bacteria (Fleitas Martínez et al. 2019). Recently it has been reported that the expression of virulent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* is regulated by quorum sensing, in response to population density and environmental cues; these findings have resulted in this organism being adopted as a model for the identification and development of antivirulence agents (D'Angelo et al. 2018; Baldelli et al. 2020).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

The bacterium *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen that infects plant, animals and humans (Plotnikova et al. 2000; Rahme et al. 2000; Vandepitte et al. 2010). As a human pathogen, it is one of the major causes of nosocomial infections and has been classified by the WHO as a critical priority pathogen because of its intrinsic resistance to many antibiotics (Fazzeli et al. 2012; WHO 2017; Malgaonkar and Nair 2019). The pathogenic potential of *P. aeruginosa* can be attributed to its deployment of a wide arsenal of virulence factors such as elastases, proteases, rhamnolipids, pyocyanin, and biofilm formation, which are all regulated by quorum sensing (Klockgether et al. 2011; Malešević et al. 2011; Tahriouri et al. 2020), which consists of three interconnected systems (Fig.3 ), which are regulated hierarchically: LasI/LasR, RhII/RhIR, and PqsH/PqsR (Pappenfort and Bassler 2016; Malgaonkar and Nair 2019). The Las and Rhl systems produce, detect and respond to *N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone and *N*-butyryl-L-homoserine lactone, respectively, which trigger the synthesis of elastase, a hydrolytic enzyme involved in tissue necrosis and in the inhibition of the host's inflammatory response during infection (Pattnaik et al. 2018), proteases, enzymes that hydrolyze peptide bonds to degrade host tissues (Pattnaik et al. 2018), rhamnolipids, biosurfactants that allow movement by swarming and facilitates biofilm maturation and immune evasion (Banerjee et al. 2017; Zhou et al. 2017), and pyocyanin (**6**), a phenazine-type siderophore which reduces iron to a soluble and usable form for bacterial

nutrition, and induces oxidative stress killing competing microbes (Lau et al. 2004; Zhou et al. 2017) (Fig. 3). The third system, Pqs, specifically uses 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone as an autoinducer to indirectly produce pyocyanin (**6**) (Fig 3) (Castillo-Juarez et al. 2017; Rasko and Sperandio 2010). Finally, the joint activation of these systems gives the bacterial community the ability to form biofilm, a protective layer to resist antibiotics and colonize surfaces (Muñoz-Cazares et al. 2017), and to move on semi-solid and viscous surfaces, with a rapid and coordinated movement known as swarming (Husain et al., 2017; Overhage et al., 2007).



**Fig. 3** Quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*.

### Natural products with antivirulence properties

Natural products are secondary metabolites synthesized by algae, plants or microorganisms, which have been an important source for the discovery and design of antimicrobial drugs (Koh et al. 2013). However, the diversity and complexity of their structures give natural products a wide range of mechanisms of action, compared to conventional antibiotics (Adonizio et al. 2006; Vattem et al. 2007). Generally, natural products can inhibit quorum sensing systems by inhibiting the production of signal molecules, of signal diffusion by enzymes that degrade or modify the signaling molecule, and of signal detection (Teplitski et al. 2011; Vasavi et al. 2014; Grandclément et al. 2016; Bouyahya et al. 2017).

The first metabolites described as being capable of inhibiting quorum sensing in bacteria were a group of halogenated furanones (**7-10**) produced by the red alga *Delisea pulchra* (Manefield et al. 1999; Martinelli et al. 2004); these metabolites, because of their structural similarity to *N*-acyl homoserine lactones (**11,12**), act as antagonists displacing the autoinducers from their receptors (Boyer and Wisniewski-Dyé 2009; Proctor et al. 2020). Halogenated furanones have been shown to decrease virulence and bioluminescence in *Vibrio* spp. (Manefield et al. 2000). They inhibited swarming motility and the production of exoproteases in Gram-negative bacteria *Serratia liquefaciens* and in *P. aeruginosa* they alter protease and siderophore production (Proctor et al. 2020).

Presently, the main source of antivirulence agents are plants, especially those used in traditional medicine or consumed as foods (Koh et al. 2013; Nunes Silva et al. 2016; Pérez-López et al. 2020). Similarly, many extracts from leaves, roots, fruits, bark, stems and seeds have been tested to explore their potential to disrupt quorum sensing systems in pathogenic bacteria (Yarmolinsky et al. 2015; Bouyahya et al. 2017). Extracts of *Hypericum perforatum* L., Hypericaceae, a plant known as St. John's Wort and native to Europe that is traditionally used as antiseptic for wounds, burns and furuncles in many countries, are reported to block the signaling pathway in the Las and Rhl systems of *P. aeruginosa*, reducing the expression of its related genes (Doğan et al. 2019). Similarly, aqueous extracts of *Conocarpus erectus* L., Combretaceae, *Chamaesyce hypericifolia* (L.) Millsp., Euphorbiaceae, *Callistemon viminalis* (Sol. ex Gaertn.) G. Don, Myrtaceae, *Bucida buceras* L., Combretaceae, *Tetrazygia bicolor* (Mill.) Cogn., Melastomataceae and *Quercus virginiana* Mill., Fagaceae, medicinal plants traditionally used to treat respiratory and skin infections in south Florida, have shown antivirulence properties by decreasing both the concentration of the signaling molecules and gene expression in quorum sensing systems in *P. aeruginosa*, resulting in the inhibition of virulence factors like protease, elastase and biofilm formation (Adonizio et al. 2008).

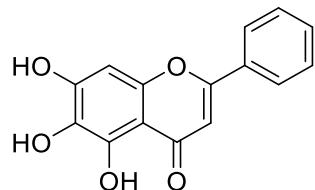
The dichloromethane extracts of three species of the genus *Tillandsia* from the Bromeliaceae, *Tillandsia recurvata* (L.) L., *Tillandsia schiedeana* Steud. and *Tillandsia fasciculata* Sw., a group of medicinal plants used in Mexico to treat conditions such as bronchitis, gastritis, burns, wounds and skin affections, have also shown antivirulence properties by reducing protease activity, biofilm formation and swarming in *P. aeruginosa*. The phytochemical composition of the extracts evaluated showed the presence of unidentified flavonoids and terpenoids as major components, which could be related to the

ability of these species to inhibit factors related to adhesion and dispersion in this bacterium (Pérez-López et al. 2020). Similarly, fractions rich in terpenes and sterols from the bark extracts of *Ceiba aesculifolia* (Kunth) Britten and Baker f. and *Ceiba pentandra* (L). Gaertn, Malvaceae, were found to attenuate virulence factors in *P. aeruginosa* (Muñoz-Cázares et al. 2018).

Curcumin (**13**), the major constituent of turmeric (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae), a spice traditionally used in India as an insect repellent and to treat bacterial infections, has been reported to inhibit biofilm formation and production of pyocyanin, proteases and elastases, by inhibiting the synthesis of acyl homoserine lactones in *P. aeruginosa* (Rudrappa and Bais 2008). Similarly, malabaricone C (**14**) isolated from the bark extract of *Myristica cinnamomea* King, Myristicaceae, a plant traditionally used in the folk medicine of Malaysia because of its antimicrobial activity, has been reported to inhibit pyocyanin production and biofilm formation in *P. aeruginosa* (Chong et al. 2011). Finally, a prolamin called hordenine (**15**), isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. Poaceae), significantly reduced gene expression regulated by quorum sensing in *P. aeruginosa* PAO1, acting as an antagonist of the signaling molecules of this bacterium (Zhou et al. 2018).

Since many pathogenic bacteria like *P. aeruginosa* form microbial aggregates called biofilms to protect themselves from antibiotics and the host's immune system (Maiden et al. 2019; Pérez-López et al. 2020), the search for bioactive metabolites that disrupt this protective barrier, either by affecting its structure, its maturation, or causing its disintegration, has intensified (Fleitas Martínez et al. 2019). Recently, the aqueous extract of *Herba patriniae*, which includes two medicinal plants (*Patrinia scabiosaeefolia* Fisch and *Patrinia villosa* Juss., Caprifoliaceae) used in traditional Chinese medicine (Gong et al. 2021), was reported to affect the formation and maturation of biofilm in *P. aeruginosa* by inhibiting the production of exopolysaccharides, key elements for the formation of these structures (Fu et al. 2017; Chong et al. 2018). Alternatively, subinhibitory concentrations of baicalein (**16**), a major constituent of the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi, Lamiaceae, a plant used in traditional Chinese medicine to treat bacteria-induced diarrhea, have been reported to affect bacterial adhesion, as well as alginate and rhamnolipid production in *P. aeruginosa*, leading to the detachment of the biofilm structure. In this case, **16** has the ability to globally inhibit quorum sensing, since it affects the synthesis and detection of the diffusible signal

molecules *N*-3-oxododecanoyl-homoserine lactone and *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (Luo et al., 2016).



16

The leaves of *Psidium guajava* L., Myrtaceae, commonly known as guava, is commonly used worldwide to treat diarrhea, dysentery and cholera because of its antimicrobial properties (Obbina et al. 2008; Cheruiyot et al. 2009); the flavonoid fraction in the leaves of the plant, which has been related to its antimicrobial activity, has been shown to affect, at subinhibitory concentrations, biofilm formation and production of virulence factors in *P. aeruginosa* (Vasavi et al. 2014). The major components in this fraction, identified as quercetin (**17**) and quercetin-3-O-arabinoside (**18**), have also shown antivirulence activity (Vasavi et al. 2014). A tannin fraction from the leaf extract of *Terminalia catappa* L., Combretaceae, commonly called almond in Asia, demonstrated capacity to inhibit biofilm maturation in *P. aeruginosa* as well (Taganna et al. 2011). Subinhibitory concentrations of extracts from garlic (*Allium sativum* L., Amaryllidaceae), widely known for its antimicrobial and antifungal activity (Truchado et al. 2015), affect biofilm formation in *P. aeruginosa* and makes it susceptible to antibiotics (Jakobsen et al. 2012). Ajoene (**19**) has been identified as the bioactive metabolite responsible for this effect, since it interferes with signal detection in the bacterium (Rasmussen et al. 2005). Similarly, subinhibitory concentrations of parthenolide (**20**), a sesquiterpenolactone isolated from *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip., Asteraceae, commonly known as feverfew, inhibited the production of virulence factors and biofilm formation in *P. aeruginosa* PAO1, as a result of the interaction of parthenolide with the receptor of the LasR system (Kalia et al. 2018).

### Future directions

In addition to plants, natural ecosystems include a wide diversity of coexisting microorganisms that produce and use secondary metabolites during their constant

interactions for cooperation, competition or defense and survival (Kalia 2013; Braga et al. 2016). Some of these microbial metabolites were the major source for the discovery of antibiotics in the last decades (Genilloud 2019); however, the emergence of resistant bacteria led to the search of microbial products with new mechanisms of action, including the inhibition of quorum sensing. In this case, the diketopiperazines cyclo-L-proline-L-tyrosine (**21**) and N-(2'-phenylethyl)-isobutyramide (**22**), isolated from the bacteria *Bacillus cereus* and *Halobacillus salinus*, respectively, are reported to inhibit quorum sensing systems by affecting the signal detection in *P. aeruginosa* (Campbell et al. 2009; Teasdale et al. 2011). Similarly, the diketopiperazine cyclo(Trp-Ser) (**23**), isolated from the marine bacterium *Rheinheimera aquimaris* QSI02, acts as an antagonist of signal molecules in *P. aeruginosa*, decreasing the production of pyocyanin and inhibiting both the elastase activity and the formation of biofilm in *P. aeruginosa* PAO1 (Sun et al. 2016). Alternatively, hydrocinnamic acid (**24**), obtained from cultures of *Enterobacter xiangfangesis* PUFSTI26, reduces biofilm formation, pyocyanin production and motility in *P. aeruginosa* MTCC424, by antagonizing the signaling molecule in the Las system (Sharma et al. 2019). The 2-benzenedicarboxylic acid (**25**), isolated from the Gram-negative bacterium *Delftia tsuruhatensis* SJ011 obtained from the rhizosphere of *Cyperus laevigatus*, inhibits the production of pyocyanin, rhamnolipids and proteases, and affects motility and bacterial adherence, affecting biofilm formation in two isolates of *P. aeruginosa* (PAO1 and PAH) (Singh et al. 2017).

Similarly, the mycotoxins patulin (**26**) and penicillic acid (**27**), produced by fungi of the *Penicillium* and *Aspergillus* genera, inhibit biofilm formation in *P. aeruginosa* (Kalia 2013; Jakobsen et al. 2012); patulin (**26**) and emodin (**28**), produced by the phytopathogenic fungus *Plectosphaerella cucumerine* that causes rotting in different fruits, affect the expression of virulence and resistance factors in *P. aeruginosa* PAO1 (Zhou et al. 2017). Finally, the endophytic fungi *Phialocephala fortinii* and *Melinomyces variabilis*, belonging to the *Basidiomycete* and *Ascomycete* lineages, produce lactonase enzymes which can degrade the *N*-acyl homoserine lactones by hydrolysis of the lactone bond (Uroz and Heinonsalo 2008).

