

## Búsqueda *in silico* de inhibidores de Quorum Sensing y estudios preclínicos en *Chromobacterium violaceum*

Esmeralda Escobar-Muciño\* 

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Microbiología. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

\*Email autor correspondiente: [esmeeem2014@gmail.com](mailto:esmeeem2014@gmail.com)

**Recibido:** 16 marzo 2021. **Aceptado:** 23 abril 2021

### RESUMEN

La búsqueda de inhibidores de Quorum sensing (QS) en bacterias Gram-negativas es de importancia por su patogenicidad, por ello actualmente se buscan nuevas alternativas para inhibir la virulencia. El objetivo del presente estudio fue determinar la energía libre de Gibbs ( $-\Delta G$ ) por medio del acoplamiento molecular de 11 compuestos aromáticos con el regulador CviR de QS en *Chromobacterium violaceum*, obtener los parámetros farmacocinéticos y preclínicos de los mejores inhibidores de QS. Evaluando la  $-\Delta G$  por 2 programas (Chimera 1.14 y mcule) comparando los promedios por método Tukey ( $p \leq 0.05$ ) y representando la unión ligando-proteína por medio de modelos de lazos y listones. Además de analizar las interacciones entre los aminoácidos del regulador CviR (puente de hidrogeno y enlaces no covalentes) y los grupos funcionales de los compuestos aromáticos. Finalmente, se realizó un estudio *in silico* preclínico reportando la Dosis Letal en ratón ( $DL_{50}$ ) por 3 modelos QSAR y 5 parámetros farmacocinéticos. Los resultados demostraron que al analizar la  $-\Delta G$  por ambos programas se obtuvieron 5 fuertes inhibidores de QS; el ácido ferúlico ( $-6.37 \pm 0.21$ ), el ácido hidroxicinámico ( $-6.53 \pm 0.35$ ), 4-hidroxibenzaldehído ( $6.6 \pm 0.61$ ), el eugenol ( $-6.2 \pm 0.38$ ) y el isoeugenol ( $-6.23 \pm 0.59$ ). Obteniendo que cada compuesto inhibe la actividad de CviR por un mecanismo de bloqueo del dominio de unión al autoinductor-1. Además, se obtuvieron valores significativos de  $DL_{50}$  sin reportar toxicidad en ratón y valores farmacocinéticos aceptables de los 5 inhibidores seleccionados. Concluyendo que los inhibidores podrían ser objetivo de investigación como terapia alternativa contra la patogénesis de *C. violaceum*.

**Palabras clave:** acoplamiento molecular, autoinductor-1, compuestos aromáticos, estudios farmacocinéticos, estudios preclínicos e inhibidores de Quorum sensing (IQS).

## ABSTRACT

The search for inhibitors of Quorum sensing (QS) in Gram-negative bacteria is important due to its pathogenicity, therefore new alternatives are being sought to inhibit its virulence. The objective of the present study was to determine the Gibbs free energy ( $-\Delta G$ ) through a molecular coupling of 11 aromatic compounds with the CviR regulator of QS in *Chromobacterium violaceum* and to obtain the pharmacokinetic and preclinical parameters of the best QS inhibitors. Evaluating the  $-\Delta G$  by 2 programs (Chimera 1.14 and mcule) comparing the averages by Tukey method ( $p \leq 0.05$ ) and representing the ligand-protein binding employing loops and ribbons models. Furthermore, the interactions between the amino acids of the QS regulator (hydrogen bridge and non-covalent bonds) and the functional groups of aromatic compounds were analyzed. Finally, a preclinical *in silico* study was carried out reporting the Lethal Dose in mice ( $LD_{50}$ ) by 3 QSAR models and 5 pharmacokinetic parameters. The results showed that when analyzing the  $-\Delta G$  by both programs, 5 strong QS inhibitors were obtained: ferulic acid ( $-6.37 \pm 0.21$ ), hydroxycinnamic acid ( $-6.53 \pm 0.35$ ), 4-hydroxybenzaldehyde ( $6.6 \pm 0.61$ ), eugenol ( $-6.2 \pm 0.38$ ), and isoeugenol ( $-6.23 \pm 0.59$ ). Obtaining that each compound inhibits the activity of CviR by a blocking mechanism of the autoinducer-1 binding domain of CviR. Also, significant  $LD_{50}$  values were obtained without reporting mouse toxicity and acceptable pharmacokinetic values of the 5 selected inhibitors. Concluding that the inhibitors could be the target of research as an alternative therapy against the pathogenesis of *C. violaceum*.

**Keywords:** aromatic compounds, autoinducer-1, docking molecular, inhibitors of Quorum sensing (IQS), pharmacokinetic studies and pre-clinical studies.

## INTRODUCCIÓN

La aparición reciente de cepas bacterianas con fenotipos de resistencia a múltiples fármacos (MDR) se ha convertido en un grave problema de salud a nivel mundial, constituyendo una de las principales causas de mortalidad humana. En este contexto, *Chromobacterium violaceum* es considerado un patógeno oportunista de

humanos causante de casos de septicemia grave en recién nacidos y adultos inmunodeprimidos. Además, es muy tolerante a 24 antibióticos como los betalactámicos, el cloranfenicol, la biciclomicina, la bacitracina, la kasugamicina y la metilenomicina.

Entre los mecanismos más importantes de esta

resistencia bacteriana a múltiples fármacos se encuentra la eliminación de dichos compuestos, tanto del citoplasma como de la propia membrana celular, por medio de la acción de proteínas de membrana específicas denominadas “transportadores de eflujo o bombas resistencia a múltiples antibióticos”. Por ello, hay un incremento de terapias alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por el patógeno *C. violaceum* [1-4]. La causa principal es el número de casos reportados de pacientes hospitalizados por infección del patógeno, observando 4 principales manifestaciones clínicas: fiebre (100%), sepsis (82%), lesiones cutáneas (67,9%) y dolor abdominal (31,1%). Además, de la presencia de absceso localizado (49%) afectando con mayor frecuencia al hígado y conduciendo a la insuficiencia multiorgánica en pacientes enfermos [5, 6]. Asimismo, se han registrado casos de sepsis grave debido a infecciones del tracto urinario y bacteremia transmitidas por el consumo de agua contaminada con *C. violaceum*. De estos padecimientos se tienen los reportes de enfermos contagiados en diferentes países como: Vietnam, Suiza, Taiwán, Japón, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Australia, Senegal y Sri Lanka [3, 7-11]. Por lo anterior, es necesario un diagnóstico rápido y una terapia antimicrobiana eficaz para curar pacientes

infectados [5, 6].

Por otro lado, se sabe que el mecanismo de Quorum Sensing (QS) de *C. violaceum* está regulado por el par de proteínas homólogas a LuxI/LuxR, donde CviI es la enzima autoinductor sintasa y CviR es el regulador transcripcional que responde a la acil homoserina lactona (AHL, por sus siglas). Y a su vez CviR regula algunos fenotipos como la activación de los genes que conforman el operón *vioABCDE* que codifican para la producción del pigmento violeta insoluble en agua (la violaceína), los genes que codifican la producción y degradación del cianuro, los genes de la quitinasa, el promotor *cviI*, la regulación de una guanina desaminasa, el sistema de secreción de tipo VI, la actividad exoproteasa, la agregación, la formación de biopelícula, el swarming, la tolerancia al estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la utilización de fuentes de nitrógeno y la síntesis de la molécula C<sub>6</sub>-AHL y C<sub>10</sub>-AHL [12, 13].

Asimismo, la mayoría de los tratamientos tradicionales de las enfermedades infecciosas se basan en el uso de compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano, considerando que la resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema grave para la salud pública. Por lo que, hoy en día se continúa con el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, debido al abuso del uso de los antibióticos y el

surgimiento de la multirresistencia en las bacterias Gram-negativas [14, 15].

Por ello, los inhibidores de QS son utilizados para que estas moléculas compitan por el sitio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional homólogo a LuxR y sus homólogos en bacterias patógenas Gram-negativas. Como ejemplo el uso de la furanona que fue eficaz contra la patogenicidad de *Chromobacterium* [16-19].

Otros ejemplos de inhibidores son la vainillina, el ácido vanílico y el ácido ferúlico que han sido adicionados en algunas especies bacterianas como *Listeria*, *Pseudomonas*, *Chronobacter* y *E. coli* [20-25]. Además, se ha informado el efecto de estos compuestos aromáticos en algunos fenotipos bacterianos como la resistencia al calor, los cambios en el pH y la inhibición de las bombas de flujo relacionadas con la resistencia a los antibióticos [20, 21, 26, 27]. A su vez, se ha investigado sobre la disminución de los factores de virulencia adicionando extractos metanólicos de la vainillina. Observando que es una terapia antimicrobiana eficaz que inhiben la producción de la violaceína en la cepa reportera *C. violaceum* CV026, mostrando resistencia al tratamiento y efecto inhibitorio en la producción de la biopelícula [28-31]. Los resultados fueron consistentes con los estudios de Nazzaro y cols., 2013, confirmando la

actividad anti-QS de algunos aceites esenciales y la vainillina en bacterias Gram-negativas [26].

Por otro lado, existen pocos estudios *in silico* que aborden el efecto inhibitorio del QS en *C. violaceum* basados en varios compuestos aromáticos [28]. En el caso de algunos patógenos multirresistentes Gram-negativos se reportó que han adquirido resistencia al inhibidor furanona. Por esta razón, se han estudiado nuevos inhibidores con la finalidad de atenuar la virulencia y reducir el número de casos de enfermedades proponiendo nuevas terapias clínicas. Además del hecho de que la biopelícula es difícil de eliminar de los órganos humanos, el material quirúrgico y las membranas utilizadas en los biorreactores. Por lo que el QS se ha convertido en una diana molecular para la creación de nuevos agentes anti-biopelícula en diferentes superficies [32-35].

Hay que destacar que este trabajo es de los primeros informes que describen la unión de varios compuestos aromáticos cuya función es inhibir la actividad del regulador transcripcional CviR de QS en *C. violaceum* comparando la energía libre de Gibbs por medio de 2 programas. Además de representar las interacciones ligando-proteína mediante experimentación *in silico* y la descripción de algunos parámetros preclínicos de los 5 mejores

inhibidores del regulador CviR que compiten con el ligando natural C<sub>6</sub>-AHL en *C. violaceum*. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue estudiar mediante herramientas *in silico* los inhibidores de QS que compiten con el sitio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR de *C. violaceum* y describir algunos parámetros preclínicos.

## METODOLOGÍA

### Búsqueda *in silico* de inhibidores de QS por acoplamiento molecular

Para la presente investigación se seleccionaron varios compuestos aromáticos producidos por medio de la bioconversión bacteriana. Los compuestos aromáticos seleccionados se buscaron en la base de datos del ZINC (<http://zinc.docking.org>) para obtenerlos en formato SDF. Posteriormente, se obtuvo el código PDB (3qp2) de la proteína reguladora CviR para llevar a cabo el estudio de acoplamiento molecular. Con la finalidad de obtener los promedios de la energía libre de Gibbs (-ΔG) de cada uno de los acoplamientos con el regulador CviR, por medio de 2 programas (mcule versión 2021 y Chimera versión 14.1). Además, se obtuvieron los grupos funcionales de los compuestos aromáticos que interactuaron con el dominio de unión al autoinductor-1 o las acil homoserina lactonas (AHLs) del regulador transcripcional CviR de *C. violaceum*. Los grupos funcionales

fueron identificados por medio del programa PyMol versión 4.60 y se visualizaron por medio del uso del programa discovery studio versión 2020 [36-38].

