



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRULENCIA DE FENOLES DE CADENA LARGA PRESENTES EN DOS ESPECIES DE ANACARDIACEAE

EVALUATION OF THE ANTI-VIRULENCE EFFECT OF LONG-CHAIN PHENOLS PRESENT IN TWO SPECIES OF ANACARDIACEAE

Victoria González-Islas¹, Rosa E. Sánchez-Fernández¹, Humberto Cortes-López¹, Marcos Soto-Hernández¹, Agustín Maceda-Rodríguez¹ e Israel Castillo-Juárez^{2*}

¹Colegio de Postgraduados, Posgrado en Botánica, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ²Cátedras CONACYT-Colegio de Postgraduados, Posgrado en Botánica, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia (israel.castillo@colpos.mx)

RESUMEN

Las terapias que inhiben la virulencia se han propuesto como una nueva alternativa para combatir infecciones bacterianas debido a que no generan resistencia. Los fenoles de cadena larga producidos por especies de la familia Anacardiaceae estructuralmente son muy diversos y se encuentran en forma de mezclas complejas. El objetivo de esta investigación fue analizar el potencial anti-percepción de quórum de mezclas de fenoles de cadena larga (MFCL) aisladas de dos especies vegetales de importancia etnomedicinal y comercial. Los MFCL se aislaron de la corteza de *Amphipterygium adstringens* (MFCLa) y del pericarpio de la nuez de *Anacardium occidentale* (MFCLo) con un rendimiento de 0.01 % de cera para MFCLa y 3.24 % de aceite para MFCLo. Se identificaron los ácidos anacárdicos como los principales constituyentes mediante espectroscopía de infrarrojo y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. En MFCLa se identificaron las cadenas monoinsaturadas y saturadas de 15 a 19 átomos de carbono C19:1 (41 %) y 15:0 (19.8 %) como las más abundantes. MFCLo presentó principalmente los compuestos de naturaleza polinsaturada y de cadena de 15 carbonos 15:3 (40 %) y 15:2 (24 %). Ambas mezclas redujeron de manera significativa la producción del pigmento violaceína en el sistema modelo de *Chromobacterium violaceum*, lo que evidencia una actividad inhibitoria de la percepción del quórum. Los dos MFCL evaluados tienen potencial para ser empleados en el desarrollo de terapias de antivirulencia, pero la de *A. occidentale* tiene la ventaja de producir los compuestos con un mayor rendimiento.

Palabras clave: Fitoquímicos, antivirulencia, percepción de quórum, fenoles de cadena larga, ácidos anacárdicos.

SUMMARY

Therapies that inhibit virulence have been proposed as a new alternative to fight bacterial infections because they do not generate resistance. Long-chain phenols produced by species of the Anacardiaceae family are structurally diverse and appear in complex mixtures. The objective of this study was to analyze the quorum sensing potential of long-chain phenol mixtures (LCPM) isolated from two plant species of ethnomedicinal and commercial importance. LCPM were isolated from the bark of *Amphipterygium adstringens* (LCPMAa) and the pericarp of *Anacardium occidentale* (LCPMAo) nut, with a yield of 0.01 % wax for LCPMAa and 3.24 % oil for LCPMAo. Anacardic acids were identified as the main constituents by infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Monounsaturated and saturated chains from 15 to 19 carbon atoms C19:1 (41 %) and 15:0 (19.8 %) were identified as the most abundant in LCPMAa while

LCPMAo presented mainly the compounds of polyunsaturated nature and 15-carbons 15:3 (40 %) and 15:2 (24 %). Both mixtures significantly reduced production of violacein pigment in *Chromobacterium violaceum* model system, thus evidencing a quorum sensing inhibitory activity. Both LCPMs evaluated have the potential to be used in the development of antivirulence therapies, but that from *A. occidentale* has the advantage of producing the compounds at higher yield.

Index words: Phytochemicals, antivirulence, quorum sensing, long chain phenols, anacardic acids.

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un grave problema de salud en todo el mundo (Livermore, 2011). Se ha propuesto que el desarrollo de terapias antivirulencia puede ser una alternativa viable para combatir infecciones con cepas resistentes, así como evitar su generación (Muñoz-Cazares *et al.*, 2018). El modo de acción de las moléculas antivirulencia se basa en interferir en la producción de los factores que generan el daño al hospedero sin afectar la viabilidad bacteriana (Silva *et al.*, 2016), por lo que se infiere no inducen la aparición de resistencia como los bactericidas clásicos (Rampioni *et al.*, 2014).

Existen diferentes sitios de acción de las moléculas antivirulencia, como son los sistemas de secreción tipo 3, los sistemas de dos componentes, fimbrias y flagelos (Muñoz-Cazares *et al.*, 2017); no obstante, en bacterias patógenas la regulación global de la virulencia es mediante la percepción de quórum (PQ) (Castillo-Juárez *et al.*, 2017).