### 1.2.3 Conclusion

The use of antivirulence agents provides a novel method for treating infections caused by resistant microbial strains and quorum sensing represents a useful drug target since it regulates the pathogenicity of numerous bacterial species. To date, several natural products from plants and microorganisms inhibit the expression of virulence and resistance factors regulated by quorum sensing, particularly against *P. aeruginosa*. The structural diversity of these natural products offers an opportunity to develop new antimicrobials that, in attenuating bacterial pathogenicity rather than affecting cell viability, could delay the emergence of resistance.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, la resistencia bacteriana es uno de los principales problemas de salud que afecta a la humanidad. Millones de seres humanos se enfrentan diariamente a infecciones y no siempre se cuenta con los medicamentos para poder combatirlas. Actualmente, las denominadas terapias antivirulencia representan una alternativa viable para el tratamiento y control de infecciones bacterianas, ya que emplean moléculas que inhiben la patogenicidad bacteriana en lugar de su viabilidad. Teniendo en cuenta lo anterior, las plantas utilizadas en la medicina tradicional Maya, así como metabolitos producidos por *Alternaria dauci*, representan una fuente potencial de productos con propiedades antivirulencia, que permitirán combatir infecciones bacterianas, reduciendo el desarrollo de resistencia.

## 1.4 HIPÓTESIS

Considerando el uso de plantas para el tratamiento de infecciones microbianas en la medicina tradicional Maya, así como el aislamiento de metabolitos antibacterianos a partir del cultivo de *Alternaria dauci*, se espera que extractos, fracciones semipurificadas y/o productos puros tengan actividad antivirulencia.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo general

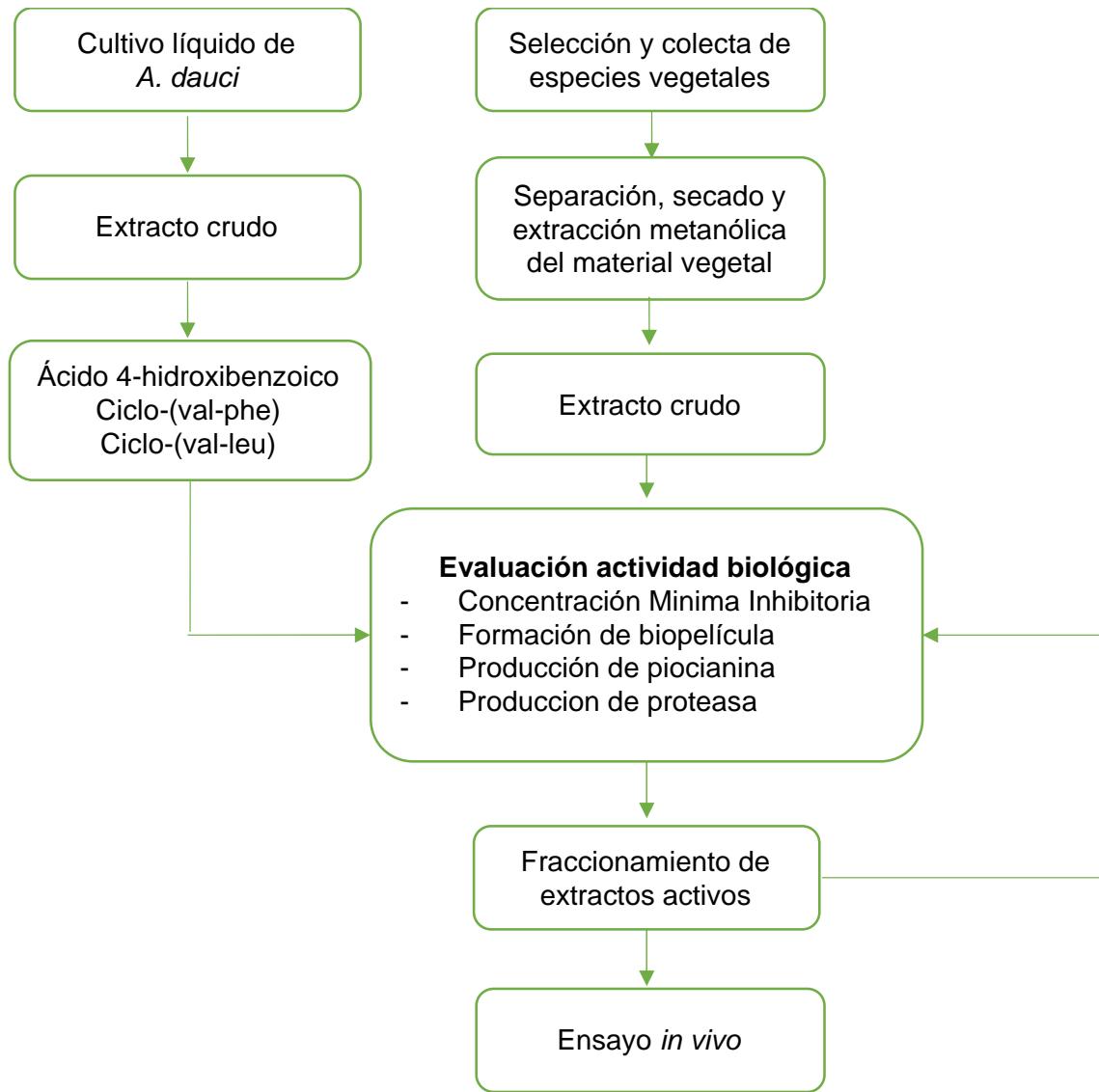
Detectar agentes naturales que inhiban la producción de factores relacionados con la patogenicidad en el modelo de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Seleccionar plantas de la medicina tradicional Maya usadas y reconocidas por sus propiedades antibacterianas.
- Analizar las propiedades antivirulencia de los extractos crudos, fracciones semipurificadas y/o productos puros de las plantas seleccionadas, mediante la inhibición de los principales factores de virulencia regulados por la percepción de quórum en *P. aeruginosa*.
- Analizar las propiedades antivirulencia de metabolitos producidos por *A. dauci*, mediante la inhibición de los principales factores de virulencia regulados por la percepción de quórum en *P. aeruginosa*.
- Evaluar el efecto de las fracciones semipurificadas y/o productos puros con mayor actividad sobre la patogenicidad de *P. aeruginosa* en un modelo *in vivo*.

## 1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos planteados, se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental:



**Figura 1.1** Diseño experimental

En el capítulo II de este trabajo, se presenta la información de las plantas seleccionadas para el estudio. Se describe la obtención de los extractos crudos orgánicos y el fraccionamiento, así como la evaluación de la actividad antivirulencia empleando el modelo de *P. aeruginosa*. En el capítulo III se relata la evaluación biológica de metabolitos aislados de un cultivo de *A. dauci*.

## 2 CAPITULO II

### ACTIVIDAD ANTIVIRULENCIA DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL MAYA

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

El uso de plantas dentro de la medicina tradicional, sigue vigente en muchas regiones del mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud entre el 70 y 95% de las poblaciones en países en desarrollo utilizan remedios que contienen como ingredientes activos partes de plantas, para la prevención, mejora o tratamiento de enfermedades físicas o mentales (WHO, 2011).

Diversas especies vegetales presentan atributos medicinales, uno de los más importantes es su actividad antibacteriana, la cual se atribuye a la variedad de metabolitos que producen, ya que poseen un efecto bactericida o bacteriostático como mecanismo de acción. Durante años, la búsqueda de compuestos antibióticos fue considerada como la principal estrategia para combatir infecciones bacterianas, sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos ha impulsado la investigación de nuevas opciones terapéuticas.

El desarrollo de agentes antivirulencia, se ha planteado como un enfoque alternativo o complementario a los antibióticos, ya que buscan atenuar la patogenicidad de las bacterias, en lugar de interferir en su viabilidad, minimizando la presión selectiva que conduce con el tiempo a la aparición de cepas resistentes (Roy *et al.*, 2011). Esta terapia antivirulencia tiene como objetivo inhibir la comunicación bacteriana o PQ, ya que es el principal mecanismo que regula la liberación de determinantes de virulencia, incluyendo motilidad, formación de biopelículas y producción de toxinas en especies bacterianas patógenas como *P. aeruginosa* (Doğan *et al.*, 2019; Aliyu *et al.*, 2016).

*P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa graves problemas a nivel hospitalario, debido a su alta capacidad para infectar pacientes inmunosuprimidos, así como de generar resistencia a los antibióticos (Pang *et al.*, 2019). En esta bacteria la expresión de varios factores de virulencia como piocianina, pioverdina, rhamnolípidos, y la formación de biopelículas está controlada por los sistemas de percepción de quórum LasIR, RhlIR y PqsHR, que le permiten detectar la densidad de la población y controlar la expresión génica

a través de moléculas de señalización de tipo homoserín lactona y quinolonas (Adonizio *et al.*, 2008).

Hasta la fecha se han identificado agentes antivirulencia de origen natural y sintético que atenúan la patogenicidad de *P. aeruginosa*, siendo los productos naturales derivados de plantas medicinales y alimenticias, la principal fuente de metabolitos que inhiben la PQ al interferir con la unión de las moléculas de señalización y sus receptores, inactivando la expresión de factores de virulencia (Bodede *et al.*, 2018; Koh *et al.*, 2013). Sin embargo, el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades antivirulencia terapéuticamente efectivos y seguros aún requiere de una mayor exploración, debido a que el número de especies investigadas sigue siendo mínimo en contraste con la diversidad de plantas existentes (Pérez-López *et al.*, 2020; Husain *et al.*, 2017).

En México se han descrito entre 18.000 y 30.000 especies vegetales, de las cuales cerca de 4.000 son empleadas en la medicina tradicional, eje fundamental de su riqueza cultural, por lo que su estudio y conocimiento se ha preservado por años a través de las diferentes culturas que se establecieron en el país (Méndez-González *et al.*, 2014). La península de Yucatán, cuenta con alrededor de 2300 especies de plantas (Durán García *et al.*, 2000; Pulido y Serralta, 1993), de las cuales 812 especies se utilizan en la medicina tradicional Maya para tratar diversas enfermedades, destacando su uso para curar infecciones microbianas, además de asistir afecciones dérmicas y curar heridas (Hernández-Bolio *et al.*, 2019; Rodríguez García *et al.*, 2016; Méndez-González *et al.*, 2014; Moo-Puc *et al.*, 2013).

Aunque se ha documentado la actividad antimicrobiana de extractos y metabolitos de diferentes familias químicas provenientes de plantas utilizadas en la medicina tradicional Maya (Hernández-Bolio *et al.*, 2019), no se ha investigado la propiedad alterna de inhibir la expresión de factores de virulencia en bacterias patógenas. Debido a lo anterior, esta investigación representa el primer estudio dirigido a evaluar el potencial antivirulencia de plantas medicinales utilizadas en la Península de Yucatán contra *P. aeruginosa*.

## 2.2MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal

Se seleccionaron 19 plantas (Tabla 2.1), la mayoría nativas en México, usadas para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos y para la curación de heridas, quemaduras o dermatitis. Las diferentes especies vegetales se recolectaron en los municipios de Sotuta ( $20^{\circ} 33' 18.5''$  N,  $89^{\circ} 0.2' 01.9''$  O;  $20^{\circ} 32' 00''$  N,  $0.89^{\circ} 0.2' 31.2''$  O;  $20^{\circ} 31' 01.7''$  N,  $88^{\circ} 56' 40.0''$  O), Telchac Puerto ( $21^{\circ} 16' 44.7''$  N  $89^{\circ} 19' 14.3''$  O;  $21^{\circ} 15' 0.11''$  N  $89^{\circ} 50' 18.6''$  O;  $21^{\circ} 15' 04.4''$  N,  $89^{\circ} 49' 19.66''$  O;  $21^{\circ} 14' 55.8''$  N,  $89^{\circ} 50' 18.8''$  O), Tixcacaltuyub ( $20^{\circ} 29' 56.3''$  N,  $88^{\circ} 55' 02.8''$  O), Libre unión ( $20^{\circ} 29' 56.3''$  N,  $88^{\circ} 55' 02.8''$  O) y Sierra Papacal ( $21^{\circ} 12' 26''$  N,  $89^{\circ} 72' 63''$  O) en el estado de Yucatán y en el municipio de Xpujil ( $18^{\circ} 30' 23''$  N,  $89^{\circ} 23' 23''$  O), ubicado en el estado de Campeche, durante los meses de noviembre de 2018 y marzo de 2019. El técnico Gabriel Rolando Dzib identificó cada espécimen y un ejemplar de cada especie se depositó en el Herbario de la Unidad de recursos naturales-CICY con su respectivo número de registro.

### 2.2.2 Procedimientos generales

Para los diferentes procesos de extracción y purificación a partir del material vegetal, se utilizaron disolventes grado técnico destilados en el laboratorio y reactivos grado analítico (Sigma). El disolvente se eliminó a presión reducida, empleando un evaporador (Buchi R-300) equipado con un baño de agua a  $38^{\circ}\text{C}$ . El análisis y seguimiento de los extractos y fracciones se llevó a cabo por cromatografía en capa delgada (CCD), empleando cromatoplacas de aluminio impregnadas gel de sílice (Merck). Cada cromatograma se secó y sumergió en una solución de ácido fosfomolíbdico al 5%, individualmente, cada placa se secó y calentó con una pistola de aire caliente, durante 60-90 segundos o hasta visualizar los componentes. Para purificar las muestras por cromatografía líquida al vacío, se empleó una columna de 5 cm de diámetro y la muestra se adsorbió a gel de sílice de 70-230 malla (Merck).