### Preparación del regulador transcripcional CviR para la prueba de acoplamiento molecular

La estructura cristalina del regulador transcripcional CviR se obtuvo de la base de datos del Protein Data Bank (PDB) con un código PDB de 3qp2. Posteriormente, el ligando natural C<sub>6</sub>-AHL del regulador CviR fue removido utilizando el programa chimera version 14.1. Y la proteína CviR se preparó y guardó en formato PDB para la prueba de acoplamiento utilizando el programa Chimera 14.1 y la herramienta Dock Prep [37, 38]. Después, se obtuvo la energía libre de Gibbs (-ΔG) resultante del acoplamiento de los compuestos aromáticos y el regulador transcripcional CviR, utilizando el programa Chimera (herramienta Auto Dock Vina) y el programa mcule 2021 (herramienta de acoplamiento con 1 clic). La grid-box o caja de selección del sitio de unión del del ligando, se generó utilizando los residuos del dominio de unión a las AHL de CviR cuyas coordenadas fueron: x; 19.7552, y; 12.846 y z; -12.4327. Especificando, el área de interacción del monómero correspondiente al regulador transcripcional CviR con los grupos

funcionales de cada uno de los compuestos aromáticos para describir las interacciones entre los aminoácidos de CviR y los enlaces formados entre el ligando y la proteína. El acoplamiento molecular se realizó en presencia de neutralizantes y moléculas de agua con la finalidad de simular condiciones biológicas [39]. Los promedios de la  $-\Delta G$  obtenidos del acoplamiento molecular se compararon y clasificaron en base a los estudios *in vitro* reportados de los inhibidores de QS en Gram-negativas como la furanona y la vainillina [16, 28, 40, 41]. Tomando como criterio la energía libre de Gibbs igual o superior a los resultados del acoplamiento molecular de la vainilla ( $-\Delta G \geq -5.63 \pm 0.152$ ) con CviR del presente estudio. Los 11 ligandos se compararon con la vainillina con la finalidad de encontrar el mejor inhibidor, seleccionando los valores más altos de  $-\Delta G$  durante las interacciones con el dominio de unión al autoinductor-1 de CviR.

#### **Obtención de los ligandos de las bases de datos ZINC y PubChem: código SMILES y formato SDF**

Los compuestos aromáticos se obtuvieron de la base de datos del ZINC (<http://zinc.docking.org/substances/home/>) [42], con la intención de preparar las moléculas para los estudios posteriores de acoplamiento mediante el uso programa Chimera versión 1.14. Los archivos SDF de cada uno de los

compuestos aromáticos se modificaron a formato mol2 para su uso posterior en la herramienta Autodock Vina. Asimismo, los códigos SMILES (especificación de introducción lineal molecular simplificada) de cada uno de los compuestos aromáticos fueron obtenidos en la base de datos PubChem al dibujar las estructuras químicas en el programa mucle versión 2020. Utilizando la herramienta refine in drawer tool y la herramienta de acoplamiento molecular 1-Click-Docking [37, 38]. Los códigos obtenidos de los 11 compuestos aromáticos se resumen a continuación reportando los códigos SMILES y ZINC. Los datos de los compuestos aromáticos fueron los siguientes: ácido ferúlico (código SMILES code (COc1cc(/C=C/C(=O)O)ccc1O) y código ZINC (ZINC58258)), ácido vanílico (código SMILES (COc1cc(C(=O)O)ccc1O) y código ZINC (ZINC338275)), alcohol vanílico (código SMILES (COc1cc(CO)ccc1O) y código ZINC (ZINC1164388)), ácido hidroxibenzoico (código SMILES (O=C(O)c1ccc(O)cc1) y código ZINC (ZINC332752)), ácido hidroxicinámico (código SMILES (O=C(O)/C=C/c1ccc(O)cc1) y código ZINC (ZINC39811)), catecol (código SMILES (Oc1ccccc1O) y código ZINC (ZINC13512214)), eugenol (código SMILES (C=CCc1ccc(O)c(OC)c1) y el código ZINC (ZINC1411)), isoeugenol (código SMILES



(C/C=C\c1ccc(O)c(OC)c1) y código ZINC (ZINC12405001)), 4-hidroxibenzaldehído (código SMILES (O=Cc1ccc(O)cc1) y el código ZINC (ZINC156709)), protocatecolato (código SMILES (COC(=O)C1=CC(=C(C=C1)O)O) y el código ZINC (ZINC13246)) y vainillina (código SMILES (COc1cc(C=O)ccc1O) y el código ZINC (ZINC000002567933)). La molécula C<sub>6</sub>-AHL; código SMILES (CCCC(=O)CC(=O)NC1CCOC1=O) y código ZINC (ZINC6220). Este último compuesto fue tomado como control de los acoplamientos moleculares elaborados con el regulador transcripcional de QS (CviR) en *C. violaceum* [43].

También, se utilizó la furanona C30 (código SMILES (C1=C(C(=CBr)OC1=O)Br) y el código ZINC (ZINC34279630)) como un inhibidor de QS *C. violaceum* como control para comparar los datos reportados con los resultados obtenidos [16]. Finalmente, se mostraron los mejores acoplamientos de los aminoácidos del regulador CviR de *C. violaceum* y los grupos funcionales de los compuestos aromáticos, para determinar el posible mecanismo de inhibición de cada compuesto aromático con el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR.

Las representaciones de los acoplamientos se

elaboraron mediante modelos de lazos y listones utilizando Chimera versión 1.14 y las interacciones receptor-ligando fueron realizadas por el programa Discovery Studio visualizer versión 2020 [37, 38].

### Estudios *in vitro* de farmacocinética y propiedades fisicoquímicas de los compuestos aromáticos

A partir de los valores más altos de  $-\Delta G$  obtenidos de los resultados de acoplamiento molecular se seleccionaron los mejores inhibidores. Posteriormente, se elaboraron predicciones que consistieron en evaluar los parámetros fisicoquímicos y de toxicidad ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción, por sus siglas) de cada molécula con el programa online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) [44]. El protocolo utilizó los códigos SMILES de cada molécula para obtener diferentes parámetros farmacocinéticos como: la absorción del intestino grueso (GI), la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB: blood-brain barrier, por sus siglas en inglés), el valor de inhibición de la Glucoproteína-P 1 (P-gp), los valores de inhibición de la enzima citocromo oxidasa (CYP) y sus variantes CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4. Además de obtener algunas propiedades fisicoquímicas de cada uno de los compuestos aromáticos seleccionados.

### **Estudios de la concentración inhibitoria (IC50) en ratón por métodos QSAR**

Se utilizó el programa de estimación de toxicidad o T.E.S.T versión 4.2.1 (Toxicity Estimation Programa Tool (por sus siglas en inglés), para estimar la toxicidad en el modelo del ratón de los compuestos aromáticos resultantes del tamiz del acoplamiento molecular. Cuyo protocolo se basó en ingresar los compuestos aromáticos para evaluarlos por medio del esbozo químico en el programa T.E.S.T versión 4.2.1 ingresando los códigos SMILE de cada compuesto aromático. La toxicidad se estimó usando varias metodologías QSAR como: (a) el método jerárquico, en el cual la toxicidad para un compuesto se estima usando el promedio ponderado de las predicciones obtenidas a partir de diferentes modelos matemáticos. Posteriormente, se utilizó una técnica basada en algoritmos para generar modelos para cada compuesto aromático y obtener el valor de toxicidad. (b) El método de la Administración de Medicamentos y Alimentos (Food drugs and administration, FDA, por sus siglas en inglés) que consiste en una predicción para cada sustancia problema por medio de la creación de un modelo que busca sustancias químicas similares al compuesto de prueba. Y (c) el método del vecino más cercano o Nearest Neighbor por sus siglas en inglés, que utiliza la toxicidad prevista de un compuesto químico y se estima tomando

un promedio de tres sustancias similares a la sustancia problema. Todos los descriptores moleculares necesarios se calculan dentro de la herramienta T.E.S.T versión 4.2.1 (<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-programa-tool-test>) [45]. Obteniendo un promedio del valor LD<sub>50</sub> en ratón reportadas en mg/kg y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) por medio de la regresión lineal de la recta en cada uno de los modelos matemáticos creados para cada molécula analizada [46].

### **Análisis de datos**

La energía libre de Gibbs (-ΔG) se consideró como recurso de variación. La comparación de medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey (p ≤ 0.05). El análisis estadístico se realizó con el programa Minitab 2020 [47]. Todos los resultados fueron obtenidos a partir de la media obtenida de los triplicados obtenidos de los programas mcule versión 2021 y Chimera versión 1.14.

## **RESULTADOS**

### **Inhibidores del regulador transcripcional CviR**

En el presente estudio se obtuvieron los valores de energía libre de Gibbs (-ΔG) para el regulador transcripcional de QS (CviR) y su ligando natural C<sub>6</sub>-AHL (-5.63 ± 0.25 y -5.76

$\pm 0.057$ ) usando los programas mcule y Chimera, respectivamente. Además, se consideró como un control positivo al valor de energía de libre de Gibbs obtenido de la vainillina ( $\Delta G = -5.53 \pm 0.14$ ) al considerarse como un inhibidor de QS en *C. violaceum* [28, 40].

Los resultados obtenidos del análisis de acoplamiento molecular de los compuestos aromáticos probados con el regulador CviR de *C. violaceum* se obtuvieron en rangos de energía libre de Gibbs de  $\Delta G = -5.5 \pm 0.26$  y  $\Delta G = -6.53 \pm 0.35$  (ácido hidroxicinámico, respectivamente) utilizando el programa mcule.

Mientras que, los resultados obtenidos de acoplamiento molecular se obtuvieron en rangos de energía libre de Gibbs de  $\Delta G = -5.43 \pm 0.21$  y  $\Delta G = -6.60 \pm 0.30$  (vainillina y el eugenol, respectivamente) utilizando el programa Chimera. En la tabla 1 se muestran los resultados del acoplamiento molecular de los compuestos aromáticos, considerados posibles inhibidores del QS de *C. violaceum*.

De los 11 compuestos aromáticos analizados, los valores de  $-\Delta G$  más altos correspondieron al ácido ferúlico ( $-6.37 \pm 0.21$ ), el ácido hidroxicinámico ( $-6.53 \pm 0.35$ ), el eugenol ( $-6.23 \pm 0.38$ ) y el isoeugenol ( $-6.23 \pm 0.59$ ) utilizando el programa mcule. Y al comparar los resultados de acoplamiento molecular con el programa Chimera, los mejores valores de  $-\Delta G$

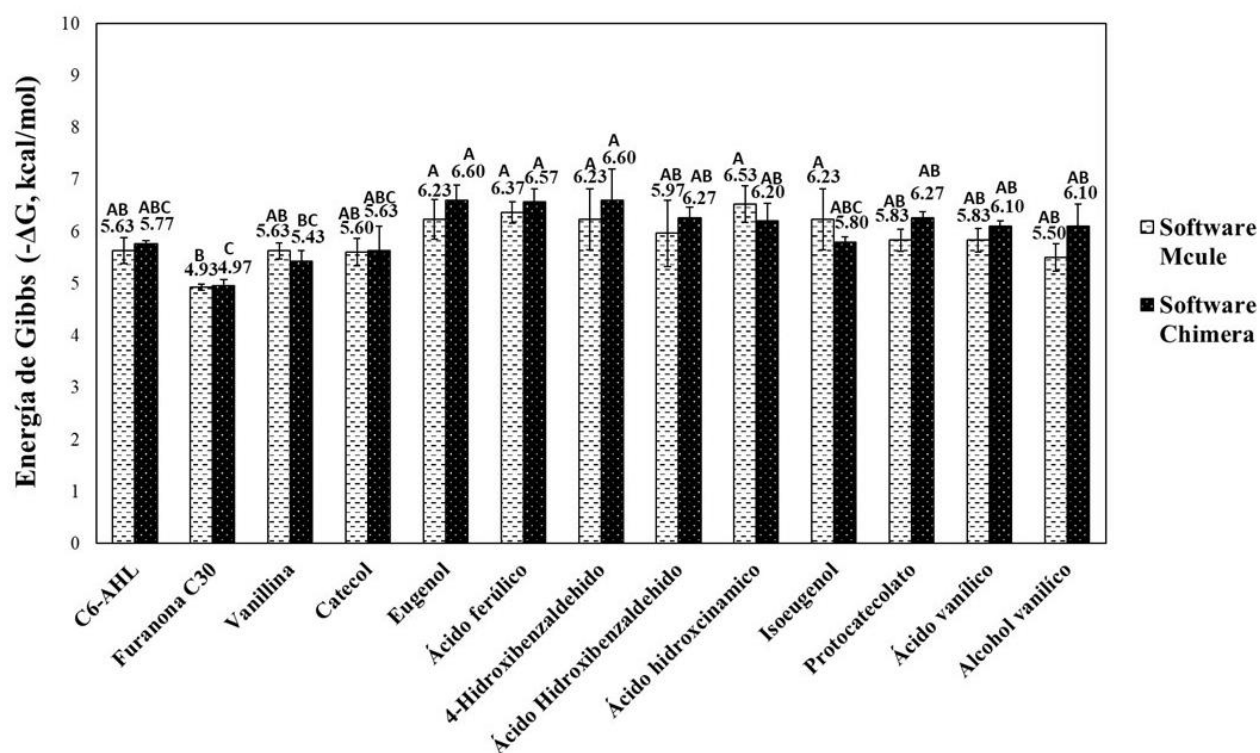
fueron el ácido ferúlico ( $-6.57 \pm 0.25$ ), el ácido hidroxicinámico ( $-6.27 \pm 0.21$ ), el eugenol ( $-6.6 \pm 0.3$ ), el isoeugenol ( $-6.6 \pm 0.61$ ). y el 4-hidroxibenzaldehído ( $6.6 \pm 0.61$ ).