La PQ es un mecanismo de regulación génica que favorece el comportamiento multicelular de las bacterias, por lo que su activación es dependiente de la densidad celular bacteriana (Muñoz-Cazares *et al.*, 2018). Existen diversos sistemas de percepción de quórum (SPQ) que se pueden agrupar de acuerdo con la naturaleza química

de las moléculas autoinductoras, que son las encargadas de realizar la comunicación entre las bacterias (LaSarre y Federle, 2013).

En *Chromobacterium violaceum*, una bacteria saprofita de suelos y patógena oportunista de animales, la regulación de la producción del pigmento violaceína, así como algunos factores de virulencia son regulados por un SPQ basado en moléculas autoinductoras del tipo de la N-acil homoserina lactona (Montes de Oca-Mejía *et al.*, 2015). Debido a que la violaceína es un pigmento visible de color morado, su inhibición se ha empleado como un indicador para la identificación de metabolitos inhibidores de PQ (Skogman *et al.*, 2016).

Hasta el momento, ha sido en las plantas donde se ha identificado el mayor número de moléculas con esta propiedad, donde los compuestos de naturaleza fenólica son los más abundantes (Asfour, 2017; Hernández-Pasteur *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2016). Para el caso de los denominados fenoles de cadena larga (FCL), sus propiedades bactericidas han sido ampliamente documentadas (Hemshekhar *et al.*, 2012); sin embargo, algunos estudios señalan que también pueden exhibir propiedades antivirulencia, como interferir en la formación de fimbrias (Lee *et al.*, 2014), biopelículas (Jagani *et al.*, 2009) y en la inhibición de sistemas de dos componentes (Kanojia *et al.*, 1999).

Los fenoles de cadena larga (FCL) son estructuralmente muy diversos y se presentan en forma de mezclas complejas de donde su separación es costosa y complicada (Muñoz-Cazares *et al.*, 2017). Recientemente, se publicó que una mezcla de fenoles de cadena larga (MFCL) rica en ácidos anacárdicos aislados de la corteza de *Amphipterygium adstringens* inhibe la PQ; sin embargo, la baja concentración, aunado a que la corteza es una estructura vegetal de lento crecimiento limitan un posible uso comercial (Castillo-Juárez *et al.*, 2013). En este sentido, la principal fuente de FCL reportada hasta el momento es el aceite obtenido del pericarpio de la nuez del *Anacardium occidentale*, el cual es una mezcla de ácidos anacárdicos, cardoles y cardanoles (Hemshekhar *et al.*, 2012). En esta planta el rendimiento de los FCL es mayor, además de que se obtiene a partir del fruto (lo que no daña a la planta), además de que se han desarrollado distintas estrategias que facilitan su extracción y la separación de sus constituyentes (Hamad y Mubofu, 2015). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue comparar la composición de las MFCL de estas dos especies vegetales y analizar su potencial para inhibir la PQ en el sistema modelo de *C. violaceum* para identificar fuentes de moléculas antivirulencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de extractos orgánicos y aceite

Amphipterygium adstringens se recolectó en febrero de 2016 en el municipio de Tepecoacuilco de Trujano en el estado de Guerrero (18° 18' 0" N, 99° 29' 0" O). La corteza fresca, en trozos (1 kg) de alrededor de 0.5 cm, se sometió a un proceso de extracción consecutiva por maceración con 2.8 L de hexano (hex) y acetato de etilo (AcOEt) (J. T. Baker) por periodos de 48 h durante 7 d (Castillo-Juárez *et al.*, 2013). El *A. occidentale* se recolectó en marzo del 2017 en el Puerto de San Benito en el municipio de Tapachula de Córdova y Ordoñez, en el estado de Chiapas (4° 41' 49.2" N, 92° 24' 39.6" O). El aceite conocido como CNSL por sus siglas en inglés (cashew nut shell liquid) se obtuvo de los pericarpios de la nuez (100 g) por maceración con 500 mL de hex (J. T. Baker), por periodos de 24 h durante 7 d (Morais *et al.*, 2017). Todos los extractos se filtraron y se eliminaron los disolventes en un evaporador rotatorio R-114 (Buchi) a una temperatura de 60 °C a 75 rpm.

Aislamiento de las MFCL de *A. adstringens* y *A. occidentale*

Para la obtención de la MFCLa, los extractos de hex (26 g) y AcOEt (34.6 g) se separaron mediante cromatografía de columna flash (71 × 6 cm) empacada con 200 g de gel de sílice (0.063-0.200 mm, malla de 70-230 ASTM). Posteriormente, las fracciones que contenían FCL se juntaron y purificaron mediante cromatografía en columna abierta (77 × 2.5 cm) empacada con 81 g de gel de sílice. Para ambas se empleó como fase móvil hex-AcOEt en diversas proporciones. Finalmente, la MFCLa se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (PLC sílica gel 60 GF254, Meck de 20 × 20 cm, 0.25 m de espesor) con un sistema de elución hex-AcOEt 70:30 v/v.