**Tabla 2.1** Plantas seleccionadas

Número de herbario	Familia	Nombre científico	Origen	Nombre común/maya	Parte utilizada	Usos tradicionales
70881	Annonaceae	<i>Mosannonia depressa</i> (Baill.) <i>Chatrou</i>	Nativa	-/boox éelemuy, éelemuy, chakni', ch'ulumay, sak éelemuy.	Raíz	Infección en el riñón, antiséptico, gonorrea, leucorrea. (Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 1996).
70893	Asteraceae	<i>Acmella pilosa</i> R.K. Jansen	Nativa	Tripa de gallina / -	Tallo	Aliviar dolor e infección en muelas, anemia. (Zapata- Estrella <i>et al.</i> , 2014).
	Asteraceae	<i>Parthenium hysterophorus</i>	Nativa	Escobilla, altamisa, hierba amargosa / -	Hojas	Cicatrizante de heridas y granos, hongos y viruela. (Méndez-González <i>et al.</i> , 2014).
70887	Burseraceae	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.	Nativa	Copal, cuahuijote, archipín de México / chakaj	Corteza	Fiebre, granos, cortadas, dolor de cabeza, fiebre intestinal. (Méndez- González <i>et al.</i> , 2014).

70883	Convolvulaceae	<i>Ipomoea carnea</i> subsp. <i>carnea</i> Jacq.	Nativa	Campanilla morada / <i>ke'elil, choko kat</i>	Hojas	Cicatrizante en heridas de diabéticos, hongos, llagas, sarna y verrugas. (Méndez-González <i>et al.</i> , 2014)
70888	Convolvulaceae	<i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br.	Nativa	Riñonera / -	Hojas	Infecciones urinarias, úlceras, forúnculos disentería y tuberculosis. (Escobedo-Martínez y Pereda-Miranda, 2007).
70879	Ebenaceae	<i>Diospyros anisandra</i> S.F. Blake	Nativa	- / <i>k'aakalche', k'ab che', xanob che'</i>	Hojas	Afecciones dermatológicas, pústulas, sarna e inflamación. (Ankli <i>et al.</i> , 2002).
70882	Euphorbiaceae	<i>Jatropha gaumeri</i> Greenm.	Nativa	- / <i>pomol che'</i>	Raíz	Diarrea, disentería, fuego labial, heridas en la boca, infección en la garganta, llagas. (Méndez-González <i>et al.</i> , 2014).

---

70891	Fabaceae	<i>Tephrosia cinerea</i> (L.) Pers.	Nativa	Sulché, mañanitas, frijolillo, zulché / <i>bu'ul beech'</i>	Hojas	Infecções, úlceras, vómito y diarrea. (Dias <i>et al.</i> , 2014).
70889	Fabaceae	<i>Canavalia rosea</i> (Sw.) DC.	Nativa	Frijolillo, haba de mar / -	Hojas	Tuberculosis, lepra, curación de quemaduras, infecciones entéricas, trastornos de piel. (Mendoza-González <i>et al.</i> , 2014).
70877	Lamiaceae	<i>Ocimum campechianum</i> Mill.	Native	Albahaca monte / kakaltuum	de Hojas x'	Cicatrizante de granos y heridas, disentería, gastritis, heridas en diabéticos, hongos y viruela. (Méndez-González <i>et al.</i> , 2014).
70886	Malvaceae	<i>Ceiba aesculifolia</i> (Kunth) Britten & Baker f.	Nativa	Algodoncillo / pín	Corteza	Cicatrizante de heridas en diabéticos, úlceras y dermatitis. (Rodríguez García <i>et al.</i> , 2016).

---

70885	Menispermaceae	<i>Cissampelos pareira L.</i>	Nativa	Butua, barba de Raíz viejo / <i>sak xiiw, xok' ab aak', xowen aak'</i> .	Diarrea, disentería, dolor de estómago, gastritis, heridas de diabéticos. (Méndez-González <i>et al.</i> , 2014).
70892	Primulaceae	<i>Bonellia flammea</i> (Millsp. ex Mez) B. <i>Stahl &amp; Kallersjo</i>	Endémica	-/ chak <i>sik'iin</i> , Raíz <i>sik'iin k'aax</i>	Afecciones dermatológicas. (Moo-Puc <i>et al.</i> , 2013).
70878	Rhamnaceae	<i>Colubrina greggii</i> S. Watson.	Nativa	Manzanita / Raíz <i>puukin, tsúulub máay, ya'ax puukin</i>	Disentería, curar abscesos, ulceraciones y tuberculosis. (Peña-Rodríguez <i>et al.</i> , 2011; Fernández Nava, 2010).
70880	Rubiaceae	<i>Hamelia patens</i> Jacq.	Nativa	Coralillo, cordoncillo, viruela / <i>chak took', k'anán, kanan joolnaj iib.</i>	Granos en el cuerpo, salpullido, heridas en la piel, cortadas y llagas, cicatrizante. (Méndez-González <i>et al.</i> , 2014).

---

70884	Scrophulariaceae	<i>Capraria biflora L.</i>	Nativa	Claudiosa blanca/ <i>boox</i>	Raíz	Infección vaginal, granos en el cuerpo. (Rodríguez García <i>et al.</i> , 2016).
70890	Solanaceae	<i>Solanum donianum Walp.</i>	Nativa	Olol / <i>chal che'</i> , Hojas <i>k'aaxil kux, puuch</i> <i>uuk'</i>		Afecciones de piel. (Ankli <i>et al.</i> , 2002).
	Solanaceae	<i>Solanum hirtum</i> Vahl.	Nativa	Tomatillo, anginaria / <i>put</i> <i>baalam</i>	Hojas	Dolor de garganta, llagas e infecciones en boca y garganta, paperas. (Méndez-González <i>et al.</i> , 2014).

---

### 2.2.3 Obtención de extractos vegetales

Se separaron hojas, tallo, raíz y corteza, según corresponde a lo reportado para cada especie y se secaron durante 72 horas en horno eléctrico. Posteriormente, las cortezas y las raíces se pulverizaron en un molino eléctrico (Pagani 1520), mientras que las hojas se trituraron manualmente.

De cada especie, se pesaron 100 gramos de material seco, el cual se maceró con metanol a temperatura ambiente, tres veces por períodos de 48 horas cada uno. El solvente se eliminó a presión reducida y una vez obtenidos los extractos secos, se determinó el rendimiento. A partir de estos extractos crudos, se prepararon soluciones stock a una concentración de 100 y 400 mg mL<sup>-1</sup> en dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente cada uno se diluyó en agua destilada estéril hasta una concentración de 10 y 80 mg mL<sup>-1</sup>, finalmente se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### 2.2.4 Partición líquido-líquido del extracto metanólico de *C. greggii*

El extracto crudo de la raíz de *C. greggii* (**MC-8**) se suspendió en una mezcla de agua destilada y metanol 3:2 (v/v). La solución resultante se fraccionó sucesivamente entre hexano, acetato de etilo y una solución saturada de butanol para producir las correspondientes fracciones de baja (**MC-8A**), media (**MC-8B**), alta polaridad (**MC-8C**) y el residuo acuoso (**MC-8D**) los rendimientos se observan en el anexo 1. A partir de cada fracción se preparó una solución de 100 mg mL<sup>-1</sup> en DMSO para los ensayos.

### 2.2.5 Separación en columna de fracción MC-8C

La fracción de alta polaridad MC-8C se separó por cromatografía líquida al vacío, utilizando una columna de vidrio de 5 cm de diámetro para eluir un gradiente de CHCl<sub>2</sub>:MeOH (100:0-90:10), seguida de una elución isocrática de CHCl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (14:7:1) y de CHCl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (10:10:1), de la cual se obtuvieron 15 fracciones (Anexo 2).

### 2.2.6 Análisis por cromatografía de alta resolución (HPLC)

La fracción MC-21G se analizó en un equipo cromatográfico HPLC (Waters). Se utilizó un método isocrático con una mezcla de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N:H<sub>2</sub>O, con un tiempo de corrida de 50 minutos

con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El volumen total inyectado fue de 20 µL por muestra. Se utilizó una columna de fase reversa C-18 Xselect HSS (250 mm x 4.6 mm x 5µm).

### **2.2.7 Evaluación de la actividad antivirulencia en *P. aeruginosa***

#### **2.2.7.1 Descripción de cepas utilizadas y condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* PA14WT, la cual fue donada por el Dr. Rodolfo García Contreras del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México. La cepa PA14 se almacenó en medio Luria-Bertani (LB) con glicerol a -80°C. Al inicio de cada ensayo, se sembraron las células bacterianas en placas de agar LB durante 24 horas. A partir de colonias aisladas, se iniciaron cultivos en 5 mL de medio líquido LB, por 16-18 horas a 37°C y 200 rpm. Las mediciones del crecimiento bacteriano se realizaron utilizando un espectrofotómetro (iMark, Biotek) a 655 nm.

#### **2.2.7.2 Concentración Míma Inhibitoria (CMI)**

Este ensayo se realizó siguiendo el método de microdilución en caldo, descrito por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), con algunas modificaciones (Wiegand *et al.*, 2008). Se prepararon diluciones seriadas 1:2 de los extractos o fracciones a probar, utilizando una concentración inicial de 50 mg mL<sup>-1</sup> para los extractos crudos, 5 mg mL<sup>-1</sup> para las fracciones y 1 mg mL<sup>-1</sup> para las subfracciones. Posteriormente, se agregaron, 50 µL de un inóculo bacteriano de PA14 ajustado a una concentración inicial de 1x10<sup>6</sup> UFC en cada pozo. Como control positivo se utilizó gentamicina a una concentración de 2.66 mg mL<sup>-1</sup> y como blanco agua destilada estéril. Las placas se mantuvieron 24 horas a 37°C en estático. Pasado el tiempo de incubación, se definió la CMI como la menor concentración de extracto a la cual se inhibe visiblemente el crecimiento bacteriano (Wiegand *et al.*, 2008). Para corroborar la viabilidad bacteriana, se empleó el método colorimétrico MTT, el cual se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto azul (Moo-Puc *et al.*, 2013). Por lo anterior, se adicionaron 5 µL de MTT a una concentración final de 0.25 mg mL<sup>-1</sup> a cada pozo y después de 2 horas se verificó el cambio de color.

### **2.2.7.3 Inhibición de los factores de virulencia en *P. aeruginosa***

Cultivos de PA14 crecidos durante 16-18 horas se ajustaron en medio líquido LB a una turbidez inicial de  $\text{DO}_{655} \sim 0.05$ . Posteriormente a cada cultivo se adicionó el extracto o fracción a evaluar a una concentración final de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  para los extractos crudos,  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  para las fracciones y de  $150$  a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  para las fracciones semipurificadas. Los cultivos se incubaron por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  con o sin agitación según corresponda. Como control positivo (C+) se utilizó el extracto de raíz de *Curcuma longa* a una concentración de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  y como blanco (B) agua destilada o DMSO. Para cada ensayo se incluyeron al menos tres cultivos independientes.

#### **2.2.7.3.1 Cuantificación producción de proteasas**

La actividad proteolítica se determinó utilizando placas de agar leche que contenían 5 g de leche en polvo sin grasa (Svelty®) y 0.5 g de agar en 50 mL de agua destilada. En cada placa se hicieron pozos de 4 mm de diámetro en los cuales se dispensaron 30  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes y se incubó por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . La degradación de proteínas se observó mediante una zona clara alrededor de los pozos (Lee *et al.*, 2012). Para calcular el porcentaje de inhibición se tomó como el 100% el área de degradación del control.

#### **2.2.7.3.2 Cuantificación producción de piocianina**

Para cuantificar la piocianina se siguió el método de extracción descrito por Essar *et al.* (Essar *et al.*, 1990). Se tomaron 800  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante y se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo, posteriormente los viales se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm. Se transfirieron 300  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica resultante de color azul, a un tubo nuevo y se adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 0.1N. De la fase ácida de color rosado se tomaron 650  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 650  $\mu\text{L}$  de agua destilada para hacer la medición espectrofotométrica a 520 nm utilizando como blanco ácido clorhídrico 0.1N. Para calcular el porcentaje de inhibición, la absorbancia del control se tomó como el 100% de la producción de piocianina.