Destacando que, utilizando el programa Chimera se obtuvieron los valores más altos de energía libre de Gibbs. Considerándolo, el mejor método de evaluación del acoplamiento molecular entre los compuestos aromáticos y el regulador transcripcional de QS (CviR) de *C. violaceum*. Proponiendo, al ácido ferúlico, el ácido hidroxicinámico, el eugenol, el isoeugenol y 4-hidroxibenzaldehído como los mejores inhibidores de QS (IQS) del patógeno *C. violaceum*. Debido a que los valores de energía libre de Gibbs fueron superiores a los promedios obtenidos de los inhibidores de QS vainillina ( $5.53 \pm 0.14$ ) y furanona C30 ( $4.89 \pm 0.12$ ) como se observa en la figura 1.

En la tabla 1 se resumen los grupos funcionales de los compuestos aromáticos que interactuaron con los aminoácidos del dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, encontrando la formación de: (1) puentes de hidrógeno, (2) enlace pi-anión, (3) enlace pi-donante unido al hidrógeno, (4) enlace pi-alquilo y (5) las fuerzas de Vander Waals. En cuanto al mecanismo de inhibición del regulador CviR seguido se encontró que comparten los 11 compuestos aromáticos evaluados, compartieron ciertos aminoácidos

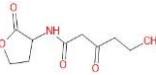
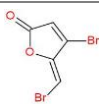
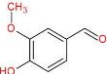

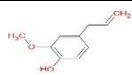
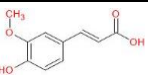

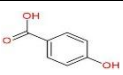
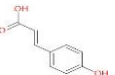
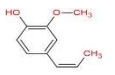
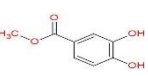
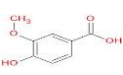
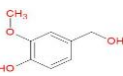
de CviR que se unen al autoinductor-1 (C<sub>6</sub>-AHL) como: Trp103 (anillo de lactona), Ser147 (anillo de lactona), Trp76 (anillo de lactona), Tyr72 (anillo de lactona y grupo acilo), Tyr80 (grupo amino y la cadena lateral de la AHL), Asp89 (grupo amino), Leu77 (cadena lateral de la AHL), Leu47 (cadena lateral de la AHL) y

Val67 (cadena lateral de la AHL). Encontrando como principales resultados que el isoeugenol (9 aminoácidos) y la vainillina (8 aminoácidos) mostraron más interacciones con los aminoácidos que interactúan con los grupos funcionales del ligando natural de CviR (C<sub>6</sub>-AHL) (Tabla 1)



**Figura 1.** Energía libre de Gibbs obtenida a partir del acoplamiento molecular de los compuestos aromáticos y el dominio de unión al autoinductor-1 o AHLs del regulador transcripcional CviR del patógeno *C. violaceum*. El análisis estadístico fue elaborado basándose en la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, utilizando los promedios de la energía libre de Gibbs de cada compuesto aromático obtenido por los 2 programas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre los promedios obtenidos.

**Tabla 1.** Resultados de las interacciones de los compuestos aromáticos y el regulador CviR de *C. violaceum* visualizados en Discovery Studio 2020

Molécula	Compuestos	Grupos funcionales de los compuestos aromáticos que se unen a CviR	Aminoácidos del regulador CviR que se unen a los grupos funcionales de los compuestos aromáticos
<b>C<sub>6</sub>-AHL (ligando natural)</b>		Anillo de lactona Amino: R-NH Ceto: R-C=O Cadena lateral	Ser147, Trp103, Trp76, Phe118, Tyr72 y Asp89 Asp89 y Tyr80 Tyr80 y Asp89 Val67, Leu49 y Leu77
<b>Furanona (inhibidor de QS)</b>		Ciclopentano R-Br R-C=O R-C=CH <sub>2</sub> -Br	Trp103, Tyr80, Ile91, Asp89 y Tyr72 Trp76, Trp103 y Tyr72 Ser147 Tyr80, Leu77 y Leu49
<b>Vainillina (inhibidor de QS)</b>		R-CH <sub>2</sub> -OH R-C-O-CH <sub>3</sub> Anillo aromático	Ser147 Tyr80, Trp76, Leu49 y Leu77 Trp103, Asp89 y Ile91
<b>Catecol</b>		R-OH Anillo aromático	Tyr72 y Trp76 Trp103, Asp89, Ile91 y Ala122
<b>Eugenol</b>		Anillo aromático R-C=C-CH <sub>3</sub> R-O-CH <sub>3</sub>	Ile91, Asp89 y Tyr80 Ala122, Phe118, Trp103 y Phe107 Tyr80, Leu77 y Leu49
<b>Ácido ferúlico</b>		R-O-CH <sub>3</sub> R-OH Anillo aromático	Trp103, Met127 y Trp76 Ser147 Asp89, Leu49 y Tyr72
<b>Hidroxibenzaldehído</b>		R-C=O Anillo aromático R-OH	Tyr72 y Ser147 Asp89, Trp103 y Ile91 Met127
<b>Ácido hidroxibenzoico</b>		COOH Anillo aromático	Ser147 y Tyr72 Phe107, Trp103 y Asp89
<b>Ácido hidroxicinámico</b>		R-OH Anillo aromático	Met127 Trp103, Ile91 y Asp189
<b>Isoeugenol</b>		Anillo aromático R-C=C-CH <sub>3</sub> R-O-CH <sub>3</sub>	Asp89, Ser147 y Tyr72 Trp103, Phe107, Phe118, Ala122 y Met127 Tyr80, Leu49, Leu77 y Tyr72
<b>Protocatecolato</b>		R-O Anillo aromático COOH	Ser147 Tyr80, Tyr72 y Asp89 Met127, Ala122, Phe118, Trp103 y Phe107
<b>Ácido vanílico</b>		Anillo aromático COOH R-O-CH <sub>3</sub>	Ile91, Tyr72 y Asp89 Trp76 Leu77, Tyr80 y Leu49
<b>Alcohol vanílico</b>		R-CH <sub>2</sub> -OH R-O-CH <sub>3</sub> Anillo aromático	Met127 Trp76, Leu77 y Tyr80 Trp103, Ile91, Asp89 y Tyr72

### Análisis de los aminoácidos que conforman el dominio de unión al autoinductor-1 de CviR que se unen a los grupos funcionales de los compuestos aromáticos

En el análisis de las interacciones se observó que de los 6 aminoácidos de CviR que se unieron al anillo de lactona de la C<sub>6</sub>-AHL, 3

aminoácidos fueron los más repetitivos en las visualizaciones de las interacciones receptor-ligando. Encontrando que, el aminoácido Trp103 de CviR formó enlaces con 9 compuestos aromáticos (el catecol, el eugenol, el ácido ferúlico, 4-hidroxibenzaldehído, el

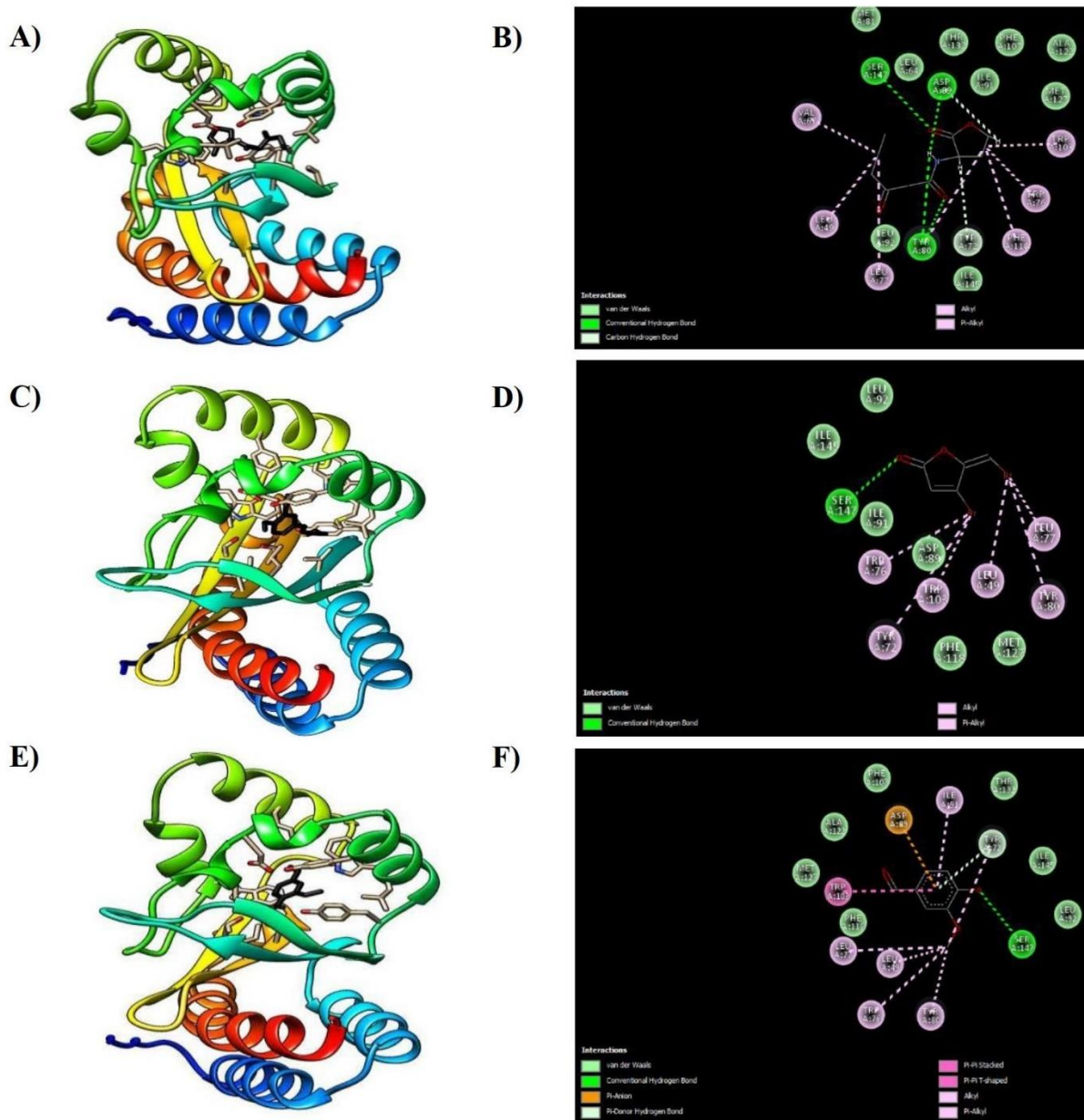
ácido hidroxibenzoico, el ácido hidroxicinámico, el isoeugenol, el protocatecolato y el ácido vanílico). También se identificó que el aminoácido Asp89 se unió a 9 compuestos aromáticos (el catecol, el eugenol, el ácido ferúlico, el 4-hidroxibenzaldehído, el ácido hidroxicinámico, el isoeugenol, el catecolato, ácido vanílico y el alcohol vainílico). Y también formaron interacciones con los inhibidores de QS (furanona C30 y vainillina). Por otro lado, se identificó que el aminoácido Tyr80 de CviR se unió a 5 compuestos aromáticos (el eugenol, el isoeugenol, el protocatecolato, el ácido vanílico y el alcohol vainílico) y a los inhibidores furanona C30 y vainillina.