Para el caso de la MFCLo se empleó el método propuesto por Paramashivappa, con algunas modificaciones (Paramashivappa *et al.*, 2001). Se disolvieron 50 g del aceite (CNSL) en 300 mL de acetona (J. T. Baker), se agregó gradualmente hidróxido de calcio a 50 °C en agitación constante y se mantuvo la reacción por 5 h, hasta la precipitación del anacardato de calcio. El precipitado se filtró a vacío en un embudo Buchner, se lavó con acetona (J. T. Baker) con cantidad suficiente para eliminar los componentes que no reaccionaron y se dejó secar por 2 h. Para reconstituir los ácidos anacárdicos presentes en el precipitado, se dejó en agitación con 200 mL de agua destilada y 150 mL de HCl 11 M durante 1 h. La solución resultante fue extraída con AcOEt (2 × 150 mL). La fase orgánica se lavó con agua destilada (2 × 100 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se obtuvo la MFCLo.

Identificación y caracterización de las MFCL

La identificación de la MFCL fue realizada por la comparación de los espectros de infrarrojo con un estándar de referencia (Castillo-Juárez *et al.*, 2013) en un equipo de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (EITF) (Cary 630 FTIR-, 400-4.000 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} , Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Los datos de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (CL/EM) fueron registrados en un equipo Agilent 1200 Series Binary SL, con una columna Synergi 4um Polar-RP 80 Å 150 × 2.0 mm, acoplado a un detector de espectrometría de masas (Bruker Esquire 6000 ESI, Billerica, Massachusetts, USA) UV-Vis Arreglo de Diodos Waters 2996.

Evaluación de la actividad inhibidora de PQ de las MFCL

Una colonia de *C. violaceum* ATCC 553 se homogenizó en 5 mL de medio LB (Luria Bertani) y se incubó a 150 rpm, 28 °C por 18 h. Posteriormente, se ajustó con medio LB a una $\text{D.O}_{620\text{nm}} = 0.1$ en un espectrofotómetro (Halo MPR-96 visible, Dynamica, East Victoria, Australia) y se colocaron 200 μL del inóculo en placas de 96 pozos (Corning Costar). Posteriormente, las MFCL se disolvieron en dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma Aldrich®) y se agregaron 5 μL en cada pozo para obtener una concentración final de 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se utilizó como control positivo una mezcla de ácidos anacárdicos (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Castillo-Juárez *et al.*, 2013) y como control negativo el vehículo DMSO. Las placas se incubaron a 28 °C a 150 rpm por 2 d, para después medir el crecimiento bacteriano por cuenta viable y la inhibición de violaceína.

Para la cuantificación del pigmento se agregaron 200 μL de AcOEt en cada pozo, se centrifugó a 15,000 rpm. (Microfuge E Beckman, Brea, California, USA) y el sobrenadante se evaporó a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, la violaceína se solubilizó en 200 μL de etanol al 70 % y se cuantificó a 620 nm en un espectrofotómetro (Halo MPR-96 visible, Dynamica).

Análisis estadístico

Los gráficos y los resultados son expresados en medias y desviaciones estándar, se utilizó el programa Sigma-Plot 13. Las diferencias estadísticamente significativas en ensayos *in vitro* fueron obtenidas de tres réplicas independientes por duplicado. Las variables en porcentaje se normalizaron mediante arcoseno y se comprobó su normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para la comparación de las muestras, se observó si había diferencias significativas

mediante ANOVA de un factor y prueba t de Student.

RESULTADOS

Estudios previos reportan un bajo rendimiento (≤ 0.096 %) en la obtención de fenoles de cadena larga del tipo de ácidos anacárdicos a partir del extracto en hexano de la corteza de *A. adstringens* (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; Mata *et al.*, 1991). En este trabajo se obtuvo una MFCL que es una cera de color blanco amarillenta con rendimiento del 0.01 %, mientras que la del *A. occidentale* es un aceite de color café oscuro con rendimiento del 3.24 %.

Caracterización química de las MFCL por EITF y CLAR/EM

Se realizó una comparación con una muestra estándar de ácidos anacárdicos obtenida previamente por Castillo-Juárez *et al.* (2013), con la cual se identificó la presencia de varios grupos funcionales característicos de absorción para este tipo de moléculas (Ribeiro *et al.*, 2013). Las bandas de absorción correspondientes al anillo aromático de los fenoles se asocian con las señales C=C (1670 a 1640 cm^{-1}), las asociadas a las vibraciones de estiramiento características del enlace C=O (1730 a 1650 cm^{-1}) y las asociadas a la cadena alifática, donde se observa el estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos metilo y metileno en el rango de 2929 a 2850 cm^{-1} . Las bandas del grupo alcohol (O-H) se aprecian alrededor de los 3400 cm^{-1} . Aproximadamente, la vibración del enlace C-O se observa entre 1260 y 1000 cm^{-1} .

Mediante CLAR/EM se encontró que la MFCLa está constituida principalmente por cinco ácidos anacárdicos de distinta longitud de cadena hidrocarbonada y grado de saturación (Figura 1, Cuadro1) (Erşan *et al.*, 2016). Con base en su tiempo de retención y espectros de masas reportados en la literatura, los ácidos anacárdicos identificados fueron C15:0, C17:1, C17:0, C19:1 y C19:0 (Cuadro 1). Cabe señalar que no fue posible identificar con exactitud la posición de las dobles ligaduras de los ácidos anacárdicos C17:1 y C19:1, por lo que las estructuras mostradas en la Figura 1 se basan en reportes previos (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; Mata *et al.*, 1991).