### 2.2.7.3.3 Formación de biopelícula

La evaluación de la formación de la biopelícula se llevó a cabo mediante la tinción con cristal violeta utilizando placas de 96 pozos de poliestireno (O'Toole, 2011). Se ajustaron los precultivos de PA14 a una turbidez inicial de DO<sub>655</sub> ~0.05 y se adicionaron 200 µL en cada pozo con los extractos o fracciones a evaluar. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas, sin agitación. Pasado el tiempo de incubación, se determinó el crecimiento bacteriano utilizando un espectrofotómetro (iMark, Biotek) a 655 nm, el medio de cultivo fue desechado y cada pozo se lavó tres veces con agua destilada. Una vez secas las placas, se añadieron 200 µL de una solución de cristal violeta al 0.1% y se incubaron por 20 minutos. Finalmente, las placas se lavaron 3 veces con agua destilada y el colorante se solubilizó con 200 µL de metanol para realizar la lectura a 595 nm. La formación de biopelícula se normalizó por el crecimiento (dividido por el DO<sub>655</sub> nm de los cultivos) y para calcular el porcentaje de inhibición, se tomó como el 100% de formación de biopelícula la absorbancia del control.

### 2.2.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Para determinar las diferencias estadísticas, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El nivel de significancia se estableció en  $p < 0.0001$  con un intervalo de confianza del 95% usando el software GraphPad Prism 6.

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1 Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos vegetales en *P. aeurginosa*

Los 19 extractos evaluados no tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de PA14 a la concentración más alta utilizada (Tabla 2.2), por lo que para ensayos posteriores se estableció trabajar con una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 2.2** Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de las plantas evaluadas

<b>Especie vegetal</b>	<b>Clave</b>	<b>CMI (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
<i>M. depressa</i>	MD	>50
<i>A. pilosa</i>	AP	>50
<i>P. hysterophorus</i>	PH	>50
<i>B. simaruba</i>	BS	50
<i>I. carnea</i>	IC	>50
<i>I. pes-caprae</i>	IP	>50
<i>D. anisandra</i>	DA	50
<i>J. gaumeri</i>	JG	>50
<i>T. cinerea</i>	TC	>50
<i>C. rosea</i>	CR	50
<i>O. campechianum</i>	OC	>50
<i>C. aesculifolia</i>	CA	50
<i>C. pareira</i>	CP	50
<i>B. flammea</i>	BF	50
<i>C. greggii</i>	CG	50
<i>H. patens</i>	HP	50
<i>C. biflora</i>	CB	>50
<i>S. donianum</i>	SD	50
<i>S. hirtum</i>	SH	50

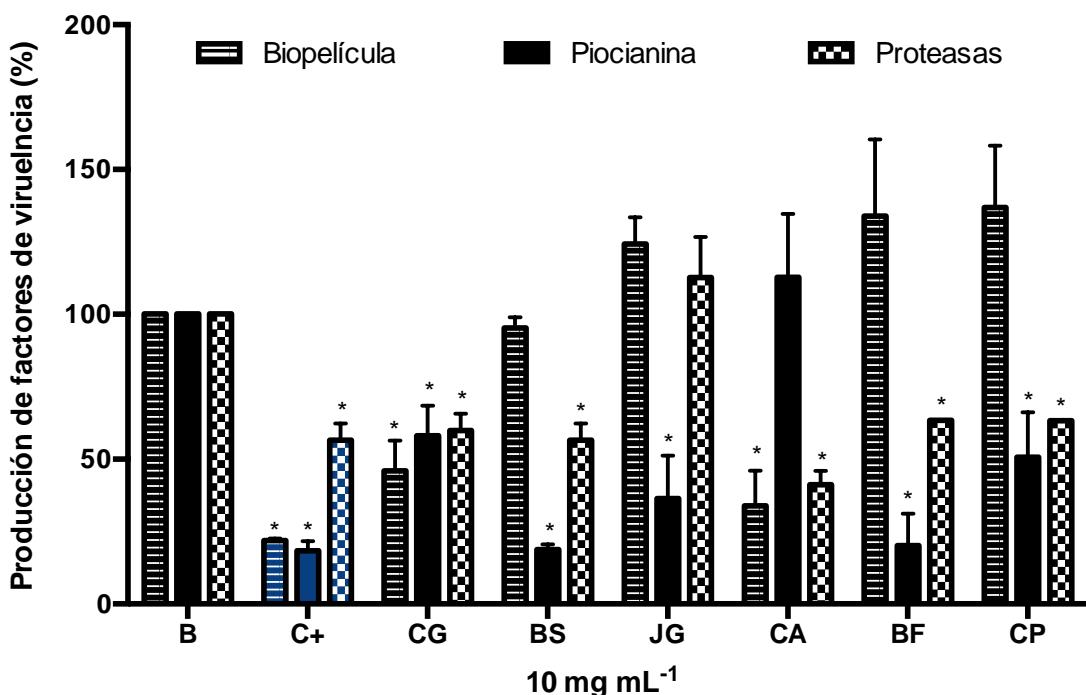
CMI = Concentración Mínima Inhibitoria

### 2.3.2 Detección e identificación de extractos con propiedades antivirulencia

La actividad antivirulencia de los extractos crudos de las plantas medicinales seleccionadas, se evaluó midiendo la inhibición de la producción de piocianina, proteasas y la formación de biopelícula, dado que se ha demostrado que estos factores de virulencia solo se expresan mediante la PQ y son esenciales en el proceso infeccioso de *P. aeruginosa*.

Se detectó que los extractos *C. aesculifolia* (CA) y *C. greggii* (CG) inhiben notablemente la formación de biopelícula de PA14 entre un 65-75 % (Figura 2.1), sin afectar el crecimiento bacteriano. Los extractos de *B. simaruba* (BS), *J. gaumeri* (JG), *C. pareira* (CP) y *B. flammea* (BF), inhiben la producción de piocianina, con valores cercanos al control positivo (81%) (Figura 2.1). La mayoría de los extractos demostraron tener la facultad de inhibir la producción de proteasas en *P. aeruginosa* (Anexo 3). Hasta el momento, solo *C. aesculifolia* cuenta con un reporte previo de actividad antivirulencia contra *C. violaceum* y *P. aeruginosa*, sin que se hayan purificado e identificado los metabolitos activos (Muñoz-Cazares *et al.*, 2018).

Los extractos de *P. hysterophorus*, *I. carnea* y *S. donianum* no mostraron un efecto inhibidor, por el contrario, estimularon la producción de los factores de virulencia evaluados, principalmente la formación de biopelícula (Anexo 3).



**Figura 2.1** Efecto de los extractos metanólicos de las plantas con mayor actividad registrada sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Los datos son un promedio de tres experimentos independientes. Las columnas muestran media ± desviación estándar. \* = p < 0.0001 ANOVA de un factor.

De los 19 extractos de plantas que se evaluaron, seis tuvieron propiedades antivirulencia: *C. greggii* (Rhamnaceae), *B. simaruba* (Burseraceae), *J. gaumeri* (Euphorbiaceae), *C. aesculifolia* (Malvaceae), *B. flammea* (Primulaceae) y *C. pareira* (Menispermaceae), lo que podría contribuir a su eficiencia y uso tradicional para el tratamiento de infecciones, pudiendo ser el principal mecanismo de acción, ya que la mayoría de los extractos no mostraron tener un efecto bactericida a la concentración más alta utilizada (Tabla 2.2), contrario a lo reportado previamente. Los extractos de las plantas activas, presentan una actividad bactericida principalmente contra bacterias Gram-positivas, por ejemplo, *C. greggii* inhibe el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* (Salazar-Aranda *et al.*, 2011; Molina-Salinas *et al.*, 2007), mientras que *B. simaruba* tiene efecto bactericida contra cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a la meticilina (Yasunaka *et al.*, 2005). A su vez, *J. gaumeri* y *C. aesculifolia* tienen efecto sobre *Bacillus subtilis* (Canales *et al.*, 2005; Sánchez-Medina *et al.*, 2001). En el caso de *B. flammea* solo

se ha reportado su actividad antifúngica (García-Sosa *et al.*, 2011; Rodríguez-García *et al.*, 2019).

Debido a que en estos estudios solo se evalúo el efecto antimicrobiano de las plantas seleccionadas, otros mecanismos de acción para contrarrestar infecciones no han sido evaluados. Los extractos activos, presentaron una inhibición diferencial de los factores de virulencia en *P. aeruginosa*, la producción de piocianina y proteasas se inhibió en presencia de los extractos de *J. gaumeri*, *B. flammea* y *C. pareira*, lo cual podría ser útil para eliminar en sus primeras etapas al proceso de infección (Winstanley *et al.*, 2009). Aunque los extractos *C. greggii* y *C. aesculifolia* también tuvieron actividad sobre la producción de piocianina, evitaron la formación de biopelícula alrededor de un 60%, efecto que podría contribuir a impedir el establecimiento de infecciones crónicas y difíciles de eliminar. Si bien, los extractos de *C. pareira* y *B. flammea* estimularon la formación de biopelícula en un 30%, se tendría que evaluar la rigidez y solidez de la estructura, ya que se ha demostrado que esta estimulación podría dar lugar a la formación de una estructura defectuosa, susceptible a otros fármacos (Pérez-López *et al.* 2020).

Los resultados indican que la efectividad en el uso tradicional de *J. gaumeri*, *C. aesculifolia*, *B. flammea*, *C. pareira*, *C. greggii* y *B. simaruba* para el tratamiento de infecciones y la curación de heridas, quemaduras o dermatitis no es dependiente de su actividad antibacteriana, ya que también cuentan con la propiedad de afectar la patogenicidad bacteriana, mediante la inhibición de la PQ.

### **2.3.3 Efecto de las fracciones y fracciones sempurificadas obtenidas del extracto de *C. greggii* sobre la producción de factores de virulencia de *P. aeruginosa***

Debido a que el extracto de *C. greggii* demostró tener un efecto inhibidor sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa* evaluados, se procedió a hacer una partición líquido-líquido y posterior fraccionamiento para detectar fracciones y/o metabolitos puros con actividad antivirulencia.

Con el primer fraccionamiento del extracto de *C. greggii* (**MC-8**), se encontró que solo las fracciones de alta polaridad (**MC-8C/8D**) inhiben la formación de la biopelícula en PA14 (Tabla 2.3), contrario a lo encontrado en las fracciones de baja (**MC-8A**) y mediana (**MC-**

**8B)** polaridad, que estimulan la formación de esta estructura de resistencia, en donde la fracción **MC-8B** promovió la formación de esta estructura cerca de un 200% (Tabla 2.3).

Por otra parte, todas las fracciones inhibieron la producción de piocianina, entre un 50 y 70% (Tabla 2.3), contrario al efecto encontrado en la actividad proteolítica, en donde solo las fracciones de mediana (**MC-8B**) y alta polaridad (**MC-8C**), mostraron una inhibición significativa con respecto al control (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3** Efecto de las fracciones obtenidas del extracto de *C. greggii* sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Fracción	CMI	Inhibición factores de virulencia (%)		
		Biopelícula	Piocianina	Proteasas
DMSO	---	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
MC-8A <sup>a</sup>	>5	+38.97 ± 6.3	*68.65 ± 0.3	+5.62 ± 0.0
MC-8B <sup>a</sup>	>5	+191.33 ± 4.5	*63.87 ± 4.3	*35.94 ± 8.0
<b>MC-8C<sup>a</sup></b>	<b>&gt;5</b>	<b>*11.62 ± 9.2</b>	<b>*62.39 ± 18.1</b>	<b>*21.51 ± 8.8</b>
<b>MC-8D<sup>a</sup></b>	<b>&gt;5</b>	<b>*34.57 ± 4.1</b>	<b>*45.15 ± 10.1</b>	<b>5.62 ± 9.7</b>
<i>C. longa</i> <sup>b</sup>	>50	*82.74 ± 2.5	*71.85 ± 3.4	11.24 ± 0.0

CMI = Concentración Mínima Inhibitoria (mg mL<sup>-1</sup>). --- = No evaluado.