Se observó que el aminoácido Leu49 de CviR se unió a 4 compuestos aromáticos (el eugenol, el ácido ferúlico, el isoeugenol y el ácido vanílico) y los inhibidores furanona C30 y vainillina. Y finalmente, el aminoácido Leu77 de CviR se unió a 4 compuestos aromáticos (el eugenol, el isoeugenol, el ácido vanílico y el alcohol vainílico). Entendiendo que los 5 aminoácidos resultantes de este estudio son los aminoácidos clave implicados en el mecanismo de inhibición del QS por competencia, formando diferentes enlaces con el dominio de unión del autoinductor-1 del regulador transcripcional de QS (CviR). Las interacciones se llevaron a cabo con varios grupos

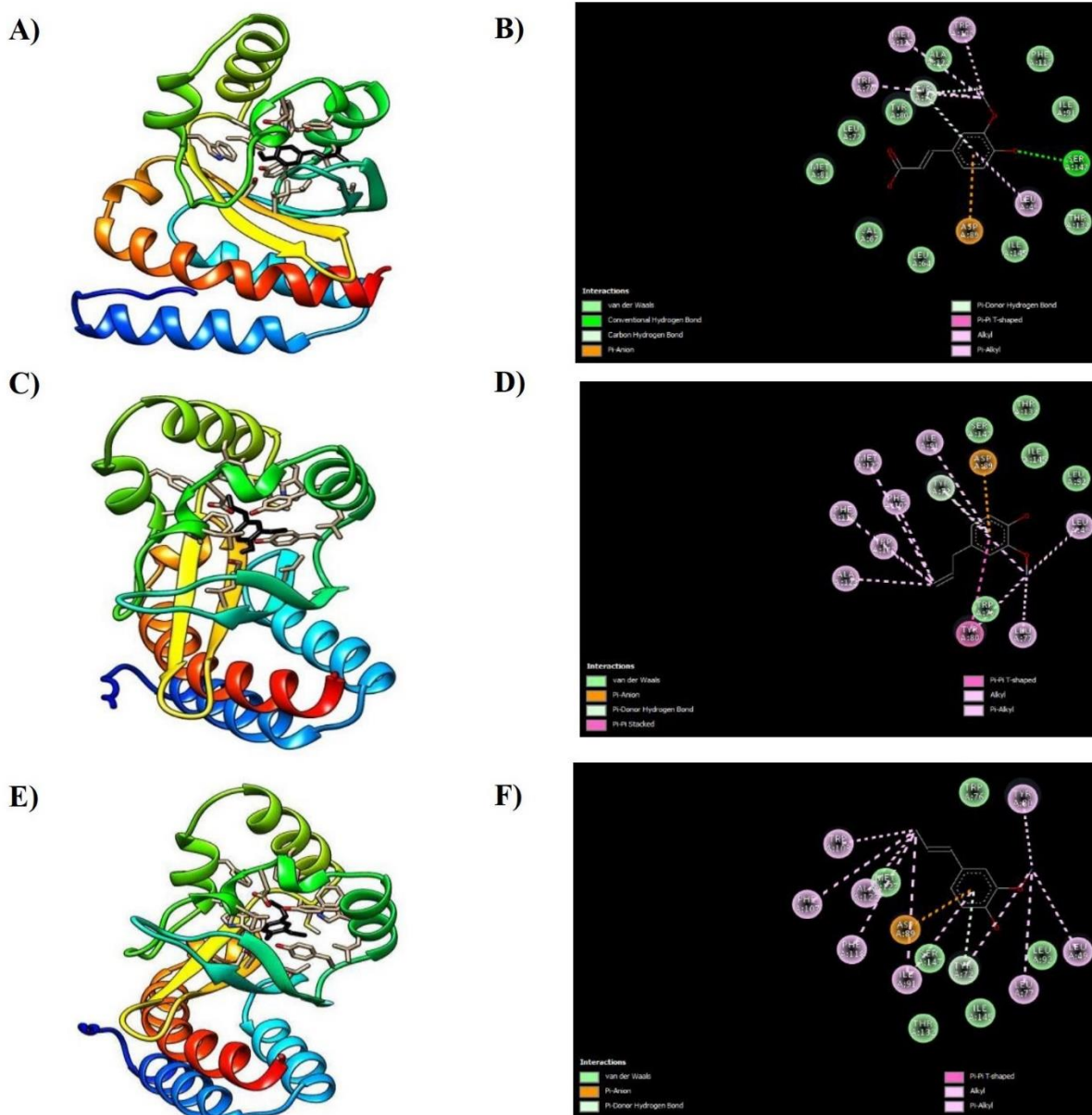
funcionales del autoinductor (el grupo acilo (R-C=O), el anillo aromático) y los grupos funcionales encontrados en la estructura química de los compuestos aromáticos como R-OH, COOH, RC=C-CH<sub>3</sub>, RO-CH<sub>3</sub>, RO, R-CH<sub>2</sub>-OH y el anillo aromático (Tabla 1). Concluyendo que fue posible verificar mediante técnicas *in silico* que los compuestos aromáticos probados en el presente estudio, en su mayoría pueden actuar como inhibidores del regulador transcripcional CviR de patógeno *C. violaceum*.

Los compuestos aromáticos analizados que presentaron mayor energía libre de Gibbs y cuyo efecto inhibitorio fue mayor se muestran en la figura 2. Donde se observan los modelos de lazos y listones resultantes del acoplamiento molecular de cada interacción con CviR. En la figura 2A y 2B se observan los enlaces formados entre el complejo CviR y su ligando natural C<sub>6</sub>-AHL. Y complejos formados por CviR-furanona C30 (figura 2C y 2D) y CviR-vainillina (figura 2E y 3FC).

También, se representaron los compuestos aromáticos que mostraron mayor energía libre de Gibbs con el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR como: ácido ferúlico, eugenol e isoeugenol (figuras 3A-B, 3C-D y 3E-F) luego de someterlos a un tamiz *in silico* de acoplamiento molecular



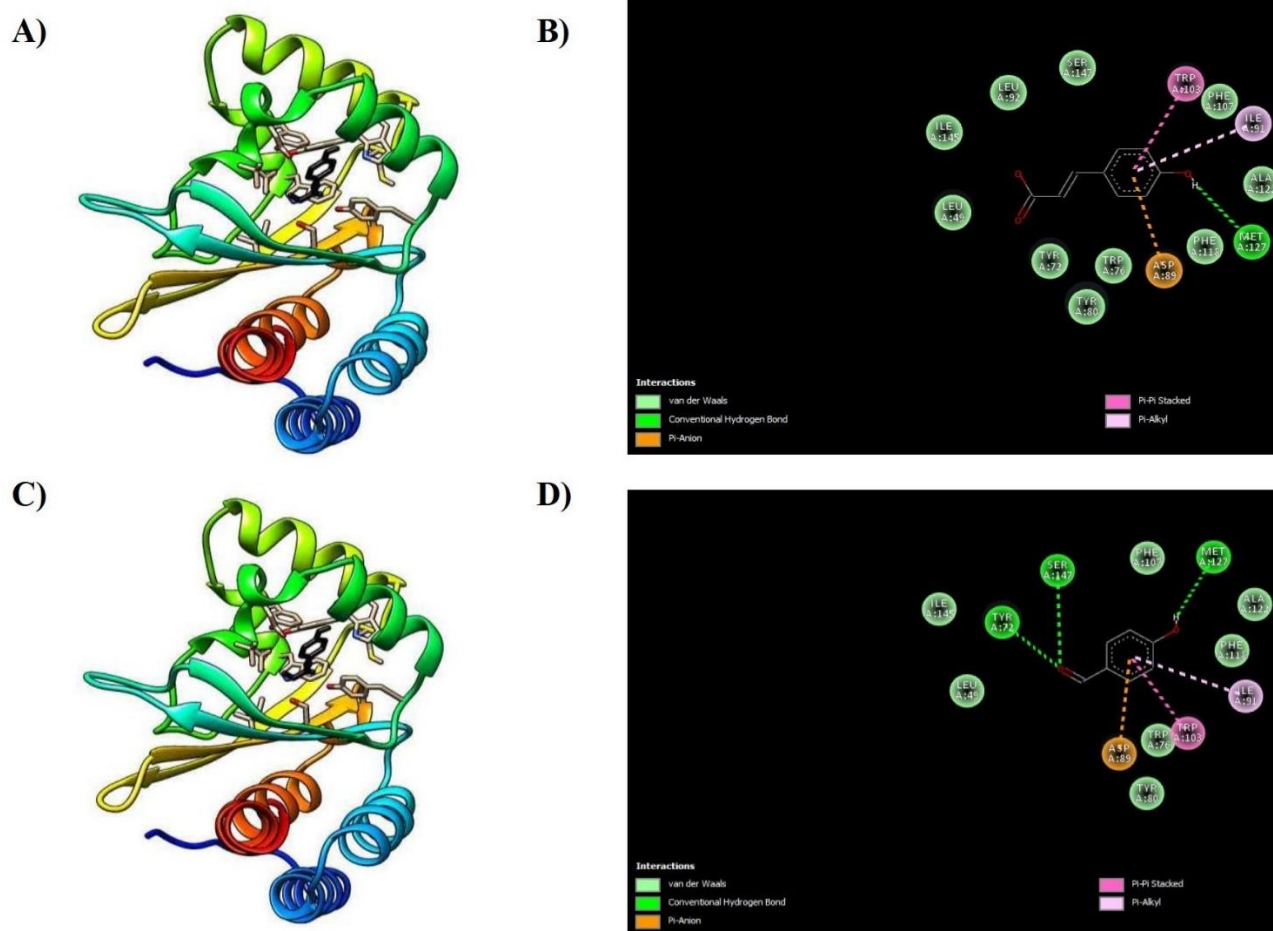
**Figura 2.** Modelo de lazos y listones del acoplamiento molecular de los inhibidores de QS con mayor energía libre de Gibbs ( $-\Delta G$ ) y visualización de los enlaces formados en cada interacción. (A) el ligando natural C<sub>6</sub>-AHL y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (C) la furanona C30 y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (E) la vainillina y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR. Y los diagramas de interacción proteína-ligando que resume los enlaces formados entre de (B) el ligando natural C<sub>6</sub>-AHL y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (D) la furanona C30 y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (F) la vainillina y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR. Los resultados fueron visualizados en los programas Pymol y Discovery studio 2020.



**Figura 3.** Modelo de lazos y listones del acoplamiento molecular de los inhibidores de QS con mayor energía libre de Gibbs ( $-\Delta G$ ) y visualización de los enlaces formados en cada interacción. (A) el ácido ferúlico y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (C) el eugenol y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (E) el isoeugenol y el dominio de unión a las AHLs del regulador transcripcional CviR. Y los diagramas de interacción proteína-ligando que resume los enlaces formados entre de (B) el ácido ferúlico y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (D) el eugenol y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (F) el isoeugenol y el dominio de unión a las AHLs del regulador transcripcional CviR. Los resultados fueron visualizados en los programas Pymol y Discovery studio 2020.

También se representaron los compuestos aromáticos que mostraron mayor energía libre de Gibbs con el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional

CviR tales como: 4-hidroxibenzaldehído y ácido hidroxicinámico (figuras 4A-B y 4C-D) luego de someterlos al tamiz por medio del análisis *in silico* por acoplamiento molecular.



**Figura 4.** Modelo de lazos y listones del acoplamiento molecular de los inhibidores de QS con mayor energía libre de Gibbs ( $-\Delta G$ ) y visualización de los enlaces formados en cada interacción. (A) el ácido hidroxicinámico y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (C) el 4-hidroxibenzaldehído y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR. Y los diagramas de interacción proteína-ligando que resume los enlaces formados por (B) el ácido hidroxicinámico y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, (D) el 4-hidroxibenzaldehído y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR.

## Papel biológico de los compuestos aromáticos

Inicialmente, se describieron las interacciones del ligando natural C<sub>6</sub>-AHL con el regulador transcripcional de QS conocido como CviR, el cual activa positivamente procesos bacterianos por lo tanto su papel biológico es como un regulador transcripcional positivo QS o agónico. Por otro lado, se describió la función antagonista de la furanona, la vainillina, el ácido ferúlico, el eugenol, el isoeugenol, el 4-hidroxibenzaldehído, el ácido hidroxicinámico, el catecol, el ácido hidroxibenzoico, el alcohol vanílico, el protocatecolato y el ácido vanílico. Todos estos compuestos aromáticos presentan un mecanismo antagonista de unión al regulador transcripcional CviR por competencia con el ligando natural C<sub>6</sub>-AHL en el dominio de unión al autoinductor-1. A su vez todos estos compuestos formaron diferentes interacciones con los aminoácidos que se encuentran en el dominio de unión al autoinductor-1 y se caracterizaron porque fueron interacciones no covalentes (enlace  $\pi$ -álcali, enlace por puente de hidrógeno, enlace  $\pi$ -anión, enlace  $\pi$  en forma de T, enlace del hidrógeno con el enlace  $\pi$  y las fuerzas de Van der Waals), las cuales a continuación se describen.