Se encontró que la MFCLaO estaba compuesta principalmente por cuatro ácidos anacárdicos reportados previamente para esta especie como son C15:0, C15:1, C15:2 y C15:3 (Mattison *et al.*, 2018) (Figura 2). Cabe señalar que la principal diferencia con respecto a los presentes en la MFCLa es que éstos están restringidos a cadenas alifáticas de 15 átomos de carbono y son principalmente de naturaleza insaturada (Cuadro 2).

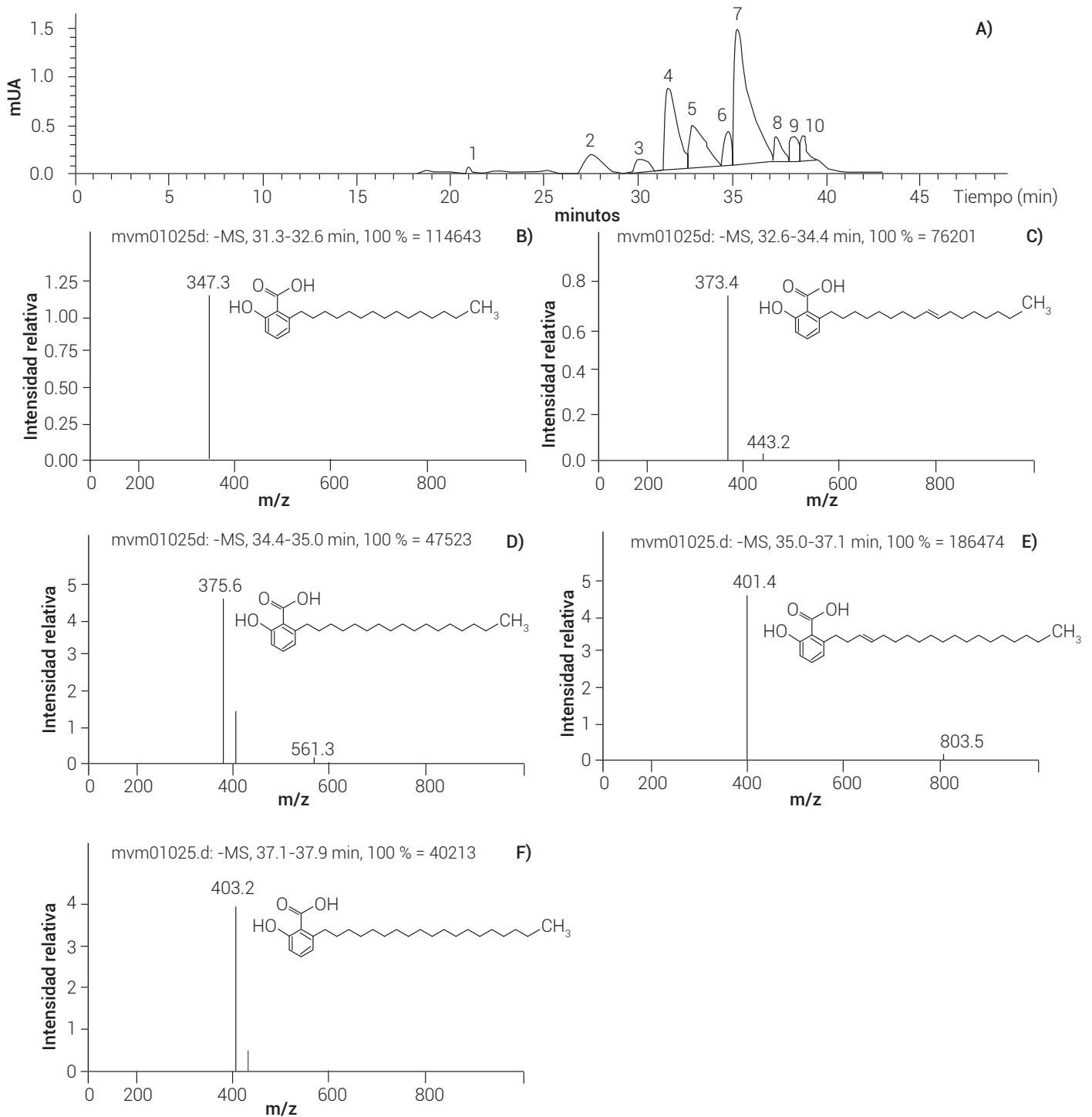


Figura 1. A) Análisis por CLAR/EM de la MFCL de *A. adstringens*. Cromatogramas de espectros de masas de ácidos anacárdicos C15:0, m/z 347.3; B) C17:1, m/z 373.4; C) C17:0, m/z 375.6; D) C19:1, m/z 401.4; E) C19:0, m/z 403.2; F) en modo de ion negativo.

Cuadro 1. Ácidos anacárdicos presentes en la MFCL de *A. adstringens*.