Concentración utilizada: a = 5 mg mL<sup>-1</sup>, b = 10 mg mL<sup>-1</sup>. \*p < 0.0001

Las fracciones de alta polaridad obtenidas del extracto de *C. greggii* (**MC-8C**, **MC-8D**) demostraron inhibir los factores de virulencia y resistencia evaluados, por lo que la fracción **MC-8C** se sometió a un fraccionamiento en columna. De las 15 fracciones obtenidas, las fracciones **MC-21C** y **MC-21G** inhibieron la formación de la biopelícula alrededor de un 25-35%, contrario al resto de las fracciones que favorecieron su formación (Tabla 2.4). Por otra parte, las fracciones **MC-21B**, **MC-21E** y **MC-21G** afectaron cerca de un 30% la producción de proteasas, teniendo un mayor efecto en comparación con el control positivo (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4** Efecto de las fracciones obtenidas de la fracción de alta polaridad (MC-8C) del extracto de *C. greggii* sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa*

<b>Fracción</b>	<b>CMI</b>	<b>Inhibición factores de virulencia (%)</b>		
		<b>Biopelícula</b>	<b>Piocianina</b>	<b>Proteasas</b>
DMSO	---	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
MC-21A <sup>a</sup>	>1	+33.16 ± 9.3	+15.94 ± 14.4	6.14 ± 10.6
MC-21B <sup>a</sup>	>1	+16.39 ± 27.0	*39.50 ± 15.3	*28.94 ± 0.0
<b>MC-21C<sup>a</sup></b>	<b>&gt;1</b>	<b>35.20 ± 9.8</b>	<b>*10.23 ± 3.1</b>	<b>*23.39 ± 9.6</b>
MC-21D <sup>a</sup>	>1	+64.06 ± 6.4	+82.31 ± 10.0	*23.39 ± 9.6
MC-21E <sup>a</sup>	>1	+81.28 ± 7.2	*49.03 ± 23.7	*28.94 ± 0.0
MC-21F <sup>a</sup>	>1	+41.67 ± 28.8	*49.38 ± 18.9	*23.39 ± 9.6
<b>MC-21G<sup>a</sup></b>	<b>&gt;1</b>	<b>28.40 ± 9.2</b>	<b>*43.91 ± 7.1</b>	<b>*28.94 ± 0.0</b>
MC-21H <sup>b</sup>	>1	+16.73 ± 2.0	+111.0 ± 13.8	7.39 ± 0.0
MC-21I <sup>b</sup>	>1	3.46 ± 0.4	+103.1 ± 20.6	2.46 ± 8.5
MC-21J <sup>b</sup>	>1	12.51 ± 7.8	*36.41 ± 14.3	+12.69 ± 9.1
MC-21K <sup>b</sup>	>1	+14.84 ± 1.1	+20.22 ± 27.6	11.96 ± 7.9
MC-21L <sup>b</sup>	>1	14.91 ± 5.0	+172.8 ± 34.8	16.52 ± 7.9
MC-21M <sup>b</sup>	>1	+11.33 ± 17.1	+65.86 ± 28.9	+12.69 ± 9.1
MC-21N <sup>b</sup>	>1	+45.25 ± 1.7	+35.31 ± 4.3	*21.09 ± 0.0
MC-21O <sup>b</sup>	>1	+84.61 ± 8.0	*60.79 ± 7.0	*25.29 ± 7.2
<b><i>C. longa</i><sup>c</sup></b>	<b>&gt;50</b>	<b>78.09 ± 4.2</b>	<b>77.70 ± 3.5</b>	<b>21.64 ± 5.8</b>

CMI = Concentración Mínima Inhibitoria (mg mL<sup>-1</sup>). --- = No evaluado.

Concentración utilizada: a = 150 µg mL<sup>-1</sup>, b = 500 µg mL<sup>-1</sup>, c = 10 mg mL<sup>-1</sup>. \*p < 0.0001.

La actividad antivirulencia encontrada en estas fracciones, indica la presencia de metabolitos hidrofílicos capaces de interferir con la PQ en *P. aeruginosa*. Hasta el momento, de la fracción de mediana polaridad del extracto de la raíz de *C. greggii* se ha aislado una antraquinona identificada como crisofanol con actividad bactericida contra las bacterias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (García-Sosa et al., 2006); sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que las fracciones de alta polaridad, presentan otro mecanismo de acción. Teniendo en cuenta que las fracciones de alta polaridad inhibieron los factores de virulencia y resistencia en *P. aeruginosa*, futuros estudios se centrarán en el aislamiento e identificación de los metabolitos activos.

## 2.4 CONCLUSIONES

La actividad antivirulencia de los extractos de *J. gaumeri*, *B. flammea*, *C. pareira*, *C. greggii*, *C. aesculifolia* y *B. simaruba* coincide con su uso tradicional en el tratamiento de infecciones bacterianas, siendo el extracto de *C. greggii* el de mayor actividad.

El extracto y las fracciones semipurificadas de *C. greggii* mostraron efectos de amplio espectro sin afectar la viabilidad bacteriana, demostrando que poseen la capacidad de inhibir la expresión de virulencia regulada por la percepción de quórum en *P. aeruginosa*.

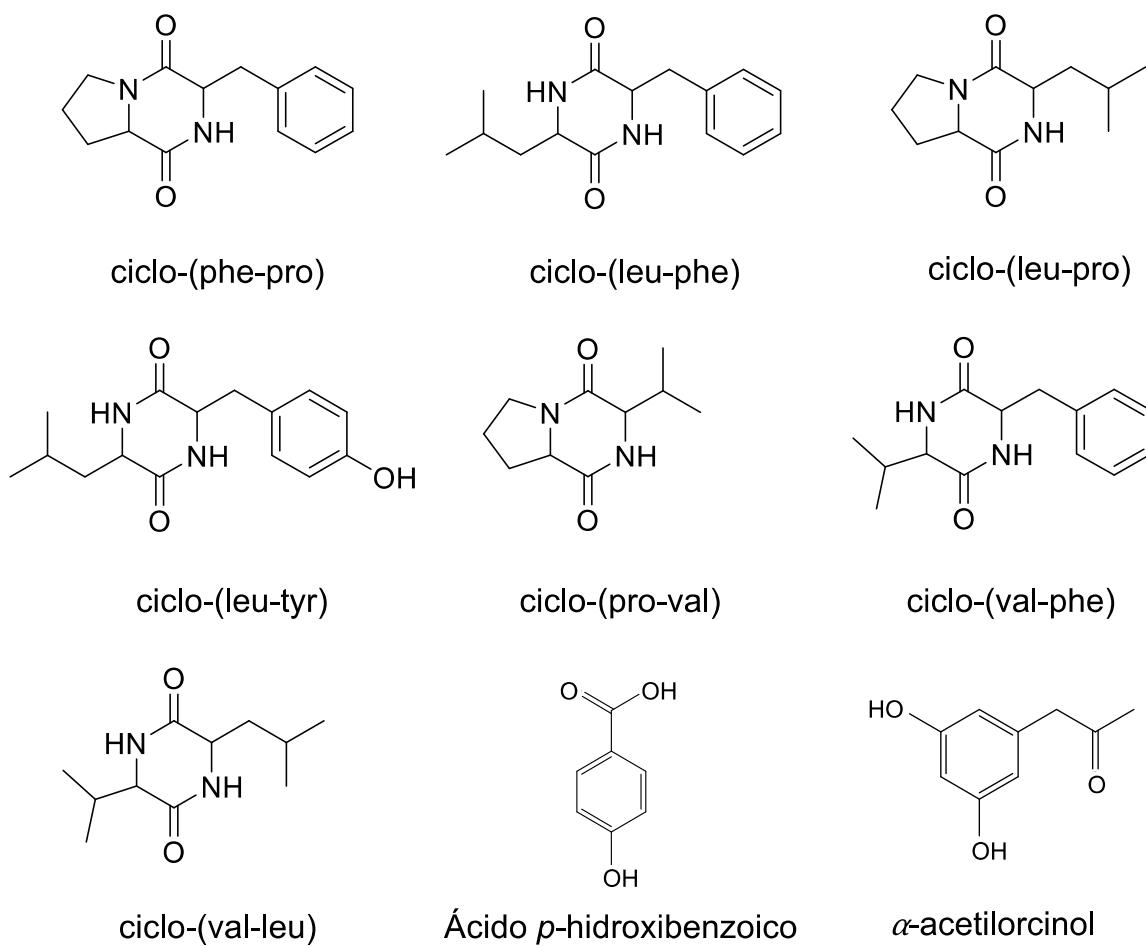
Los metabolitos responsables de la actividad antivirulencia detectada en el extracto de *C. greggii* son de alta polaridad.

### 3 CAPITULO III

#### ACTIVIDAD ANTIVIRULENCIA DE METABOLITOS DE *A. dauci*

##### 3.1 INTRODUCCIÓN

El hongo fitopatógeno *Alternaria dauci*, causante del “tizón foliar” en la zanahoria (*Daucus carota*) así como en otras especies vegetales de la familia *Apiaceae*, produce diversos compuestos fitotóxicos entre los que se incluyen el zinniol y la aldaulactona ( Courtial et al., 2018; Barash et al., 1981). Igualmente, se ha descrito la obtención de metabolitos fenólicos como ácido *p*-hidroxibenzoico,  $\alpha$ -acetilorcinol y dicetopiperazinas (Figura 3.1) (Peña-Rodríguez, L. 2018. Comunicación personal).



**Figura 3.1** Metabolitos secundarios aislados del cultivo *in vitro* de *A. dauci*.

Las dicetopiperazinas son dipéptidos cílicos estructuralmente diversos según los aminoácidos que participen en su composición, que están involucradas en la interacción huésped-parásito (Lou *et al.*, 2013). Poseen gran variedad de actividades biológicas, destacándose su actividad antifúngica y antibacteriana, sin embargo, también se ha detectado su participación en la modulación de la patogenicidad bacteriana actuando como moléculas de señalización en la PQ (Holden *et al.*, 1999).

La PQ es un mecanismo de comunicación bacteriana, que se basa en la síntesis y detección de moléculas señal o autoinductores, que al unirse a su respectivo receptor activan la expresión de genes relacionados con la expresión de determinantes de virulencia bacteriana (Carvalho *et al.*, 2012). Las moléculas autoinductoras de tipo *N*-acil-homoserin lactona activan los sistemas de PQ principalmente en bacterias patógenas Gram-negativas como es el caso de *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* entre otras, por lo que se han buscado agentes que inhiban la activación de la PQ.

En este sentido, se ha descrito que diferentes dicetopiperazinas pueden actuar como inhibidores o activadores de los sistemas de PQ regulados por *N*-acil-homoserin lactonas (Defoirdt, 2019; Campbell *et al.*, 2009; Holden *et al.*, 1999). Por ejemplo, en la bacteria *Burkholderia cenocepacia*, inhiben la producción de factores de virulencia y formación de biopelícula afectando a la enzima que produce la molécula señal (Buroni *et al.*, 2018). En contraste, en otros modelos bacterianos como *Vibrio* spp., *Agrobacterium tumefaciens* NT1 y *C. violaceum* CV026 pueden actuar como moléculas de señalización y activar el mecanismo de PQ, siendo consideradas como una nueva clase de moléculas inductoras (Defoirdt, 2019; Carvalho, 2012; Holden *et al.*, 1999).

Debido a que *A. dauci*, produce diferentes metabolitos en condiciones *in vitro*, en este trabajo se evalúa su efecto sobre los factores de virulencia regulados por la PQ en *P. aeruginosa* PA14 y *C. violaceum* CV026.

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 Obtención de metabolitos de *A. dauci*

Los metabolitos utilizados en el ensayo fueron obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación a partir de una fracción de mediana polaridad del extracto crudo de un cultivo in vitro de *A. dauci*, los cuales se enlistan en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Metabolitos seleccionados del cultivo de *A. dauci*

Nombre	Clave
Ciclo-(val-leu)	MC-212
Ciclo-(val-phe)	MC-246
Ácido 4-hidroxibenzólico	MC-A4H

### 3.2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En la tabla 3.2 se detallan las cepas utilizadas, las cuales fueron donadas por el Dr. Rodolfo García del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México y el Dr. Israel Castillo Juárez del laboratorio de Fitoquímica en el Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. Las cepas se almacenaron en medio Luria-Bertani (LB) con glicerol a -80°C. Al inicio de cada ensayo, las células bacterianas se sembraron en placas de agar LB y se incubaron durante 24 horas. A partir de colonias aisladas, se realizaron precultivos utilizando 5 mL de medio líquido LB por 18 horas a 37°C y 200 rpm.

**Tabla 3.2** Descripción de cepas utilizadas

Cepa	Genotipo relevante/descripción	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> <b>PA14 WT</b>	Cepa de laboratorio aislada originalmente de un paciente quemado	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>C. violaceum</i> <b>CV026</b>	Cepa mutante deficiente en autoinductor sintasa	(Suryanarayana <i>et al.</i> , 2013)

### 3.2.3 Actividad antivirulencia de los metabolitos aislados de *A. dauci*

Se determinó la CMI y la inhibición de los factores de virulencia por parte de los metabolitos aislados del cultivo de *A. dauci* en el modelo de *P. aeruginosa* PA14 siguiendo los procedimientos descritos en el capítulo anterior. Como control positivo se empleó la furanona C30, derivado sintético reconocido como un agente antivirulencia en diferentes cepas bacterianas a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Kang *et al.*, 2016) y como blanco se empleó DMSO al 2.5%, solvente utilizado para disolver los metabolitos. Para cada ensayo se incluyeron al menos tres cultivos independientes.

### 3.2.4 Inducción de la producción de violaceína en el modelo de *C. violaceum*

#### CV026

Cultivos de la cepa CV026 crecidos en medio líquido LB durante 18 horas se ajustaron, a una  $\text{DO}_{600}$  nm de 0.7 y a partir de ésta se hicieron diluciones 1/1000. Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del cultivo ajustado a cada pozo de una placa de 96 pozos y se agregaron las moléculas a evaluar a una concentración final de 25  $\mu\text{M}$ . Como control positivo se utilizó la *N*-hexanoil-L-homoserin lactona ( $\text{C}_6\text{-HSL}$ ) a una concentración de 15  $\mu\text{M}$  y como blanco DMSO al 2.5%. Las placas se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 24 horas. Posteriormente los 200  $\mu\text{L}$  de cada cultivo se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos para precipitar la violaceína. Enseguida se descartaron los sobrenadantes y los precipitados se solubilizaron en 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. El precipitado obtenido se centrifugó en las condiciones anteriores para remover las células. De cada sobrenadante, se midió la  $\text{DO}_{595}$  nm en un lector de microplacas (iMark, Biotek). El resultado se expresó como positivo o negativo, en función de la producción de violaceína. Para cada ensayo se incluyeron al menos tres cultivos independientes.