### Enlace $\pi$ -álcali

Este tipo de unión se caracteriza porque hay una

interacción de la nube de electrones  $\pi$  en cada uno de los 11 grupos aromáticos que se unen al grupo alquilo de los aminoácidos de CviR como la leucina, isoleucina, metionina y alanina (Tabla 2).

### Enlace por puente de hidrógeno

Estos enlaces se formaron entre 7 compuestos aromáticos y los aminoácidos ubicados en la cavidad formada por el sitio de unión al autorinductor-1 del regulador transcripcional CviR de *C. violaceum*. cuyo carácter es polar hidrofóbico (Ser, Thr, Tyr y Asp) y los aminoácidos que tienen una cadena lateral R neutral (Met127 y Trp76).

### Enlace $\pi$ -anión

Se identificaron en todos los compuestos aromáticos uniéndose al aminoácido Asp89. El enlace se formó entre el anillo aromático de los compuestos aromáticos y el grupo carboxilo (-COOH) del aminoácido Asp89. Ubicando en la cavidad formada por el sitio de unión al autorinductor-1 del regulador transcripcional CviR de *C. violaceum*. Las excepciones fueron la C<sub>6</sub>-AHL y la furanona C30 que no poseen anillo aromático en su estructura química (Tabla 3).

### Enlace $\pi$ en forma de T

La unión se observó en 8 compuestos aromáticos (Tabla 2), el enlace se basa en la

interacción de la nube de pi-electrones y dos grupos aromáticos, pero en forma de T. Es decir, una nube de electrones lateral del anillo aromático de los compuestos aromáticos y la nube de electrones de los anillos aromáticos de los aminoácidos aromáticos como Trp103 y Tyr80, lo cual modificó el plegamiento original del regulador transcripcional CviR de *C. violaceum*.

### Enlace del hidrógeno con el enlace $\pi$

Se observó en 7 compuestos aromáticos (la vainillina, el ácido ferúlico, el eugenol, el isoeugenol, el alcohol vanílico, el protocatecolato y el ácido vanílico) incluyendo a C<sub>6</sub>-AHL, la unión fue por medio del aminoácido Tyr72 del regulador transcripcional CviR (Tabla 2).

### Fuerzas de Van der Waals

Son descritas como fuerzas residuales, de atracción o repulsión entre moléculas o grupos atómicos. En los resultados del análisis de imágenes se representan las interacciones proteína-ligando y se apreciaron 9 aminoácidos que se unen a C<sub>6</sub>-AHL (Tabla 2).

Las fuerzas de Van der Waals fueron representadas por los aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Val, Leu, Ile y Phe) que tienen la capacidad de interactuar con los grupos funcionales de C<sub>6</sub>-AHL y los inhibidores por

medio de enlaces de hidrogeno para dar forma a la cavidad que conforma el sitio de unión de CviR. Mientras que, se observó que los aminoácidos Met y Tyr contienen grupos funcionales polares con cierto grado de hidrofobicidad, lo cual hace que las fuerzas de Van der Waals estén presentes en la cavidad del regulador CviR.

Además, se percibió que los compuestos aromáticos como el ácido ferúlico, el ácido hidroxibenzoico y el ácido vanílico presentaban 4, 5 y 5 aminoácidos, respectivamente y eran parecidos a los que se unen a la molécula C<sub>6</sub>-AHL de CviR. Sin embargo, la mayoría de los compuestos aromáticos presentaron un mecanismo de unión diferente al dominio de unión al autoinductor-1 de CviR. Solo se observó similitud en los aminoácidos que formaron las fuerzas de Van der Waals en los compuestos aromáticos ácido vanílico y la vainillina.

La tabla 2 resume el papel biológico de cada compuesto aromático analizado en el presente estudio, los enlaces formados por los compuestos aromáticos y los aminoácidos ubicados en el dominio de unión al autoinductor-1 de CviR como: los enlaces  $\pi$ -álcali, el enlace por puente de hidrogeno, el enlace  $\pi$ -anión, el enlace  $\pi$  en forma de T, la unión del hidrogeno con el enlace  $\pi$  y las fuerzas de Van der Waals.

**Tabla 2.** Datos experimentales obtenidos mediante el análisis *in silico* de los aminoácidos ubicados en el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR y los grupos funcionales de los inhibidores de QS.

Compuesto/ PubChem CID	Mecanismo de unión	Papel biológico <i>In vitro</i> con CviR	Enlace $\pi$ -álcali	Enlace por puente de hidrogeno	Enlace $\pi$ -anión	Enlace $\pi$ en forma de T	Unión del H con enlace $\pi$	Fuerzas de Van der Waals
C <sub>6</sub> -AHL, el ligando natural de CviR (119133)	Ligando natural <sup>a</sup>	Agonista	Leu49, Trp76, Leu77, Val77, Trp103 y Phe118	Tyr80, Asp89 y Ser147	-	-	Tyr72	Leu64, Met81, Ile91, Leu92, Phe107, Ala122, Met127, Thr132, y Ile145
Furanona, un inhibidor de QS (140765)	Competitivo <sup>b</sup>	Antagonista	Leu49, Tyr72, Trp76, Leu77, Tyr80 y Trp103	Ser147	-	-	-	Asp89, Ile91, Leu92, Phe118, Met127 y Ile145
Vainillina, un inhibidor de QS (1183)	Competitivo <sup>c</sup>	Antagonista	Leu49, Trp76, Leu77, Tyr80 y Ile91	Tyr72	Asp89	Trp103	Tyr72	Leu92, Phe107, Phe118, Met127, Thr132 y Ile145
Ácido ferúlico (445858)	Competitivo	Antagonista	Leu49, Trp76, Trp103 y Met127	Ser147	Asp89	-	Tyr72	Leu64, Val67, Leu77, Tyr80, Met81, Ile91, Phe118, Ala122, Thr132 y Ile145
Eugenol (3314)	Competitivo	Antagonista	Leu49, Leu77, Ile91, Trp103, Phe107, Ala122, Phe118 y Met127	-	Asp89	Tyr80	Tyr72	Trp76, Leu92, Thr132, Ile145 y Ser174
Isoeugenol (853433)	Competitivo	Antagonista	Leu49, Leu77, Tyr80, Ile91, Trp103, Phe107, Phe118 y Ala122	-	Asp89	-	Tyr72	Trp76, Leu92, Met127, Thr132, Ile145 y Ser147
4-hidroxibenzaldehído (126)	Competitivo	Antagonista	Ile91	Tyr72, Met127 y Ser147	Asp89	Trp103	-	Leu49, Trp76, Tyr80, Phe107, Phe118, Ala122 y Ile145
Ácido hidroxicinámico (637542)	Competitivo	Antagonista	Ile91	-	Asp89	Trp103	-	-
Catecol (289)	Competitivo	Antagonista	Ile91 y Ala122	Tyr72 y Trp76	Asp89	Trp103	-	Tyr80, Phe107, Phe118 y Met127
Ácido hidroxibenzoico (135)	competitivo	Antagonista	Ile91	-	Asp89	Trp103	-	Leu49, Tyr72, Trp76, Leu77, Tyr80, Leu92, Phe107, Phe118, Ala122, Met127, Ile145 y Ser147
Alcohol vanílico (62348)	Competitivo	Antagonista	Trp76, Leu77, Tyr80 y Ile91	Met127	Asp89	Trp103	Tyr72	Leu49, Leu92, Ala122, Phe118, Thr132, Ile145 y Ser147
Protocatecolato (72)	Competitivo	Antagonista	Trp103, Phe107, Phe118 y Ala122	Ser147	Asp89	Tyr80	Tyr72	Leu49, Trp76, Ile91, Thr132, Ile145, Thr191 y Leu192
Ácido vanílico (8468)	Competitivo	Antagonista	Leu49, Leu77 Tyr80 y Ile91	Trp76	Asp89	-	Tyr72	Leu92, Trp103, Phe107, Phe118, Ala122, Met127, Thr132, Ile145, Ser147 y Ala149

<sup>a, b y c</sup> Estudios previos de ligandos e inhibidores de QS [43, 28, 16, 40]. Las visualizaciones de las interacciones ligando-proteína se analizaron utilizando el programa PyMol y se dibujaron con el programa Discovery studio 2020.

## Análisis preclínico *in silico* de los inhibidores de QS

### Estudios de LD<sub>50</sub> en ratón

Los estudios en ratón son conocidos como ensayos preclínicos y son de importancia,

debido a que por medio de programas es posible conocer la concentración a la cual son dañinas ciertas sustancias antes de comenzar con los experimentos en células humanas. En el presente estudio se hizo una predicción de los

valores cercanos de LD<sub>50</sub> en ratón expresada en mg/kg de los 5 mejores compuestos aromáticos resultantes del análisis de acoplamiento molecular. De los cuales se obtuvieron los valores más altos de energía libre de Gibbs, además del análisis del inhibidor furanona C30 y la vainillina. Los resultados obtenidos de LD<sub>50</sub> administrada oralmente en ratón (mg/kg) se resumen en la tabla 3. Observado, que en general los valores de LD<sub>50</sub> se encontraban por debajo de 5000 mg/kg, indicando que no existen efecto tóxico de los compuestos analizados.

**Tabla 3.** Valores de LD<sub>50</sub> obtenidos en el programa T.E.S.T por 3 métodos QSAR

Componente	LD <sub>50</sub> en ratón (mg/kg)	R <sup>2</sup>
Furanona C30	1373±385.18	0.80
Vainillina	1929.62±12.30	0.97
Ácido ferúlico	4750.11±320.13	0.90
Ácido hidroxicinámico	2838.02±82.01	0.89
Eugenol	1879.02±54.97	0.99
4-hidroxibenzaldehído	1903±487.96	0.82
Isoeugenol	2553.55±432.89	1.00

### Estudios de farmacocinética

De acuerdo con el análisis de predicción de absorción gastrointestinal humana se encontró que todos los 5 mejores inhibidores presentaron propiedades fisicoquímicas similares. Debido a que en su mayoría son compuestos insaturados de acuerdo con los diagramas de radar que fueron encontrados en la base de datos del programa SwissADME (datos no mostrados).

Además, son altamente absorbidos por el intestino grueso (IG) y en el BBB. Asimismo, se obtuvieron resultados negativos de inhibición de la glicoproteína-P (P-gp) de cada inhibidor. Mientras que se obtuvieron algunos valores positivos de inhibición de la isoenzima citocromo P450 CYP1A2 por los inhibidores eugenol e isoeugenol. Pero en general se observó que los 5 inhibidores alcanzaron valores aceptables de CYP. Observando que los inhibidores en general no son dañinos para el hígado humano de acuerdo con los resultados ADME y toxicológicos. Y finalmente, el valor de la permeabilidad en la piel de cada componente vario de -6.41 a -5.14 cm/s en los 5 compuestos investigados (Tabla 4).

### DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontraron varios inhibidores del QS de *C. violaceum*, por medio de un tamiz de selección basado en la energía libre de Gibbs obtenida por acoplamiento molecular. Los compuestos aromáticos propuestos en el presente estudio son aceites esenciales (como el eugenol e isoeugenol), sustratos y productos de la bioconversión microbiana (el catecol, el protocatecolato, el ácido ferúlico, el ácido vanílico, la vainillina y el alcohol vanílico) [23, 49]. Además, se tomaron en cuenta algunos compuestos aromáticos que participan en la vía de

degradación beta-ceto-adipato como 4-hidroxibenzaldehído y el ácido p-hidroxibenzoico. Que en conjunto todos estos compuestos aromáticos son reportados como seguros para su consumo y la salud humana por la FDA (Administración de drogas y alimentos, por sus siglas en inglés) [48, 50, 51]. Además, se conoce que los compuestos aromáticos seleccionados poseen efectos protectores, propiedades bioactivas, anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, actividad antiviral, actividad antibacteriana y propiedades inhibitorias de QS en algunos microorganismos Gram-negativos [24, 28, 52-55].