No. compuesto	t_R (min)	Ácido anacárdico	ESI-MS [M - H] ⁻ m/z	Fórmula molecular	Área fracción (%)
9	26.5	15:3	341.2	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	40.1
10	27.7	15:2	343.2	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	24.4
11	29.4	15:1	345.2	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	20.8
13	31.6	15:0	347.2	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	4.2

Cuadro 2. Ácidos anacárdicos presentes en la MFCL de *A. occidentalis*.

No. compuesto	t_R (min)	Ácido anacárdico	ESI-MS [M - H] ⁻ m/z	Fórmula molecular	Área fracción (%)
4	31.6	15:0	347.3	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	19.8
5	32.8	17:1	373.4	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	12.4
6	34.8	17:0	375.6	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	3.8
7	35.3	19:1	401.4	C ₂₆ H ₄₄ O ₃	44.1
8	37.3	19:0	403.2	C ₂₄ H ₄₄ O ₃	3.8

Actividad inhibidora de percepción de quórum de las MFCL

Se usó el sistema modelo de la bacteria *C. violaceum*, la cual regula la producción del pigmento violaceína mediante un sistema de PQ que emplea N-acil homoserina lactona, de tal forma que la inhibición de la producción del pigmento, sin afectar el crecimiento bacteriano, es considerado como una medida indirecta de la inhibición de PQ (Castillo-Juárez *et al.*, 2013). Ninguna de las mezclas afectó significativamente el crecimiento de la bacteria, pero sí redujeron la producción del pigmento violaceína de manera dosis respuesta (Figura 3); sin embargo, aunque no existen diferencias de actividad entre las mezclas a dosis menores de 15.6 µg/mL, a dosis mayores la MFCLaO inhibe con mayor efectividad la producción del pigmento (Figura 3). A 125 y 250 µg/mL⁻¹ la MFCLaA logra una inhibición del 75 y 85 %, mientras que la MFCLaO a las mismas concentraciones lo hace significativamente en 85 y 95 %, respectivamente ($P \leq 0.05$) (Figura 3).

DISCUSIÓN

Actualmente el grave problema de la resistencia a los antibióticos ha favorecido un resurgimiento en el estudio de productos naturales antimicrobianos, en los cuales se están empezando a identificar nuevos mecanismos de acción distintos al efecto bactericida (Silva *et al.*, 2013). Ante este reto, las terapias antivirulencia se presentan como una

opción factible para combatir cepas resistentes a múltiples antibióticos, con la ventaja de evitar o reducir la generación de resistencia (Nazzaro *et al.*, 2013; Tay e Yew, 2013).

Aunque el panorama es prometedor, cabe señalar que hasta el momento no existe aún una terapia de este tipo de manera comercial y sólo algunos compuestos han demostrado un efecto positivo en estudios *in vivo* (LaSarre y Federle, 2013). De igual manera, en el caso de algunas moléculas como las furanonas, su aplicación se ha visto limitada por la falta de estudios preclínicos y su alta toxicidad (Muñoz-Cazares *et al.*, 2017).

Los FCL son un grupo de metabolitos que han sido ampliamente estudiados y en los que se han identificado diversas propiedades biológicas como son las bactericidas, antitumorales, antiparasitarias, antioxidantes y contra la obesidad, por mencionar algunas (Hemshekhar *et al.*, 2012; Morais *et al.*, 2017; Muñoz-Cazares *et al.*, 2017); sin embargo, en lo que respecta a sus propiedades antivirulencia los estudios son limitados.

A. adstringens es una especie vegetal endémica de México y Centroamérica de gran importancia para la población, debido a las propiedades medicinales que se le han atribuido desde épocas prehispánicas (Solares *et al.*, 2006). En la corteza se concentran los principales metabolitos activos descubiertos, dentro de los que se encuentran compuestos de naturaleza terpénica, así