## 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La CMI de los metabolitos obtenidos previamente en el laboratorio de Química Orgánica del CICY, fue  $> 50 \mu\text{M}$ , por lo cual para asegurar que no tuvieran efecto sobre el crecimiento bacteriano, se eligió la concentración de 25  $\mu\text{M}$  para la realización de los ensayos posteriores.

Los tres metabolitos indujeron la formación de biopelícula en PA14 (Tabla 3.3), siendo **MC-A4H** el que mostró mayor efecto, estimulando cerca del 90% por encima del control, lo cual coincide con resultados ya reportados que señalan un incremento en la formación de

biopelícula, en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 a concentraciones que oscilan entre 12-100 µg mL<sup>-1</sup> en presencia de este metabolito (Plyuta *et al.*, 2013). En contraste ningún metabolito mostró un efecto inhibitorio significativo en la producción de piocianina y proteasas (Tabla 3.3). Es de destacar que la furanona C30 no mostró efecto en la inhibición de la producción de proteasas, contrario a lo reportado previamente (Ahmed *et al.*, 2019).

**Tabla 3.3** Efecto de los metabolitos de *A. dauci* sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Metabolito	Inhibición factores de virulencia (%)		
	Biopelícula	Piocianina	Proteasas
DMSO	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
MC-212 <sup>a</sup>	+35.90 ± 8.9	1.66 ± 8.6	0.00 ± 0.0
MC-246 <sup>a</sup>	+69.23 ± 4.7	5.50 ± 9.6	+12.67 ± 10.9
MC-A4H <sup>a</sup>	+89.39 ± 2.3	+4.63 ± 14.2	+6.33 ± 10.9
<b>C30<sup>b</sup></b>	<b>*47.01 ± 5.1</b>	<b>28.88 ± 14.5</b>	<b>+12.67 ± 10.9</b>

Concentración utilizada: <sup>a</sup>=25 µM, <sup>b</sup>= 100 µM. \*p < 0.0001

Debido a reportes previos que destacan la función de las dicetopiperazinas como moléculas inductoras y al efecto de estimulación por parte de **MC-212** y **MC-246**, en los factores de virulencia evaluados en *P. aeruginosa*, se analizó si su actividad se relacionaba con su potencial de ser moléculas inductoras, por lo que se empleó el modelo de inducción de violaceína en *Chromobacterium violaceum* CV026.

La cepa CV026, no sintetiza moléculas inductoras, sin embargo, detecta moléculas señal presentes en el medio de cultivo, produciendo un pigmento violeta llamado violaceína (McClean *et al.*, 1997). Sin embargo, las dicetopiperazinas evaluadas no indujeron la producción de violaceína de CV026, en comparación con el control positivo (C<sub>6</sub>-HSL) (Tabla 3.4).

A la fecha, solo hay un reporte para el caso de **MC-212**, donde se había indicado que no estimula la producción de violaceína en CV026 a 10mM (Degrassi *et al.*, 2002).

**Tabla 3.4** Inducción de la producción de violaceína en *C. violaceum* CV026

Metabolito	<i>C. violaceum</i> CV026
C <sub>6</sub> -HSL	+
MC-212	-
MC-246	-

+ : Inducción, - : No inducción

### 3.4 CONCLUSIONES

El ácido 4-hidroxibenzóico y las dicetopiperazinas ciclo-(val-leu) y ciclo-(val-phe), no inhiben la percepción de quórum en *P. aeruginosa*.

Las dicetopiperazinas ciclo-(val-leu) y ciclo-(val-phe), no actúan como moléculas de señalización en el sistema de percepción de quórum de *C. violaceum* CV026.

### **4 CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

#### **4.1 CONCLUSIONES GENERALES**

Este es el primer reporte sobre la actividad antivirulencia de plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional Maya. Especies vegetales como *C. greggii*, *J. gaumeri*, *B. flammea*, *C. pareira*, *C. aesculifolia* y *B. simaruba* inhiben los factores de virulencia y resistencia regulados por la percepción de quórum en *P. aeruginosa*.

Se identificó al extracto de la raíz de *C. greggii* como el más activo, ya que inhibe la producción de proteasas, piocianina y la formación de la biopelícula en *P. aeruginosa*. El fraccionamiento de este extracto permitió ubicar a los metabolitos con actividad antivirulencia en las fracciones de alta polaridad, lo que indica que podrían ser metabolitos de naturaleza hidrofílica.

Los metabolitos aislados del cultivo de *A. dauci* no tienen la capacidad de inhibir la comunicación bacteriana, ya que no interfieren en los sistemas de percepción de quórum descritos en *P. aeruginosa* y *C. violaceum* CV026.

#### **4.2 PERSPECTIVAS**

En la actualidad la búsqueda de agentes antivirulencia en plantas medicinales se ha convertido en una alternativa para el tratamiento y control de infecciones causadas por bacterias resistentes. En este trabajo se demostró que plantas medicinales de la Península de Yucatán son una fuente de metabolitos con propiedades antivirulencia, ya que extractos como el de *Colubrina greggii* inhiben los factores de virulencia regulados por la percepción de quórum en *P. aeruginosa*.

Debido a lo anterior, futuros estudios se deberán centrar en el aislamiento e identificación de los metabolitos activos empleando herramientas de metabolómica, que permitan correlacionarlos con su actividad biológica además de identificar más de un producto activo a la vez.

Determinar el sitio de acción dentro de los sistemas de percepción de quórum de los metabolitos activos, utilizando herramientas como modelado molecular y análisis de acoplamiento (docking). Adicionalmente se deben realizar ensayos con modelos de

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

---

infección *in vivo*, para determinar si el efecto es preventivo o curativo según la fase de infección en la que se administre.

**REFERENCIAS**

- Abisado, R., Benomar, S., Klaus, J., Dandekar, A., Chandler, J. (2018) Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *Mbio*, 9(3):1-13.
- Adonizio, A., Downum, K., Bennett, B., Mathee, K. (2006) Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3):427-435.
- Adonizio, A., Kong, K., Mathee, K. (2008) Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south Florida plant extracts. *Antimicrobial agents Chemotherapy*, 52(1):198-203.
- Ahmed, S. A. K. S., Rudden, M., Smyth, T. J., Dooley, J. S. G., Marchant, R., y Banat, I. M. (2019). Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 3521-3535.
- Alanis, A. (2005) Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6):697-705.
- Aliyu, A. B., Koobanally, N. A., Moodley, B., Singh, P., y Chenia, H. Y. (2016). Quorum sensing inhibitory potential and molecular docking studies of sesquiterpene lactones from *Vernonia blumeoides*. *Phytochemistry*, 126, 23-33.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M. y Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: Evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 43-52.
- Asfour, H. (2018) Anti-quorum sensing natural compounds. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 6: 1-10.
- Bacha, K., Tariku, Y., Gebreyesus, F., Zerihun, S., Mohammed, A., Weiland-Brauer, N., Schmitz, R., Mulat, M, (2016) Antimicrobial and anti-quorum sensing activities of selected medicinal plants of Ethiopia: Implication for development of potent antimicrobial agents. *BMC Microbiology*, 16(1):1-9.

- Baldelli, V., Dángelo, F., Pavoncello. V., Fiscarelli, E. V., Visca, P., Rampioni, G. y Leoni, L. (2020). Identification of FDA-approved antivirulence drugs targeting the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing effector protein PqsE. *Virulence*, 11(1), 652-668.
- Banerjee, M., Moulick, S., Bhattacharya, K., Parai, D., Chattopadhyay, S., Mukherjee, S. (2017) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, virulence and biofilm formation by extracts of *Andrographis paniculata*. *Microbial Pathogenesis*, 113:85-93.
- Barash, I., Mor, H., Netzer, D., y Kashman, Y. (1981). Production of zinniol by *Alternaria dauci* and its phytotoxic effect on carrot. *Physiological Plant Pathology*, 19(1).
- Bodede, O., Shaik, S., Chenia, H., Singh, P., & Moodley, R. (2018). Quorum sensing inhibitory potential and in silico molecular docking of flavonoids and novel terpenoids from *Senegalia nigrescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 216, 134-146.
- 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.
- Boyer, M., Wisniewski-Dyé, F. (2009) Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(1):1-19.
- Braga, R., Dourado, M., Araújo, W. (2016) Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(Suppl. 1), 86-98.
- Buroni, S., Scuffone, V., Fumagalli, M., Makarov, V., Cagnone, M., Trespidi, G., De Rossi, E., Forneris, F., Riccardi, G. y Chiarelli, L. (2018). Investigating the Mechanism of Action of Diketopiperazines Inhibitors of the *Burkholderia cenocepacia* Quorum Sensing Synthase Cepl: A Site-Directed Mutagenesis Study. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 836.
- Campbell, J., Lin, Q., Geske, G., Blackwell, H. (2009) New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chemical Biology*, 4(12):1051-1059.

- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo De Vivar, A., Avila, G., Duran, A., y Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 429-439.
- Carvalho, M., y Abraham, W. (2012). Antimicrobial and Biofilm Inhibiting Diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 19(21), 3564-3577.
- Casadevall, A., Pirofski, L. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(8):3703-3713.
- Castillo-Juárez, I., Lopez-Jacome, L., Soberon-Chavez, G., Tomás, M., Lee, J., Castañeda-Tamez, P., Hernández-Bárragan, I., Cruz-Muñiz, M., Maeda, T., Wood, T., García-Contreras, R. (2017) Exploiting Quorum Sensing Inhibition for the Control of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Biofilms. *Current Topics Medicinal Chemistry*, 17(17):1915-1927.
- Centres for Disease Control and Prevention (2020). Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR). <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Accessed: 20 June 2020.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B., Hughson, F. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Letters to Nature*, 415:545-549.
- Cheng, Z., He, Y., Lim, S., Qamra, R., Walsh, M., Zhang, L., Song, H. (2010) Structural basis of the sensor-synthase interaction in autoinduction of the quorum sensing signal DSF biosynthesis, *Structure* 18:1199-1209.
- Cheruiyot, K., Olila, D., Kateregga, J. (2009) In-vitro antibacterial activity of selected medicinal plants from Longisa region of Bomet district, Kenya. *African Health Sciences*, 9 Suppl 1(August 2009).
- Chong, Y., Yin, W., Ho, C., Mustafa, M., Hadi, A., Awang, K., Narrima, P., Koh, C., Appleton, D., Chan, K. (2011) Malabaricone C from *Myristica cinnamomea* exhibits anti-quorum sensing activity. *Journal of Natural Products*, 74(10):2261-2264.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests f or Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9.
- Colson, A. (2008) The antibiotic pipeline. Extending the cure: policy responses to the growing threat of antibiotic resistance. Policy Brief ETC-06.
- Courtial, J., Hamama, L., Helesbeux, J.-J., Lecomte, M., Renaux, Y., Guichard, E., Voisine, L., Yovanopoulos, C., Hamon, B., Ogé, L., Richomme, P., Briard, M., Boureau, T., Gagné, S., Poupart, P. y Berruyer, R. (2018). Aldaulactone – An Original Phytotoxic Secondary Metabolite Involved in the Aggressiveness of *Alternaria dauci* on Carrot. Frontiers in Plant Science, 9.
- D'Angelo, F., Baldelli, V., Halliday, N., Pantalone, P., Polticelli, F., Fiscarelli, E., Williams, P., Visca, P., Leoni, L., Rampioni, G. (2018) Identification of FDA-approved Drugs as antivirulence agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62(11):1-20.
- Defoirdt, T. (2016). Specific Antivirulence Activity, A New Concept for Reliable Screening of Virulence Inhibitors. Trends in Biotechnology, 34(7), 527-529.
- Defoirdt, T. (2018) Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. Trends Microbiology, 26(4):313-328.
- Defoirdt, T. (2019). Amino acid-derived quorum sensing molecules controlling the virulence of vibrios (and beyond). PLOS Pathogens, 15(7).
- Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S., y Venturi, V. (2002). Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: Crosstalk with quorum sensing bacterial sensors. Current Microbiology, 45(4), 250-254.
- Delago, A., Mandabi, A., Meijler, M. (2016) Natural quorum sensing inhibitors - small molecules, big messages. Israel Journal of Chemistry, 56(5):310-320.
- Dias, A., Moreira, V., Almeida, L., Lima, M., Bezerra, J., Ribeiro, M., Nascimento, F., y Pereira, S. (2014). Protective effects of the antileishmanial extract of *Tephrosia*

- cinerea* (L.) Pers. (Fabaceae) against cyclophosphamide-induced damage. Genetics and Molecular Research, 13(4), 9044-9055.
- Diario Oficial de la Federación (2018). ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. [Online] (Actualizado 05 junio 2018) Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018)
- Dobias, J., Dénervaud-Tendon, V., Poirel, L., Nordmann, P. (2017) Activity of the novel siderophore cephalosporin cefiderocol against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 36(12):2319-2327.
- Doğan, Ş., Gökalsın, B., Şenkardeş, İ., Doğan, A., Sesal, N. (2019) Anti-quorum sensing and anti-biofilm activities of *Hypericum perforatum* extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Ethnopharmacology, 235(December 2018):293-300.
- Domalaon, R., Okunnu, O., Zhanel, G., Schweizer, F. (2019) Synergistic combinations of anthelmintic salicylanilides oxyclozanide, rafoxanide, and closantel with colistin eradicates multidrug-resistant colistin-resistant Gram-negative bacilli. The Journal of Antibiotics, 72(8):605-616.
- Dong, Y., Wang, L., Xu, J., Zhang, H., Zhang, X., Zhang, L. (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Letter to Nature, 813-817.
- Durán, R., Campos, G., Trejo, J.C., Simá, P., May, F. y M. Juan (2000). Listado Florístico de la Península de Yucatán. Impresiones Profesioales del Sureste, Mérida, Yucatán, México. 99 p.
- Escobedo-Martínez, C., y Pereda-Miranda, R. (2007). Resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. Journal of Natural Products, 70(6), 974-978.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., y Crawford, I. P. (1990). Identification and Characterization of Genes for a Second Anthranilate Synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the Two Anthranilate Synthases and Evolutionary Implications. Journal of Bacteriology, 172(2), 884-900.