Por otro lado, se sabe que *C. violaceum* tiene

procesos relacionados con la virulencia que a su vez son regulados por el QS como: la actividad exoproteasa, la agregación, la formación de biopelícula, el swarming, la tolerancia al estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno [12]. También, se han publicado casi 200 artículos que utilizan al biosensor *C. violaceum* cepa CV026 como indicador de la presencia de moléculas autoinductoras producidas por bacterias Gram-negativas. Y para probar mediante experimentación *in vitro* e *in silico* un sin fin de inhibidores de QS de distinto origen (vegetal, sintético, extractos naturales, hierbas, aceites esenciales, especias, fitoquímicos y de algunos cultivos) mediante escrutinios muy laboriosos [30, 31].

**Tabla 4.** Propiedades farmacocinéticas de los inhibidores de QS

Modelo	Furanona C30	Vainillina	Ácido ferúlico	Ácido hidroxicinámico	Eugenol	4-hidroxi benzaldehído	Isoeugenol
Absorción por el IG	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Permeación BBB	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Sustrato de la glicoproteína-P (gp-P)	No	No	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP1A2	No	No	No	No	Si	No	Si
Inhibidor de CYP2C19	No	No	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2C9	No	No	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2D6	No	No	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP3A4	No	No	No	No	No	No	No
Permeación en la piel (cm/s)	-6.71	-6.37	-6.41	-6.26	-5.69	-6.09	-5.14

También, la información reportada sobre las estructuras cristalina de la familia de reguladores transcripcionales LuxR y sus homólogos ha permitido descubrir una gran variedad de antagonistas. Sin embargo, esta información no es suficiente, porque es necesario conocer cómo se produce el cambio conformacional o plegamiento del dominio de unión al autoinductor-1, para distinguir entre un "ligando natural" (agonista) y "ligando falso" (antagonista). Por lo que, las estructuras cristalinas de la interacción LuxR-AHL se encuentran disponibles para algunas especies bacterianas, pero es de interés obtener más datos *in vitro* e *in silico* de las estructuras cristalinas de la unión de los reguladores transcripcionales de QS con su ligando natural y algunos antagonistas [56, 57, 58].

A pesar de que no existen muchos estudios descriptivos *in silico* sobre los aminoácidos que forman parte del dominio de unión del autoinductor-1 que interactúen con inhibidores del del regulador transcripcional CviR de *C. violaceum*. Se han reportado algunos estudios comparativos de acoplamiento molecular, describiendo a los aminoácidos que se unen al dominio de unión al autoinductor-1 en el regulador transcripcional CviR. Observando que los aminoácidos clave en la unión al regulador transcripcional son Trp84, Asp97, Ser155, Tyr80, Tyr88 y Leu100 [59, 58]. Otros

estudios reportan 4 aminoácidos diferentes (Met89, Leu72, Arg74 y Asn77), que interactúan con las moléculas autoinductoras C<sub>6</sub>-AHL y C<sub>10</sub>-AHL [42]. Estos reportes fueron comparados con los aminoácidos encontrados en el presente estudio *in silico*, observando la unión de diferentes aminoácidos del regulador CviR con los principales grupos funcionales de los compuestos aromáticos probados. Por lo tanto, el presente estudio reveló el tipo de aminoácidos que se unen a los compuestos aromáticos con el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR del patógeno *C. violaceum*. Encontrando que los aminoácidos se unen por medio de uniones fuertes, mayores a las reportadas por el inhibidor furanona C30, cuyo efecto inhibitorio al igual que los compuestos aromáticos del presente escrutinio han sido observados en varios procesos relacionados con la inhibición del QS en el patógeno *C. violaceum* y otros modelos bacterianos Gram-negativos [24, 28, 29, 60].

El presente estudio fue de importancia para comprender los mecanismos de inhibición *in silico* del QS, basado en la competencia o antagonismo con el ligando natural del dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR, lo cual ha sido observado en otros estudios que han considerado homólogos de LuxR en otros modelos

bacterianos. Describiendo la inactivación de la transcripción de los genes de virulencia regulados por QS [57]. A su vez, se ha demostrado que algunos compuestos naturales se comportan como antagonistas del QS, como la acil-furanona halogenada obtenida del alga marina *Delisea pulchra*. Este compuesto natural puede desplazar a la señal autoinductora 3-oxo-C<sub>6</sub>-AHL del regulador LuxR afín, inhibiendo de este modo la expresión génica mediada por la detección del autoinductor-1 [56, 57]. El mecanismo molecular *in silico* de inhibición de la furanona C30 fue también dislumbrado en el presente estudio mediante el acoplamiento molecular. Encontrando varios aminoácidos que se unen al regulador transcripcional CviR, lo cual sugiere un mecanismo de inhibición competitiva por el dominio de unión al autoinductor-1, siendo un aporte importante del presente estudio el cual fue parecido a las conclusiones de otros trabajos [16]. En otros reportes de acoplamiento molecular se describieron los principales residuos aminoacídicos de las proteínas del tipo LuxR que se unen al inhibidor furanona, encontrando 5 aminoácidos clave (Tyr63, Trp67, Tyr71, Asp80 y Ser134) [61]. Los cuales fueron comúnmente encontrados en el análisis de los enlaces formados con los compuestos aromáticos del presente estudio.

### **Efecto inhibitorio de los compuestos aromáticos con los valores más altos de energía libre de Gibbs**

Se han encontrado pocos casos en donde la vainillina favorece la producción de la biopelícula, sugiriendo que estos compuestos estimulan el sistema QS bacteriano [62].

En la mayoría de los casos se reporta que la vainillina puede inhibir algunos procesos bacterianos regulados por el QS de *C. violaceum*. Por ejemplo, se ha descrito en la inhibición de la formación de biopelículas, que son un problema persistente en la industria del procesamiento de alimentos y de tratamiento de agua residual. Por lo que, la inhibición del QS en *C. violaceum* en las concentraciones adecuadas puede disminuir la formación de las biopelículas bacterianas. Y, por lo tanto, retrasar el deterioro y aumentar la seguridad de la producción de ciertos alimentos [63]. Otros reportes, mencionan que la vainillina tiene una importante utilidad en la prevención de la bioincrustación bacteriana en membranas que se utilizan en la limpieza de aguas residuales [40, 29, 64]. También, se reporta el uso de la vainillina como antibacteriano y se ha observado inhibe la síntesis del autoinductor-1 (AHL), mostrando una inhibición significativa en las moléculas AHL de cadena corta y larga (C<sub>4</sub>-AHL (69%) y 3-Oxo-C<sub>8</sub>-AHL (59.8%)) en bacterias Gram-negativas sin reportar estudios

de interacción por acoplamiento molecular [28, 40, 65]. Por otro lado, en el presente estudio se logró observar un mecanismo *in silico* de inhibición competitiva con el regulador CviR de QS por medio de la unión de los grupos funcionales de la vainillina que compiten por el dominio de unión al autoinductor-1. Lo cual fue comparable con los estudios de Pal y cols., 2020 que comprobaron mediante experimentos *in silico* la habilidad de la vainillina como inhibidor del QS, observando la interacción de la vainillina con ciertos aminoácidos del regulador transcripcional homólogo a LuxR. Estos resultados fueron validados en 2 bacterias Gram-negativas, pero se observó que el modo de acción fue por medio de la unión de 2 aminoácidos clave (Thr131 y Ilu214) de los reguladores transcripcionales de QS (LuxR y LsrR, respectivamente) [41].

En resumen, en la mayoría de los reportes encontrados a la fecha, no se describen estudios de acoplamiento molecular cuya utilidad es comprender el mecanismo de unión de la vainillina y el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR [24, 64].

Por otro lado, se ha observado que el ácido ferúlico, un compuesto obtenido a partir de extracto metanoico de ciertos aceites esenciales puede inhibir el mecanismo de QS de *C.*

*violaceum* cepa CV12472 con una MIC50 de 1000 µg/mL [64]. Disminuyendo la producción de la violaceína, modulando la actividad y la síntesis del autoinductor-1 interfiriendo con los procesos regulados por el par de proteínas CviI/CviR del sistema QS del modelo biosensor [67-69]. A su vez, se reporta que el ácido ferúlico reduce un 72% de la producción del pigmento violaceína de *C. violaceum*, en comparación con otros compuestos fenólicos. Y su efecto es comparable con la furanona, reduciendo el 79% de la producción del pigmento, resultando un buen prospecto como un inhibidor del QS [70]. Finalmente, se reportó la disminución de la transcripción de algunos procesos bacterianos que son regulados por proteínas homólogas a LuxR en bacterias Gram-negativas. Pero a la fecha, no se reportan estudios de acoplamiento molecular para comprender a mayor detalle las interacciones con los residuos aminoacídicos del dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional de QS [24].

Con respecto al eugenol e isoeugenol, ambos compuestos aromáticos son aceites esenciales obtenidos del aceite del clavo, el cual ha sido probado como un antimicrobiano en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que en muchos de los casos son multirresistentes y patógenos oportunistas [71]. Se ha observado que al adicionar el isoeugenol en cultivos

bacterianos se ha disminuido la producción de algunos procesos bacterianos relacionados con la virulencia como: la biopelícula, los genes relacionados como el curli (*cgsABDFG*), los genes de la fimbria (*fimCDH*) y la producción de toxinas (*espD*, *escJ* y *escR*) [26, 72, 73]. A su vez, se ha observado que la mínima concentración inhibitoria del QS o MQSIC del isoeugenol ( $0.062 \text{ mg mL}^{-1}$ ), inhibe la producción de la violaceína de *C. violaceum*, sin embargo, no se reportan estudios *in silico* que describan la interacción del isoeugenol y el regulador transcripcional CviR [71]. Por otro lado, se reporta el efecto sinérgico del eugenol y el carvacol al inhibir procesos regulados por el QS, como ejemplo; las enzimas degradadoras de la pared celular (PCWDEs), la producción de biopelícula y los genes homólogos al par de proteínas homologas a LuxI/LuxR [60]. Por otro lado, en *Pectobacterium* se encontró un estudio de acoplamiento molecular del eugenol y el regulador transcripcional homólogo a LuxR. Obteniendo valores de energía libre de Gibbs de  $-6.2 \text{ kcal/mol}$ , un valor muy similar al del presente estudio, siendo superiores a los valores obtenidos de la furanona C30 obtenido por Joshi y cols., 2016 cuyos resultados fueron comparables con el presente estudio. Considerando, que la furanona presentó un valor bajo de energía libre de Gibbs al estudiar su interacción *in silico* con el regulador

homólogo a LuxR y se reportó efecto inhibitorio mediante experimentación *in vitro* [60].

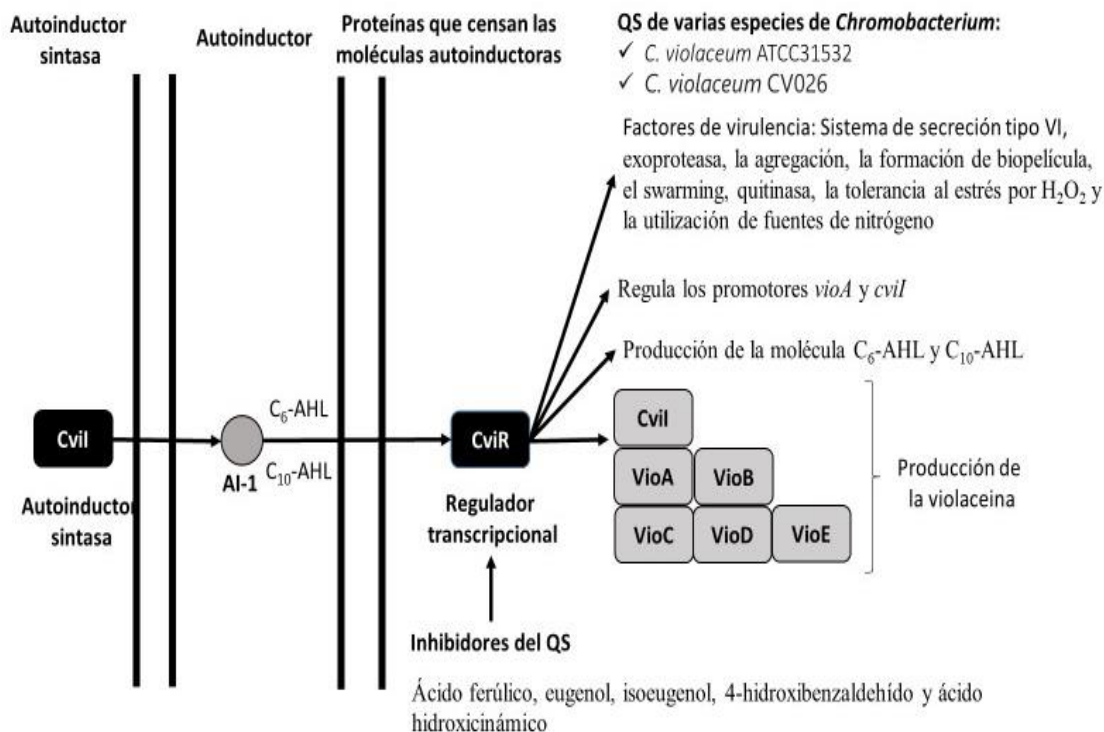
El ácido hidroxicinámico y sus derivados son en general poco polares, poseen una cadena lateral con el grupo poliprenoide, lo cual facilita el transporte a través de la membrana celular bacteriana [67, 74]. De este compuesto, se ha observado actividad antimicrobiana en algunas bacterias Gram-positivas ( $\text{MIC}_{50}=20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y Gram-negativas ( $\text{MIC}_{50}$  en rangos de  $10\text{-}80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) [75]. Por otro lado, se sabe que algunas bacterias como *Ralstonia solonacearum* presentan mecanismos de resistencia al ácido hidroxicinámico (el principal componente de la pared celular de las plantas) [76]. También, se ha identificado el ácido hidroxicinámico a partir de extractos de miel, con efecto inhibitorio en la producción de la violaceína inactivando los genes encargados de la síntesis del pigmento (*vioA*, *vioD* y *vioE*), sin reportar estudios de interacción por acoplamiento molecular para comparar con el presente estudio [77, 78].