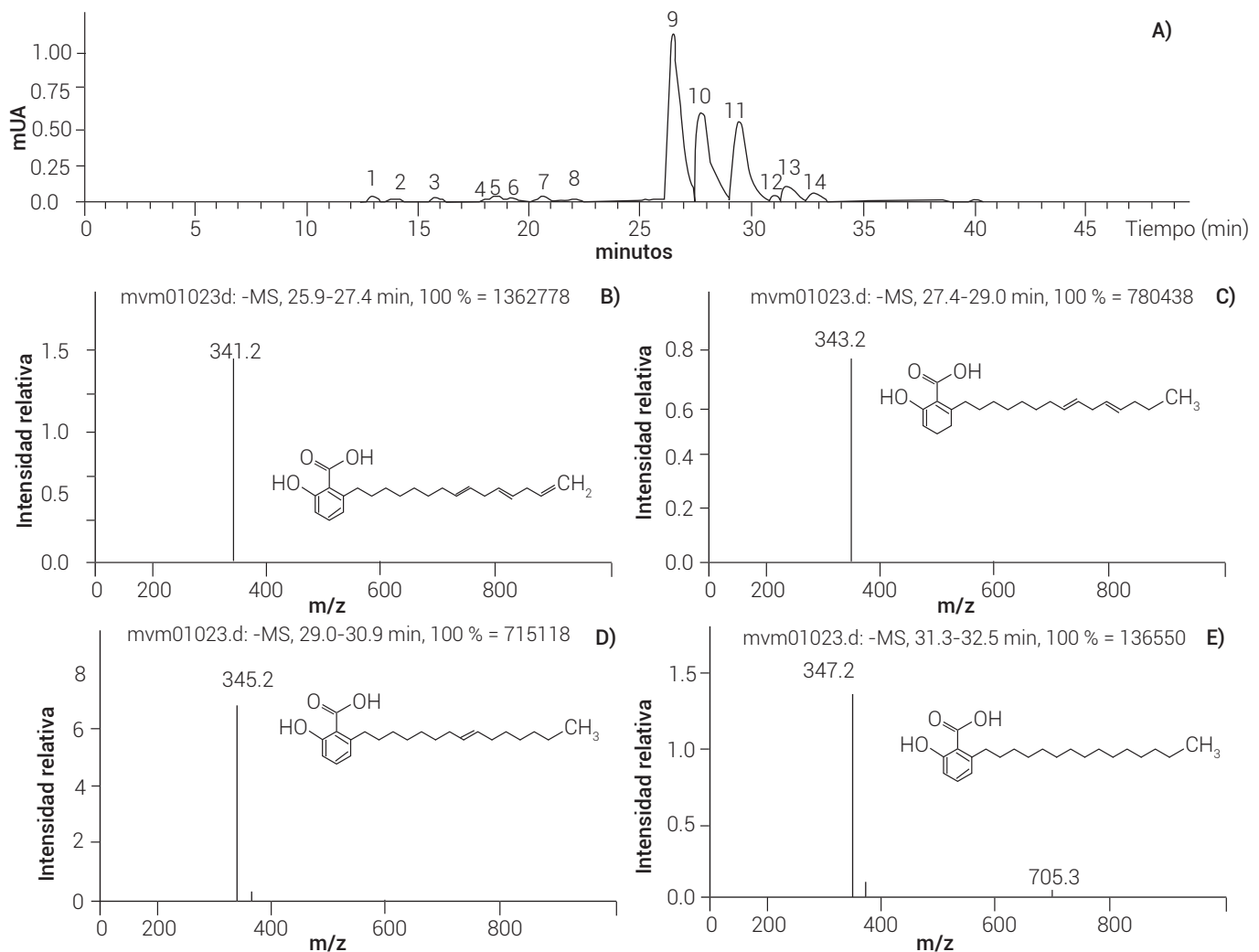


Figura 2. A) Análisis por CLAR/EM de la MFCL de *A. occidentale*. Cromatogramas de espectros de masas de ácidos anacárdicos C15:3, m/z 341.2; B) C15:2, m/z 343.2; C) C15:1, m/z 345.2; D) C15:0, m/z 347.2; E) En modo de ion negativo.

como FCL (Navarrete *et al.*, 1989). La sobreexplotación del árbol ha causado una reducción en las poblaciones silvestres en los últimos años (Solares y Gálvez, 2002). También, el bajo rendimiento de los FCL limita su uso para el desarrollo de terapias antivirulencia, ya que elevaría los costos y favorecería aún más la demanda de la corteza. En este sentido, la cantidad de FCL que se registraron en este estudio es relativamente baja, no obstante que se realizaron extracciones consecutivas con hexano y acetato de etilo (0.01 %), lo que es similar a lo reportado en estudios previos (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; Mata *et al.*, 1991).

El aceite del pericarpio de la nuez de *A. occidentale* es la principal fuente de FCL empleados en la industria para la elaboración de diversos productos (Hemshakar *et al.*, 2012). Su alto rendimiento (Hamad y Mubofu, 2015),

aunado a que su obtención se realiza de la cáscara de la nuez, lo vuelve una fuente potencial para facilitar la obtención de esta clase de metabolitos.

De igual manera, los factores bióticos y abióticos son determinantes de las variaciones de concentración y producción de metabolitos secundarios en plantas (Gouvea *et al.*, 2012). Bajo este panorama, el uso de MFCL para el desarrollo de terapias antivirulencia es factible; sin embargo, se desconoce de qué manera la diversidad y el tipo de FCL de las mezclas puede afectar esta actividad. El análisis de composición química reveló que en ambas mezclas los principales FCL son del tipo de los ácidos anacárdicos, además de que la composición es relativamente constante con relación a estudios previos (Chuayjuljit *et al.*, 2007; Mattison *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2013).