## REFERENCIAS

---

- Falagas, M., Skalidis, T., Vardakas, K., Legakis, N. (2017) Activity of cefiderocol (S-649266) against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria collected from inpatients in Greek hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6):1704-1708.
- Fazzeli, H., Akbari, R., Moghim, S., Narimani, T., Arabestani, M., Ghoddousi, A. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. *Journal of Research in Medical Sciences*, 17(4):332-337.
- Fernández Nava, R. (2010). Nombres comunes, etnobotánica y distribución geográfica del género *Colubrina* (Rhamnaceae) en México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 7-22.
- Fleitas-Martínez, O., Cardoso, M., Meira-Ribeiro, S., Franco, O. (2019) Recent advances in antivirulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(APR):1-24.
- Fu, B., Wu, Q., Dang, M., Bai, D., Guo, Q., Shen, L., Duan, K. (2017) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by traditional chinese medicinal herb *Herba patriniae*. *Biomed Research International*, 10.
- Fuqua, C., Parsek, M., Greenberg, P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homosrine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35:439-468.
- Fuqua, W., Winans, S., Greenberg, E. (2019) Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal Bacteriology*, 176(2):269-275.
- García-Sosa, K., Sánchez-Medina, A., Álvarez, S. L., Zacchino, S., Veitch, N. C., Simá-Polanco, P., y Peña-Rodríguez, L. M. (2011). Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Natural Product Research*, 25(12), 1185-1189.
- García-Sosa, K., Villarreal-Alvarez, N., Lübben, P., y Peña-Rodríguez, L. M. (2006). Chrysophanol, an Antimicrobial Anthraquinone from the Root Extract of *Colubrina greggii*. *Journal of the mexican chemical society*, 50(2), 76-78.

- Genilloud, O. (2019) Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 51:81-87.
- Ghafoor, A., Hay, I., Rehm, B. (2011) Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 5238- 5246.
- Givskov, M., De Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P., Kjelleberg, S. (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *Journal of Bacteriology*, 178(22): 6618–6622.
- Gong, L., Wei, Z., Zhenga, K., Shia, B., Liu, M. (2021) The *Herba Patriniae* (Caprifoliaceae): A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology and quality control. *Journal of Ethnopharmacology*, 265: 11326.
- Gould, K. (2016) Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3):572-575.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaix, Y., Faure, D. (2016) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 038:86-116.
- Gupta, V., Datta, P. (2019) Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. *Indian Journal of Medical Research*, 149(2):97-106.
- Gutierrez-Lugo, M. T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramirez-Gama, R. M., Bye, R., Linares, E., y Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*, 2(4), 341-347.
- Gutiérrez, J., Ramírez, A., Martínez, M., Coria, J., Armenta, L., Ayala, J., Vernal, S., Flores, F., García, F., Monjardín, J., Martínez, G., Gutiérrez, V. y Suárez, J. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Infectología Pediátrica*, 30, 68-75.
- Heras, B., Scanlon, M., Martin, J. (2015) Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 79(2):208-215.

- Holden, M., Chhabra, S., De Nys, R., Stead, P., Bainton, N., Hill, P., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G., Stewart, G., Bycroft, B., Kjelleberg, S. & Williams, P. (1999). Quorum-sensing cross talk: Isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 33(6), 1254-1266.
- Husain, F., Ahmad, I., Al-thubiani, A., Abulreesh, H., AlHazza, I., Aqil, F. (2017) Leaf extracts of *Mangifera indica* L. inhibit quorum sensing – regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8:727.
- Hutchings, M., Truman, A., Wilkinson, B. (2019) Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51:72-80.
- Jakobsen, T., Van Gennip, M., Phipps, R., Shanmugham, M., Christensen, L., Alhede, M., Skindersoe, M., Rasmussen, T., Friedrich, K., Uthe, F., Jensen, P., Moser, C., Nielsen, K., Eberl, L., Larsen, T., Tanner, D., Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M. (2012) Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 56(5):2314-2325.
- Kalia, M., Yadav, V., Singh, P., Sharma, D., Narvi, S., Agarwal, V. (2018) Exploring the impact of parthenolide as anti-quorum sensing and anti-biofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sciences*, 199:96-103.
- Kalia, V. (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31(2):224-245.
- Kalia, V., Purohit, H. (2011) Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(2):121-140.
- Kang, J., Han, J., Jeon, B., Kim, B. (2016) Efficacies of quorum sensing inhibitors, piericidin A and glucopiericidin A, produced by *Streptomyces xanthocidicus* KPP01532 for the control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Microbiological Research*, 184:32-41.
- Katsume, T., Wajima, T., Ishibashi, T., Ferreira, J., Echols, R. (2017) Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling and simulation of cefiderocol, a

- parenteral siderophore cephalosporin, for dose adjustment based on renal function takayuki. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 61(1):1-12.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C., Tümler, B. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 2: 150.
- Koh, C., Sam, C., Yin, W., Tan, L., Krishnan, T., Meng, C., Chan, K. (2013) Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors* 13(5):6217-6228.
- Kordbacheh, H., Eftekhar, F., Ebrahimi, S. (2017) Anti-quorum sensing activity of *Pistacia atlantica* against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and identification of its bioactive compounds. *Microbial Pathogens*, 110:390-398.
- LaSarre, B., y Federle, M. J. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 73-111.
- Lau, G., Hassett, D., Ran, H., Kong, F. (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12):599-606.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Cho, M. H., Kim, J. A., y Lee, J. (2012). 7-fluoroindole as an antivirulence compound against *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 329(1), 36–44.
- Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. y Ausubel, F. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2833-2838.
- Lira-Ricárdez, J., Pereda-Miranda, R. (2020) Reversal of multidrug resistance by amphiphilic morning glory resin glycosides in bacterial pathogens and human cancer cells. *Phytochemistry Reviews*, 19:1211–1229.
- López-Romo, A., Quirós, R. (2019) Appropriate use of antibiotics: an unmet need. *Therapeutic Advances in Urology*, 2:11.

- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., y Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* Fungi and Their Bioactivities. *Molecules*, 18, 5891-5935.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., Li, M. (2019) Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine*, 14:11.
- Luo, J., Kong, J., Dong, B., Huang, H., Wang, K., Wu, L., Hou, C., Liang, Y., Li, B., Chen, Y. (2016) Baicalein attenuates the quorum sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and relieves the inflammatory response in *P. aeruginosa*-infected macrophages by downregulating the MAPK and NFkB signal-transduction pathways. *Drug Desing Development and Therapy*, 7(10)183-203.
- Maiden, M., Zachos, M., Waters, C. (2019) Hydrogels embedded with melittin and tobramycin are effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in an animal wound model. *Frontiers in Microbiology*, 10:1-11.
- Malešević, M., Di Lorenzo, F., Stanisavljevic, N., Novovic, K., Senerovic, L., Polovic, N., Kojic, N., Jovcic, B. (2019) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones. *Scientific Reports*, 9(1):1-13.
- Malgaonkar, A., Nair, M. (2019) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhIR is regulated by a small RNA PhrD. *Scientific Reports*, 9(432).
- Manefield, M., De Nys, R., Naresh, K., Roger, R., Givskov, P., Peter, S., Kjelleberg, S. (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, 145, 283-312.
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S., De Nys, R., Kjelleberg, S. (2000) Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5):2079-84.

- Martinelli, D., Grossmann, G., Séquin, U., Brandl, H., Bachofen, R. (2004) Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. BMC Microbiology, 4:25.
- McClean, K., Winson, M., Fish, L., Taylor, A., Ram Chhabra, S., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J., Swift, S., Bycroft, B., Stewart, G. y Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. Microbiology, 143.
- Méndez-González, M. E., Torres-Avilez, W. M., Dorantes-Euán, A., y Durán-García, R. (2014). Jardines medicinales en yucatán: Una alternativa para la conservación de la flora medicinal de los mayas. Revista Fitotecnia Mexicana, 37(2), 97-106.
- Mendoza-González, G., Martínez, M. L., y Lithgow, D. (2014). Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Canavalia rosea* (Sw.) DC. Journal of Coastal Research, 296(4), 697-713.
- Miller, M., Bassler, B. (2001) Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology, 55:165-99.
- Molina-Salinas, G. M., Pérez-López, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernández, S., y Torres, N. W. (2007). Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. Journal of Ethnopharmacology, 109(3), 435-441.
- Moo-Puc, R., Chale-Dzul, J., y Caamal-Fuentes, E. (2013). *Bonellia albiflora*: A Mayan Medicinal Plant That Induces Apoptosis in Cancer Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2013, 1-8.
- Muimhneacháin, E., Reen, F., O'Gara, F., McGlacken, G. (2018) Analogues of *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecules to tackle infections. Organic and Biomolecular Chemistry, 16(2):169-179.
- Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C., Goldberg, J., Bassler, B. (2017) The RhlR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. PLOS Pathogens 13(7):e1006504.

- Muñoz-Cázares, N., Aguilar-Rodríguez, S., García-Contreras, R., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M., Palma-Tenango, M., Prado-Galbarro, F., Castillo-Juárez, I. (2018) Phytochemical screening and antivirulence properties of *Ceiba pentandra* and *Ceiba aesculifolia* (Malvaceae) bark extracts and fractions. *Botanical Sciences*, 96(3):415-425.
- Muñoz-Cazares, N., García-Contreras, R., Pérez-López, M., Castillo-Juárez, I. (2017) Phenolic Compounds with Antivirulence Properties. In: Soto-Hernández M, Palma-Tenango M, García-Mateos M R (eds) *Phenolic Compounds - Biological Activity*. InTechOpen, London, UK, pp 139-167.
- Muñoz-Cazares, N., García-Contreras, R., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M., y Castillo-Juárez, I. (2018). Natural Products With Quorum Quenching-Independent Antivirulence Properties. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 327-351.
- Netotea, S., Bertani, I., Steindler, L., Kerényi, Á., Venturi, V., Pongor, S. (2009) A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an “activation zone”. *Biology Direct* 4(1):6.
- Newman, D., Cragg, G. (2020) Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3):770-803.
- Ng, W., Bassler, B. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43:197-222.
- Nunes-Silva, L., Rigon-Zimmer, K., Macedo, A., Silva-Trentin, D. (2016) Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical Reviews*, 116(16):9162-9236.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, 3-5.
- Obinna, N., Nwodo, C., Olayinka, A. (2008) Evaluation of antibacterial activity of *Pisidium guajava* and *Gongronema Latifolium*. *Journal of Medicine Plants Research*, 2: 189-192.

- Ohnishi, M., Golparian, D., Shimuta, K., Saika, T., Hoshina, S., Iwasaku, K., Nakayama, S., Kitawaki, J., Unemo, M. (2011) Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7): 3538–3545.
- Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A., Hancock, R. (2007) Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *Journal of Bacteriology*, 189(5):2164-2169.
- Pacios, O., Blasco, L., Blieriot, I., Fernandez-García, L., González-Bardanca, M., Ambroa, A., López, M., Bou, G., Tomás, M. (2020) Strategies to combat multidrug-resistant and persistent infectious diseases. *Antibiotics*, 9(65):1-20.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., y Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192.
- Papenfort, K., Bassler, B. (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9):576-588.
- Pattnaik, S., Ranganathan, S., Ampasala, D., Syed, A., Ameen, F., Busi, S. (2018) Attenuation of quorum sensing regulated virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Diaporthe phaseolorum* SSP12. *Microbial Pathogens*, 118:177-189.
- Peña-Rodríguez, L. M., Durán García, R., Vera Kú, B. M., Fuentes García, A. G., y Domínguez Carmona, D. B. (2011). Flora nativa como fuente potencial de nuevos fármacos, en: *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*. pp. 475-479
- Pendleton, J., Gorman, S., Gilmore, B. (2013) Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(3):297-308.
- Pérez-López, M., Flores-Cruz, M., Martínez-Vázquez, M., Soto Hernández, R. M., García-Contreras, R., Padilla-Chacón, D., y Castillo-Juárez, I. (2020). Anti-virulence activities of some *Tillandsia* species (Bromeliaceae). *Botanical Sciences*, 98(1), 117-127.