Además, en el presente estudio se demostró que el p-hidroxibenzaldehído puede inhibir el QS de *C. violaceum* por medio de un mecanismo antagonista con el regulador transcripcional CviR alcanzando una energía libre de Gibbs alta, mayor a la de los inhibidores de QS

furanona y vainillina. Estos estudios son concordantes con los de Bucio-Cano y cols., 2015 encontrando mediante experimentación *in vitro* por acoplamiento molecular que el compuesto aromático es afín al dominio de unión del autorinductor-1 del regulador transcripcional CviR con una alta energía libre de Gibbs. Además de las observaciones de Choo y cols., 2006 que ayudaron a demostrar que el extracto de las vainas de vainilla puede inhibir el QS de *C. violaceum*, resaltando que el 4-hidroxibenzaldehído forma parte del extracto de las vainas de vainilla y se observó que este microorganismo presentó resistencia al compuesto aromático [28, 79].

Finalmente, para los compuestos aromáticos protocatecolato, catecol, ácido hidroxibenzoico, alcohol vanílico, protocatecolato y el 4-hidroxibenzaldehído cuyos valores de energía libre de Gibbs fueron bajos, no se reportan estudios de inhibición de QS y acoplamiento molecular. Pero se reportan estudios descriptivos del ácido vanílico sobre la inhibición de QS. Este último compuesto aromático inhibe el proceso de adhesión de algunas bacterias Gram-negativas a los catéteres hechos a base de silicona así como el swarming y el swimming. Observando que, las dosis empleadas del compuesto aromático no son letales, obteniendo un máximo crecimiento

bacteriano de 6 UFC/cm<sup>2</sup>, reduciendo un 26-51% la adherencia a los catéteres y se ha apreciado que puede tener efecto sinérgico con otros componentes aromáticos en la disminución de la adherencia a ciertas superficies, sugiriendo al ácido vanílico como un tratamiento antimicrobiano para los catéteres [80]. También, se han encontrado estudios que confirman las propiedades antimicrobianas del ácido vanílico en Gram-negativas, reduciendo el crecimiento bacteriano, actuando como bactericida a ciertas concentraciones (1.5 mg/ml), aumentando la permeabilidad de las células hasta 3 veces su valor original e inhibiendo la expresión de los genes de virulencia (*hilD*, *invH*, *prgH*, *prgK* y *sipA*) que son regulados por QS [81]. Finalmente, se probó el efecto en *C. violaceum* CV026 del ácido vanílico con una MIC de 0.062 mg/ml inhibiendo la producción de violaceína sin reportar estudios de interacción *in silico* de acoplamiento molecular [71]. A continuación, en la figura 5 se muestra un modelo representativo del mecanismo de inhibición de QS de *C. violaceum*. Resumiendo, el efecto de los compuestos aromáticos (el ácido ferúlico, el eugenol, el isoeugenol, el 4-hidroxibenzaldehído y el ácido hidroxicinámico) en la inhibición del QS de *C. violaceum* como la producción de violaceína y algunos genes de virulencia.



**Figura 5.** Mecanismo de inhibición del QS de *C. violaceum* por los compuestos aromáticos ácido ferúlico, eugenol, isoeugenol, 4-hidroxibenzaldehído y ácido hidroxicinámico. Imagen adaptada del KEGG, 2020 y la información reportada por [24, 28, 70, 71, 77-79, 82].

### Enlaces no covalentes formados durante los acoplamientos de los inhibidores con CviR

Las interacciones observadas en el presente estudio demostraron que el aminoácido Trp del regulador transcripcional CviR se une al anillo de lactona del autoinductor-1. Lo cual es de importancia debido a que en los residuos polares del extremo N terminal incluyen 3 triptófanos conservados (Trp), que tienen contacto con una fracción de la AHL, lo cual define su orientación en el sitio de unión de CviR [83]. Por otro lado, se observó semejanza con el aminoácido Asp de CviR, el cual se une al grupo amino de la molécula C<sub>6</sub>-AHL.

También, se asemeja el aminoácido Tyr, que se unió al ácido graso la cadena lateral que conforma la AHL. Y el grupo acilo presente en la cadena lateral de la AHL que se unió a los aminoácidos Ser y Tyr del dominio de unión a las AHLs en el regulador transcripcional CviR [43]. Con respecto a los enlaces  $\pi$  se mostraron coincidencias con el aminoácido Leu del dominio de unión a las AHLs en el regulador transcripcional CviR [43].

Mientras que, las interacciones hidrofóbicas entre la cadena lateral de la AHL y los residuos de aminoácidos dentro de la cavidad de unión

a la AHL sugieren que las interacciones en esos sitios están dominadas por las fuerzas de Van der Waals [84]. Estas últimas interacciones son consideradas fuerzas de atracción o repulsión débiles entre moléculas o grupos atómicos que no son el resultado de enlaces covalentes o interacciones electrostáticas entre iones o grupos iónicos. Observando que los residuos de aminoácidos que conforman la unión a la cadena de acilo de la AHL están menos conservados, lo cual fue comparable y observado en el presente estudio. Además, se sabe que las moléculas autoinductoras pueden ocupar diferentes configuraciones en el dominio de unión al autoinductor-1 de los reguladores del tipo LuxR. Por ejemplo, las AHL cortas se extienden y apuntan hacia el disolvente, mientras que las cadenas largas se doblan y miran hacia al interior del sitio de unión. Aparentemente, las proteínas LuxR utilizan una combinación variada de aminoácidos que brindan cierta flexibilidad en la cavidad que forma el sitio de unión al ligando para lograr la especificidad de unión a las AHL como se observó en el presente estudio [83]. Se sabe que los principales aminoácidos ubicados en el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional homólogo a LuxR y se unen al autoinductor son 6 (Trp57, Tyr61, Asp70, Pro71, Trp85 y Gly113). Estos datos no fueron tan comparables con el presente estudio

ya que se obtuvieron diferentes aminoácidos, lo cual se atribuye al acomodo de cada molécula en el sitio de unión de CviR [85]. Estas diferencias se deben también a que no todos los aminoácidos son conservados en las proteínas del tipo LuxR de acuerdo con las secuencias [86].

Por otro lado, se describen estudios de acoplamiento molecular de la furanona C30 y los reguladores LuxR homólogos. Donde se describe que esta molécula perdió la capacidad de unirse a los mismos aminoácidos que se unen a las AHL (como se observó en el presente estudio). Debido a que hay diferencias entre los grupos funcionales y estructura química de la furanona C30, lo cual inestabiliza al regulador transcripcional del tipo LuxR y es la razón por la cual se observa la inhibición del QS en distintos modelos bacterianos Gram-negativos [87]. Mientras que no se reportan estudios detallados sobre compuestos aromáticos y el acoplamiento molecular con CviR, que describan las interacciones por puente de hidrogeno, enlaces  $\pi$  y Van der Waals.

### **Toxicidad en ratón (LD<sub>50</sub>)**

Los resultados obtenidos de toxicidad en ratón demostraron que los compuestos aromáticos poseen valores de LD<sub>50</sub><5000 mg/kg correspondiendo a una toxicidad de categoría 3, lo cual puede ser interpretado como una

toxicidad ligera [88]. Por otro lado, se encontró en la literatura que el eugenol y el ácido hidroxicinámico mostraron un valor de LD<sub>50</sub> similar al experimental (1929.42/2850 mg/kg, respectivamente) además de una baja toxicidad [75, 51]. Mientras que, los estudios de Talapatra y Sarkar, 2015 reportaron una LD<sub>50</sub> parecida a la obtenida en el presente estudio [89]. Además, de los valores experimentales obtenidos por Salau y cols., 2019 para ácido ferúlico fueron mayores (1772 mg/kg) a los del presente estudio con una toxicidad moderada [90]. Finalmente, los valores reportados para isoeugenol y vainillina fueron un poco superiores a los obtenidos experimentalmente (1560 y 1578.70 mg/kg, respectivamente) indicando que los compuestos aromáticos pueden ser empleados en dosis similares a las encontradas en el presente estudio [51, 91].

### Valores ADME

En el ámbito farmacéutico, el uso de Machine Learning (ML) es apreciado debido a que se pueden predecir propiedades de las moléculas o fármacos para conocer propiedades como: la tasa de absorción, el metabolismo y la excreción, estos parámetros son conocidos como ADME. Además, de que se puede conocer la toxicidad, carcinogenicidad, solubilidad y afinidad de unión de las moléculas [92]. A su vez, se puede conocer sobre los

compuestos que son sustrato o no de la glicoproteína P-gp, un miembro de la familia de transportadores de unión al ATP del tipo ABC. Que son clave para evaluar el flujo de salida de los fármacos por medio de membranas biológicas como las que conforman las vías gastrointestinales y el sistema nervioso central [44].

### La enzima citocromo P450 (CYP) y sus isómeros

El estudio de la interacción de los compuestos aromáticos con los citocromos P450 (CYP) y sus isómeros son de importancia ya que son una superfamilia de isoenzimas clave en la eliminación de fármacos por medio de la biotransformación metabólica. Se ha sugerido que las enzimas CYP y la proteína P-gp pueden ayudar a metabolizar pequeñas moléculas sinérgicamente, para mejorar la protección de tejidos y órganos en los seres humanos. Además, se reporta que algunas moléculas terapéuticas existentes son sustrato de las cinco principales isoformas de CYP. Por lo que, la inhibición de estas isoenzimas es uno de los principales parámetros relacionados con la reactividad de los grupos funcionales de las moléculas, describiendo los efectos en células del hígado por la acumulación de ciertos fármacos y sus metabolitos [44].

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente estudio se ha encontrado que el ácido

ferúlico no posee efecto significativo en la actividad de enzima citocromo P40 (CYP) y las isoenzimas CYP1A2, CYP2E1 y CYP3A4 tal como se observó en los resultados del algoritmo obtenido. Además, se ha observado que en células HaCaT (una línea celular de queratinocitos aneuploides inmortales transformados espontáneamente de piel humana adulta), que el ácido ferúlico cumple un papel no tóxico en las enzimas citocromo y protege contra el daño oxidativo [64].

Con respecto a la vainillina se ha demostrado mediante experimentación *in vitro* que este compuesto aromático no presentó efecto significativo en la actividad de las cinco enzimas citocromo CYP450 humanas como se observó en los resultados [93].

Del eugenol no se ha observado efecto inhibitorio aparente en la familia de citocromos CYP450 [94]. Pero, otros autores reportan que el eugenol inhibe fuertemente la actividad de CYP1A1 y CYP1B1, un efecto parecido al encontrado mediante las herramientas *in silico* parecido a los resultados obtenidos [95, 96]. Y finalmente, del ácido hidroxicinámico se ha demostrado la interacción con la familia de enzimas citocromo P450 (CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4) lo cual fue contrario a lo encontrado en el presente estudio [97, 98].