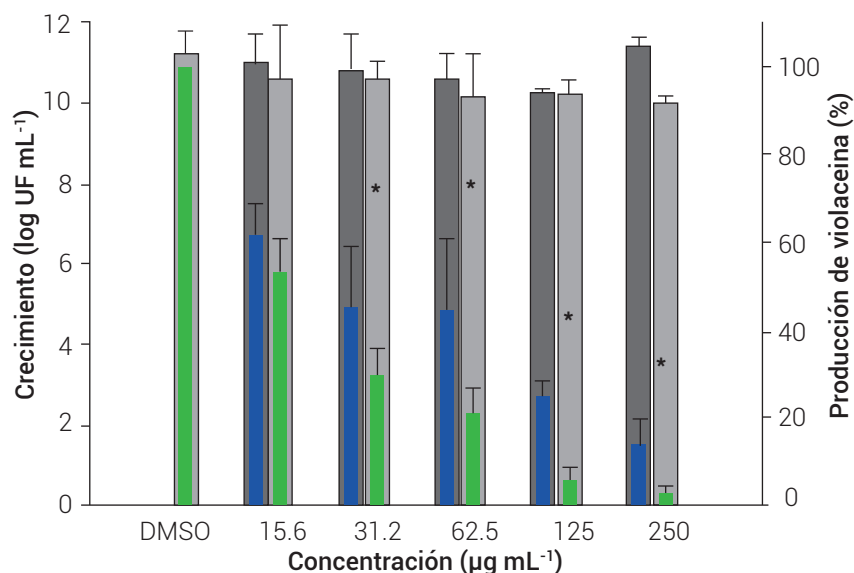


Figura 3. Efecto de las MFCL en la producción de violaceína y el crecimiento. Se muestra el porcentaje de inhibición del pigmento de violaceína (barras azules *A. adstringens* y verdes *A. occidentale*). Las barras negras (*A. adstringens*) y grises (*A. occidentale*) su efecto sobre el crecimiento expresado en log UFC mL⁻¹. DMSO: dimetilsulfóxido; ácidos anacárdicos*: P ≤ 0.05.

Para el caso de la MFCLAa, ésta contiene ácidos anacárdicos de tamaño de cadena variable, que van de 15 a 19 átomos de carbono principalmente monoinsaturados y saturados, donde el mayoritario es el C19:1 (41 %) seguido por el 15:0 (19.8 %) (Castillo-Juárez *et al.*, 2013; Erşan *et al.*, 2016), mientras que la MFCLAo contiene principalmente ácidos anacárdicos de naturaleza polinsaturada y están restringidos a un largo de cadena de 15 átomos, donde los mayoritarios son el 15:3 (40 %) y el 15:2 (24 %) (Chuayjulit *et al.*, 2007; Mattison *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos sobre la composición química de las mezclas están acordes con su apariencia física, ya que las ceras son indicativas de cadenas alifáticas saturadas, mientras que los aceites lo son de cadenas polinsaturadas. A pesar de las diferencias químicas y físicas observadas previamente, las dos MFCL inhibieron la PQ; sin embargo, a dosis altas la MFCLAo mostró un mayor efecto en la inhibición de producción de violaceína (P ≤ 0.05), lo que permite proponerla como una mejor opción para el desarrollo de terapias antivirulencia; no obstante, hay que señalar que faltan estudios complementarios *in vivo* que corroboren esta posible ventaja.

CONCLUSIONES

Las dos MFCL evaluadas tienen potencial para ser empleadas en el desarrollo de terapias antivirulencia; no

obstante, la MFCLAo tiene la ventaja de tener un mayor rendimiento y posiblemente una mejor actividad. Los FCL son un grupo de productos naturales con gran diversidad estructural que representan una fuente importante de moléculas con potencial antivirulencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales-CONACyT No. 2015-01-402, así como por Fideicomiso-COLPOS 167304 y el programa Cátedras-CONACyT proyecto 2112. V-GI agradece el apoyo a CONACyT durante sus estudios de maestría.

BIBLIOGRAFÍA

- Asfour H. Z. (2017) WITHDRAWN: antiquorum sensing natural compounds. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 6:1-10, <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2017.02.001>
- Castillo-Juárez I., L. E. López-Jácome, G. Soberón-Chávez, M. Tomás, J. Lee, P. Castañeda-Tamez, I. A. Hernández-Barragán, M. Y. Cruz-Muñiz, T. Maeda, T. K. Wood and R. García-Contreras (2017) Exploiting quorum sensing inhibition for the control of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* biofilms. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 17:1915-1927, <https://doi.org/10.2174/1568026617666170105144104>
- Castillo-Juárez I., R. García-Contreras, N. Velázquez-Guadarrama, M. Soto-Hernández and M. Martínez-Vázquez (2013) *Amphypterygium adstringens* anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Medical Research*