## REFERENCIAS

---

- Plotnikova, J., Rahme, L., Ausubel, F. (2000) Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124(4):1766-1774.
- Plyuta, V. A., Zaitseva, J., Lobakova, E., Zagorskina, N., Kuznetsov, A., y Khmel, I. (2013). Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta pathologica, microbiologica e inmunologica scandinavica*.
- Powers, J. (2004) Antimicrobial drug development - The past, the present, and the future. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4):23-31.
- Proctor, C., Mccarron, P., Ternan, N. (2020) Furanone quorum-sensing inhibitors with potential as novel therapeutics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 69:195-206.
- Pulido-Salas, M. T. y Serralta-Peraza, L. (1993). Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. México. pp. 106
- Rahme, L., Ausubel, F., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B., Lau, G., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M., Tsongalis, J., Walendziewicz, C., Tompkins, R. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 8815-8821.
- Rampioni, G., Visca, P., Leoni, L., y Imperi, F. (2017). Drug repurposing for antivirulence therapy against opportunistic bacterial pathogens. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(1), 13-22.
- Rasko, D., Sperandio, V. (2010) Antivirulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(2):117-128.
- Rasmussen, T., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. (2005) Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology*, 187(5):1799-1814.

- Rasmussen, T., Manefield, M., Andersen, J., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kelleberg, S., Givskov, M. (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*, 148: 87–102.
- Rhodes, K., Schweizer, H. (2016) Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resistance Updates*, 28: 82–90.
- Rodríguez García, C. M., Dorantes Euan, A., y Peraza Echeverría, L. (2016). Las plantas curativas de la costa yucateca. *Ciencia – Academia mexicana de Ciencias*, 67(4), 74-76.
- Rodríguez-García, C., Ruiz-Ruiz, J., Peraza-Echeverría, L., Peraza-Sánchez, S., Torres-Tapia, L., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Herrera-Chalé, F., Segura-Campos, M., Quijano-Ramayo, A., Ramón-Sierra, J. y Ortiz-Vázquez, E. (2019). Antioxidant, antihypertensive, anti-hyperglycemic, and antimicrobial activity of aqueous extracts from twelve native plants of the Yucatan coast. *PLoS ONE*, 14(3), 1–17.
- Rossiter, S., Fletcher, M., Wuest, W. (2017) Natural Products as Platforms To Overcome antibiotic resistance. *Chemical Reviews*, 117(19): 12415-12474
- Roy, V., Adams, B. L., y Bentley, W. E. (2011). Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 113-123.
- Rudrappa, T., Bais, H. (2008) Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6):1955-1962.
- Rutherford, S. y Bassler, B. (2012). Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11):1-25.
- Salazar-Aranda, R., Pérez-López, L. A., López-Arroyo, J., Alanís-Garza, B. A., y Waksman de Torres, N. (2011). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from

- Northeast of Mexico. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-6.
- Sánchez-Medina, A., García-Sosa, K., May-Pat, F., y Peña-Rodríguez, L. M. (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan traditional medicine part I. Antioxidant, antimicrobial and  $\beta$ -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8(2), 144-151.
- Santajit, S., Indrawattana, N. (2016) Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Research International*, 2016:8.
- Secretaría de Salud (2018). Estrategia Nacional de acción contra Resistencia a Antimicrobianos. [Online] (Actualizado 30 junio 2018) Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/260-se-publica-estrategia-nacional-de-accion-contra-resistencia-a-antimicrobianos?idiom=es>
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M., Grossart, H. (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiology*, 4(47).
- Sharma, S., Gopu, V., Sivasankar, C., Shetty, P. (2019) Hydrocinnamic acid produced by: *Enterobacter xiangfangensis* impairs AHL-based quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, 9(49):28678-28687.
- Shukla, V., y Bhathena, Z. (2016). Broad Spectrum Anti-Quorum Sensing Activity of Tannin-Rich Crude Extracts of Indian Medicinal Plants. *Scientifica*.
- Singh, V., Mishra, A., Jha, B. (2017) Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Delftia tsuruhatensis* extract by attenuating the quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7:337.
- Sun, S., Dai, X., Sun, J., Bu, X., Caihong, W., Li, H., Zhu, H. (2016) A diketopiperazine factor from *Rheinheimera aquimaris* QSI02 exhibits anti-quorum sensing activity. *Scientific Reports*, 6:39637

- Suryanarayana Vasavi, H., Bhagwath Arun, A., Rekha, D., y Rekha, P. (2013). Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(12), 954–959.
- Taganna, J., Quanico, J., Perono, R., Amor, E., Rivera, W. (2011) Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylolytic activity in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Ethnopharmacology, 134(3):865-871.
- Teasdale, M., Donovan, K., Forschner-Dancause, S., Rowley, D. (2011) Gram-positive marine bacteria as a potential resource for the discovery of quorum sensing inhibitors. Marine Biotechnology, 13(4):722-732.
- Teplitski, M., Mathesius, U., Rumbaugh, K. (2011) Perception and degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells. Chemical Reviews, 111(1):100-116.
- Tevyashova, A., Olsufyeva, E., Preobrazhenskaya, M. (2015) Design of dual action antibiotics as an approach to search for new promising drugs. Russian Chemical Reviews, 84(1):61-97.
- Tomaras, A., Crandon, J., McPherson, C., Banevicius, M., Finegan, S., Irvine, R., Brown, M., O'Donnell, J., Nicolau, D. (2013) Adaptation-based resistance to siderophore-conjugated antibacterial agents by *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents of Chemotherapy, 57(9):4197-4207.
- Torres M., Uroz S., Salto R., Fauchery L., Quesada E. y Llamas I. (2017). HqiA, a novel quorum-quenching enzyme which expands the AHL lactonase family. Scientific Reports, 7(943).
- Trastoy, R., Blasco, L., Bou, G., y Tomas, M. (2018). Fighting antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Fighting Antimicrobial Resistance, 1-18.
- Truchado, P., Larrosa, M., Castro-Ibáñez, I., Tomás-Barberán, F., Allende, A. (2015) Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors. Trends in Food Science and Technology, 43(2):189-204.

- Uroz, S., Heinonsalo, J. (2008) Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. FEMS Microbiology Ecology, 65(2):271-278.
- Vandeputte, O., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., El Jaziri, M., Baucher, M. (2010) Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAQ1. Applied and Environmental Microbiology, 76(1):243-253.
- Vasavi, H., Arun, A., Rekha, P. (2014) Anti-quorum sensing activity of *Psidium guajava* L. flavonoids against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology and Immunology, 58(5):286-293.
- Vattem, D., Mihalik, K., Crixell, S., McLean, R. (2007) Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia, 78(4):302-310.
- Venter, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T., Ma, S. (2015) RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. Frontiers in Microbiology, 6: 377.
- Whitehead, N., Barnard, A., Slater, H., Simpson, N., Salmond, G. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 25:365-404.
- Wiegand, I., Hilpert, K., y Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols, 3(2), 163-175.
- Williams, P., Cámará, M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. Current Opinion in Microbiology, 12(2):182-191.
- Winstanley, C., & Fothergill, J. L. (2009). The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. FEMS Microbiology Letters, 290(1), 1-9.
- World Health Organization (2011). The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, Issues and Challenges. Geneva 3:1-14

- World Health Organization. (2016). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva.
- World Health Organization. (2017). Antibacterial agents in clinical development. An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Geneva.
- Yarmolinsky, L., Bronstein, M., Gorelick, J. (2015) Review: Inhibition of bacterial quorum sensing by plant extracts. Israel Journal of Plant Sciences, 62(4):294-297.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada, E., Aguilar, A. y Reyes-Chilpa, R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. Journal of Ethnopharmacology, 97(2), 293-299.
- Yin, H., Deng, Y., Wang, H., Liu, W., Zhuang, X., Chu, W. (2015) Tea polyphenols as an antivirulence compound disrupt quorum-sensing regulated pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports, 5(1):16158.
- Zapata-Estrella, H., Sánchez-Pardenilla, A., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., Campos-Buzzi, F., Meira-Quintão, N., Cechinel-Filho, V. y Peña-Rodríguez, L. (2014). Bioactive Metabolites from *Cnidoscolus souzae* and *Acmella pilosa*. Natural Product Communications, 2, 19-21.
- Zhang, W., Li, C. (2016) Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications. Frontiers in Microbiology, 6:1535.
- Zhao, X., Yu, Z., Ding, T. (2020) Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. Microorganisms, 8(3):1-21.
- Zhou, J., Bi, S., Chen, H., Chen, T., Yang, R., Li, M., Fu, Y., Jia, A. (2017) Anti-biofilm and antivirulence activities of metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Microbiology, 8:1-17.
- Zhou, J., Luo, H., Jiang, H., Jian, T., Chen, Z., Jia, A. (2018) Hordenine: A novel quorum sensing inhibitor and antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(7):1620-1628.

**ANEXOS****Anexo 1.** Rendimiento de las fracciones de *C. greggii*

<b>Descripción</b>	<b>Clave</b>	<b>Rendimiento</b>	
		<b>g</b>	<b>%</b>
Extracto crudo <i>C. greggii</i>	MC-8	27.73*	7.82
Fracción de polaridad baja	MC-8A	1.42	4.45
Fracción de polaridad media	MC-8B	3.48	10.88
Fracción de polaridad alta	MC-8C	1.76	5.52
Fracción acuosa residual	MC-8D	19.77	61.79

\*Obtenido a partir de 354.3 gramos de material seco.

**Anexo 2.** Rendimiento de las fracciones de MC-8C

Clave	Rendimiento		CMI
	g	%	
MC-21A	0.0057	0.34	>1
MC-21B	0.0037	0.22	>1
MC-21C	0.0077	0.46	>1
MC-21D	0.0117	0.70	>1
MC-21E	0.0039	0.23	>1
MC-21F	0.0148	0.88	>1
MC-21G	0.0050	0.30	>1
MC-21H	0.0241	1.44	>1
MC-21I	0.1771	10.63	>1
MC-21J	0.2839	17.04	>1
MC-21K	0.2237	13.42	>1
MC-21L	0.1191	7.15	>1
MC-21M	0.1553	9.32	>1
MC-21N	0.1181	7.09	>1
MC-21O	0.0643	3.86	>1

CMI = Concentración Mínima Inhibitoria (mg mL<sup>-1</sup>)

**Anexo 3.** Efecto de los extractos metanólicos de plantas empleadas en la medicina tradicional Maya sobre los factores de virulencia de *P. aeruginosa*

<b>Extracto</b>	<b>Inhibición factores de virulencia (%)</b>		
	<b>Biopelícula</b>	<b>Piocianina</b>	<b>Proteasas</b>
Agua destilada	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00
<i>M. depressa</i>	+6.15 ± 3.21	23.52 ± 5.87	*25.77 ± 0.00
<i>A. pilosa</i>	+10.83 ± 26.93	+18.16 ± 16.43	*40.12 ± 5.83
<i>P. hysterophorus</i>	+35.62 ± 16.16	3.12 ± 4.94	+47.72 ± 9.38
<i>B. simaruba</i>	4.72 ± 3.62	<b>*81.51 ± 1.72</b>	*43.48 ± 5.83
<i>I. carnea</i>	+76.24 ± 12.06	+33.24 ± 4.35	*36.75 ± 0.00
<i>I. pes-caprae</i>	+14.72 ± 20.68	64.28 ± 5.31	+42.30 ± 0.00
<i>D. anisandra</i>	+5.15 ± 10.92	25.58 ± 10.89	+7.89 ± 7.86
<i>J. gaumeri</i>	+24.28 ± 9.17	<b>*64.18 ± 14.63</b>	+12.73 ± 14.05
<i>T. cinerea</i>	+6.86 ± 3.96	5.77 ± 9.39	+17.26 ± 8.36
<i>C. rosea</i>	+25.91 ± 24.58	28.19 ± 1.23	5.42 ± 7.35
<i>O. campechianum</i>	+14.32 ± 21.80	+9.95 ±20.66	*36.75 ± 0.00
<i>C. aesculifolia</i>	<b>*74.39 ± 1.71</b>	+11.10 ± 21.54	*58.86 ± 4.81
<i>C. pareira</i>	+36.87 ± 21.47	<b>*50.13 ± 15.34</b>	*36.75 ± 0.00
<i>B. flammea</i>	+33.77 ±26.49	<b>*80.33 ± 10.92</b>	*36.75 ± 0.00
<i>C. greggii</i>	<b>*69.33 ±3.80</b>	<b>*52.79 ± 10.25</b>	<b>*40.12 ± 5.83</b>
<i>H. patens</i>	7.75 ± 3.24	7.54 ± 17.95	*46.85 ± 0.00

---

<i>C. biflora</i>	4.67 ± 7.40	25.81 ± 23.18	*33.09 ± 6.33
<i>S. donianum</i>	+82.84 ± 11.67	+10.12 ± 21.94	*43.48 ± 5.83
<i>S. hirtum</i>	2.59 ± 0.62	*55.28 ± 7.79	*36.75 ± 0.00
<b><i>C. longa</i></b>	<b>*76.26 ± 1.99</b>	<b>*81.69 ± 3.34</b>	<b>*43.48 ± 5.83</b>

---

\* $p < 0.0001$