- 44:488-494, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.004>
- Chuayjuljit S., P. Rattanametangkool and P. Potiyaraj (2007) Preparation of cardanol-formaldehyde resins from cashew nut shell liquid for the reinforcement of natural rubber. *Journal of Applied Polymer Science* 104:1997-2002, <https://doi.org/10.1002/app.25915>
- Ersan S., Ö. Güçlü Üstündağ, R. Carle and R. M. Schweiggert (2016) Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (exo and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:5334-5344, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01745>
- Gouvea D. R., L. Gobbo-Neto and N. P. Lopes (2012) The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants. In: *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*. V. Cechinel-Filho (ed.). John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, USA. pp:419-452, <https://doi.org/10.1002/9781118260005.ch12>
- Hamad F. B. and E. B. Mubofu (2015) Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* 16:8569-8590, <https://doi.org/10.3390/ijms16048569>
- Hemshekhar M., M. S. Santhosh, K. Kemparaju and K. S. Girish (2012) Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 110:122-132, <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>
- Hernández-Pasteur G., P. S. Silva-Bermúdez, R. Reyes-Chilpa, H. Vibrans y M. Soto-Hernández (2019) Evaluación *in vitro* de la actividad cicatrizante y antibacteriana de extractos de *Buddleja cordata* Kunth y *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:93-99.
- Jagani S., R. Chelikani and D. S. Kim (2009) Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 25:321-324, <https://doi.org/10.1080/08927010802660854>
- Kanojia R. M., W. Murray, J. Bernstein, J. Fernandez, B. D. Foleno, H. Krause, L. Lawrence, G. Webb and J. F. Barrett (1999) 6-Oxa isosteres of anacardic acids as potent inhibitors of bacterial histidine protein kinase (HPK)-mediated two-component regulatory systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9:2947-2952, [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00508-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00508-9)
- LaSarre B. and M. J. Federle (2013) Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77:73-111, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>
- Lee J. H., Y. G. Kim, S. Y. Ryu, M. H. Cho and J. Lee (2014) Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *International Journal of Food Microbiology* 174:47-55, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.030>
- Livermore D. M. on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug Discovery and Development (2011) Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66:1941-1944, <https://doi.org/10.1093/jac/dkr262>
- Mata R., F. Calzada, A. Navarrete, F. del Rio and G. Delgado (1991) Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 34:147-154, [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90032-9)
- Mattison C. P., J. Malveira Cavalcante, I. Gallão M. and E. Sousa de Brito (2018) Effects of industrial cashew nut processing on anacardic acid content and allergen recognition by IgE. *Food Chemistry* 240:370-376, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.146>
- Montes de Oca-Mejía M., I. Castillo-Juárez, M. Martínez-Vázquez, M. Soto-Hernandez and R. García-Contreras (2015) Influence of quorum sensing in multiple phenotypes of the bacterial pathogen *Chromobacterium violaceum*. *Pathogens and Disease* 73:1-4, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu019>
- Morais S. M., K. A. Silva, H. Araujo, I. G. P. Vieira, D. R. Alves, R. O. S. Fontenelle and A. M. S. Silva (2017) Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. *Pharmaceuticals* 10:1-10, <https://doi.org/10.3390/ph10010031>
- Muñoz-Cazares N., R. García-Contreras, M. Pérez-López and I. Castillo-Juárez (2017) Phenolic compounds with anti-virulence properties. In: *Phenolic Compounds - Biological Activity*. M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango and M. R. García-Mateos (eds.). IntechOpen. London, UK. pp:139-167, <https://doi.org/10.5772/66367>
- Muñoz-Cazares N., R. García-Contreras, M. Soto-Hernández, M. Martínez-Vázquez and I. Castillo-Juárez (2018) Natural products with quorum quenching-independent antivirulence properties. In: *Studies in Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products*. Vol. 57. T. I. Atta-ur-Rahma (ed.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp:327-351, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00010-7>
- Navarrete A., R. Mata and G. Delgado (1989) Alkylanacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Medica* 55:579, <https://doi.org/10.1055/s-2006-962108>
- Nazzaro F., F. Fratianni and R. Coppola (2013) Quorum sensing and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences* 14:12607-12619, <https://doi.org/10.3390/ijms140612607>
- Paramashivappa R., P. P. Kumar, P. J. Vithayathil and A. S. Rao (2001) Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2548-2551, <https://doi.org/10.1021/jf001222>
- Rampioni G., L. Leoni and P. Williams (2014) The art of antibacterial warfare: deception through interference with quorum sensing-mediated communication. *Bioorganic Chemistry* 55:60-68, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.04.005>
- Ribeiro V. G. P., A. C. H. Barreto, J. C. Denardin, G. Mele, L. Carbone, S. E. Mazzetto, E. M. B. Sousa and P. B. A. Fehine (2013) Magnetic nanoparticles coated with anacardic acid derived from cashew nut shell liquid. *Journal of Materials Science* 48:7875-7882, <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7477-4>
- Silva L. N., K. R. Zimmer, A. J. Macedo and D. S. Trentin (2016) Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical Reviews* 116:9162-9236, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00184>
- Skogman M. E., S. Kanerva, S. Manner, P. M. Vuorela and A. Fallarero (2016) Flavones as quorum sensing inhibitors identified by a newly optimized screening platform using *Chromobacterium violaceum* as reporter bacteria. *Molecules* 21:1211, <https://doi.org/10.3390/molecules21091211>
- Solares A. F. y M. C. Gálvez C. (2002) Manual para una producción sustentable de corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht). Publicación Especial No. 34 Campo Experimental Zacatepec, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Zacatepec. Morelos, México. 13 p.
- Solares A. F., J. Jasso M., J. Vargas H., M. R. Soto H. and C. Rodríguez F. (2006) Capacidad de regeneración en grosor y lateral en corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht) en el Estado de Morelos. *Ra-Ximhai* 2:481-495, doi: 10.35197/rx.02.02.2006.10.fa
- Tay S. B. and W. S. Yew (2013) Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 14:16570-16599, <https://doi.org/10.3390/ijms140816570>