## CONCLUSIONES

El presente estudio fue de interés debido a que es un completo análisis de las interacciones de los grupos funcionales de los compuestos aromáticos y los aminoácidos que conforman el dominio de unión al autoinductor-1 del regulador transcripcional CviR de *C. violaceum*. Concluyendo que en general la mayoría de los inhibidores compite por el sitio de unión de las AHLs en CviR, los 5 compuestos aromáticos seleccionados son inhibidores potenciales de CviR alcanzando valores de energía de Gibbs mayores a furanona y vainillina. Y que los aminoácidos Trp103, Asp89, Tyr80, Leu49 y Leu77 fueron clave en la unión de los inhibidores con el dominio de unión al autoinductor-1 en el regulador transcripcional CviR.

Se produjo evidencia *in silico* del potencial inhibitorio de los 5 compuestos aromáticos resultantes del tamiz de acoplamiento molecular (el ácido ferúlico, el eugenol, el isoeugenol, el 4-hidroxibenzaldehído y el ácido hidroxicinámico). También se demostró que el isoeugenol (9 aminoácidos) y la vainillina (8 aminoácidos) mostraron un mecanismo de unión parecido al del autoinductor-1. Además, el mecanismo de inhibición es por medio del bloqueo del dominio de unión a las AHL de

CviR, observando que los aminoácidos de CviR se unen de forma diferente a los compuestos aromáticos por medio de interacciones no covalentes con el anillo aromático de cada compuesto inhibidor como el enlace puente de hidrogeno, los diferentes enlaces  $\pi$  y las fuerzas de Van der Waals. Lo cual permite un cierto plegamiento del regulador CviR al interactuar con los inhibidores, demostrando un mecanismo de competencia con el ligando natural C<sub>6</sub>-AHL. Además, se encontró que los compuestos aromáticos resultantes del análisis por acoplamiento molecular no presentaron efecto tóxico en el modelo de ratón y no se observó efecto elevado en la inhibición de la familia de los citocromos (CYP). Lo cual es de utilidad debido a que no pueden inhibir la mayor ruta de eliminación de fármacos y productos secundarios en el ser humano. Por ello, se recomienda aplicar estos componentes mediante experimentación *in vitro* para estudiar su efecto en este patógeno, para derivar investigaciones que utilicen inhibidores basados en la sinergia de los compuestos aromáticos del presente estudio. Con la finalidad de conocer sus efectos sobre la atenuación de la virulencia, y confirmar la aplicabilidad en posteriores estudios *in vivo* de los compuestos aromáticos encontrados y conocer más a detalle el mecanismo de inhibición del QS en *C. violaceum*.

## CONFLICTO DE INTERESES

La autora declara que no tiene conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

- [1]. Durán N, Menck CF. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. Crit Rev Microbiol. 2001; 27:201-222.
- [2]. Fantinatti-Garboggini F, Almeida RD, Portillo VDA, Barbosa TA, Trevilato PB, Neto CER, Brocchi M. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. Genet Mol Res. 2004; 3:134-174.
- [3]. Moretti E, Baggi Menozzi F, Elzi L, Lepori M. *Chromobacterium violaceum* bacteraemia: a new entity in Switzerland. SWISS Med Wkly. 2020; 150:1-2.
- [4]. Otokunefor K, Giwa D. Preliminary assessment of antibacterial ability of *Chromobacterium violaceum* isolated from a water body in Port Harcourt, Rivers State Nigeria. Nig J Pharm Appl Sci Res Sci. 2020; 9:9-14.
- [5]. Yang CH, Li YH. *Chromobacterium violaceum* infection: a clinical review of an important but neglected infection. J Chin Med Assoc. 2011; 74:435-441.
- [6]. Olalekan A, Itua F, Mutiu B, Egwuatu T, Akinloye O, Iwalokun B. Case report on pleural

empyema thoracis and urinary tract infection caused by *Chromobacterium violaceum* from Lagos, Nigeria. Case Rep Med. 2019; 1-6.

[7]. Karthik R, Pancharatnam P, Balaji V. Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia in a South Indian adult. J Infect Dev Ctries. 2012; 6:751-755.

[8]. Swain B, Otta S, Sahu KK, Panda K, Rout S. Urinary tract infection by *Chromobacterium violaceum*. J Clin Diagnostic Res. 2014; 8:1-2.

[9]. Richard KR, Lovvorn JJ, Oliver SE, Ross SA, Benner KW, Kong MY. *Chromobacterium violaceum* sepsis: rethinking conventional therapy to improve outcome. Am J Case Rep. 2015; 16:740-744.

[10]. Parajuli NP, Bhetwal A, Ghimire S, Maharjan A, Shakya S, Satyal D, Khanal PR. Bacteremia caused by a rare pathogen-*Chromobacterium violaceum*: a case report from Nepal. Int J Gen. Med. 2016; 9:441-446.

[11]. Rekha PD, Vasavi HS, Vipin C, Saptami K, Arun AB. A medicinal herb *Cassia Alata* attenuates quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol. 2017; 64:231-238.

[12]. De Oca-Mejía MM, Castillo-Juárez I, Martínez-Vázquez M, Soto-Hernández M, García-Contreras R. Influence of quorum sensing in multiple phenotypes of the bacterial

pathogen *Chromobacterium violaceum*. Pathog Dis. 2015; 73:1-4.

[13]. Devescovi G, Kojic M, Covaceuszach S, Cámara M, Williams P, Bertani I, Venturi V. Negative regulation of violacein biosynthesis in *Chromobacterium violaceum*. Front Microbiol. 2017; 8:1-11.

[14]. Yin H, Deng Y, Wang H, Liu W, Zhuang X, Chu W. Tea polyphenols as an ant virulence compound disrupt quorum-sensing regulated pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. Sci rep. 2015; 5:1-12.

[15]. Bouyahya A, Dakka N, ET-Touys A, Abrini J, Bakri Y. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. Asian Pac J Trop Med. 2017; 10:729-743.

[16]. Martinelli D, Grossmann G, Séquin U, Brandl H, Bachofen R. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. BMC microbiol. 2004; 4:1-10.

[17]. Kim C, Kim J, Park HY, Park HJ, Lee JH, Kim CK, Yoon J. Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 80:37-47.

[18]. Karnjana K, Soowannayan C, Wongprasert K. Ethanolic extract of red seaweed *Gracilaria fisheri* and furanone

eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 2019; 88:91-101.

[19]. Proctor CR, Mccarron PA, Ternan NG. Furanone quorum-sensing inhibitors with potential as novel therapeutics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol.* 2020; 69:195-206.

[20]. Moon KD, Delaquis P, Toivonen P, Stanich K. Effect of vanillin on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in a model apple juice medium and in apple juice. *Food Microbiol.* 2006; 23:169-174.

[21]. Yemiş GP, Pagotto F, Bach S, Delaquis P. Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Comebacker* species. *J Food Port.* 2011; 74: 2062-2069.

[22]. Cava-Roda RM, Taboada-Rodríguez A, Valverde-Franco M T, Marín-Iniesta F. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in milk. *Food Bioproc Tech.* 2012; 5:2120-2131.

[23]. Zamzuri NA, Abd-Aziz S, Rahim RA, Phang LY, Alitheen NB, Maeda T. A rapid colorimetric screening method for vanillic acid

and vanillin-producing bacterial strains. *J Appl Microbiol.* 2014; 116:903–10.

[24]. Ugurlu A, Yagci AK, Ulusoy S, Aksu B, Bosgelmez-Tinaz G. Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016; 6:698-701.

[25]. Ding T, Li Y. Quorum sensing inhibitory effects of vanillin on the biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* P07 by transcriptome analysis. *Int J Food Sci Technol.* 2020; 5:275-292.

[26]. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 2013; 6:1451-1474.

[27]. Arya SS, Sharma MM, Das RK, Rookes J, Cahill D, Lenka SK. Vanillin mediated green synthesis and application of gold nanoparticles for reversal of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Heliyon.* 2019; 5:1-11.

[28]. Choo JH, Rukayadi Y, Hwang, JK. Inhibition of bacterial Quorum Sensing by vanilla extract. *Lett Appl Microbiol.* 2006; 42: 637-641.

[29]. Ponnusamy K, Kappachery S, Thekettle M, Song JH, Kweon, JH. Anti-biofouling property of vanillin on *Aeromonas hydrophila*

initial biofilm on various membrane surfaces. World J Microbiol Biotechnol. 2013; 29:1695-1703.

[30]. Bai AJ, Rai VR. Quorum sensing inhibitors from phytochemicals and food sources and their potential applications in food quality. Functional foods and biotechnology: biotransformation and analysis of functional foods and ingredients. 2020; 140:420-443.

[31]. Harrison AM, Soby SD. Reclassification of *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and its quorum biosensor mutant CV026 to *Chromobacterium subtsugae*. AMB Express. 2020; 10:1-7.

[32]. García-Contreras R, Pérez-Eretza B, Jasso-Chávez R, Lira-Silva E, Roldán-Sánchez JA, González-Valdez A, Maeda T. High variability in quorum quenching and growth inhibition by furanone C30 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. Pathog Dis. 2015; 73:1-5.

[33]. Rémy B, Mion S, Plener L, Elias M, Chabrière E, Daudé D. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective. Front Pharmacol. 2018; 9:1-17.

[34]. Bouyahya A, EL Omari N, Guaouguaou FE, Benali T, Chamkhi I. Quorum sensing as molecular target to fight against infectious diseases. In quorum sensing: microbial rules of life. American Chemical Society. 2020; 67-85.

[35]. Majik MS, Gawas UB, Mandrekar VK. Next generation quorum sensing inhibitors: Accounts on structure activity relationship studies and biological activities. Bioorg Med Chem. 2020; 28:1-20.

[36]. Ding T, Li T, Li J. Discovery of quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas fluorescens* P07 by using a receptor-based pharmacophore model and virtual screening. LWT. 2019; 109:171-178.

[37]. Odhar HA, Rayshan AM, Ahjel SW, Hashim AA, Albeer AAMA. Molecular docking enabled updated screening of the matrix protein VP40 from Ebola virus with millions of compounds in the mcule database for potential inhibitors. Bioinformation. 2019; 15:627-632.

[38]. Butt SS, Badshah Y, Shabbir M, Rafiq M. Molecular docking using chimera and autodock vina software for nonbioinformaticians. JMIR Bioinformatics and Biotechnology. 2020; 1:1-25.

[39]. Kalia VC, Prakash J, Koul S, Ray S. Quorum sensing and its inhibition: biotechnological applications. In quorum sensing and its biotechnological applications. Springer, Singapore. 2018; 3-16.

[40]. Ponnusamy K, Paul D, Kweon JH. Inhibition of quorum sensing mechanism and *Aeromonas hydrophila* biofilm formation by

vanillin. J Environ Eng Sci. 2009; 26:1359-1363.

[41]. Pal S, Qureshi A, Purohit HJ. Metagenomic insight towards vanillin-mediated membrane biofouling prevention: In silico docking Validation. Curr Microbiol. 2020; 77: 2233-2247.

[42]. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. J Chem Inf Model. 2012; 52:1757-1768.

[43]. Chen G, Swem LR, Swem DL, Stauff DL, O'loughlin CT, Jeffrey PD, Hughson FM. A strategy for antagonizing quorum sensing. Mol cell. 2011; 42: 199-209

[44]. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci rep. 2017; 7(1):1-13.

[45]. Página del uso e interpretación del programa T.E.S.T. <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>. Revisada en diciembre 2020.

[46]. Alin, A. Minitab. Wiley Interdiscip Rev Comput Stat. 2010; 2(6): 723-727.

[47]. Mathew S, Abraham TE. Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. Crit Rev Microbiol. 2006; 32:115-125.

[48]. Lagunin A, Zakharov A, Filimonov D, Poroikov V. QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction. Mol inform. 2011; 30(2-3):241-250.

[49]. Paz A, Carballo J, Pérez MJ, Domínguez JM. Bacillus aryabhattai BA03: a novel approach to the production of natural Value-added compounds. World J. Microbiol. Biotechnol. 2016; 32:1-11.

[50]. Ito N, Itakura M, Eda S, Saeki K, Oomori H, Yokoyama T, Minamisawa K. Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate, 4-hydroxybenzoate and protocatechuate. Microbes Environ. 2006; 21:240-250.

[51]. Página de la FDA. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cf>. Revisada en 5 de febrero del 2021.

[52]. Widowati Antioxidant and anti-aging assays of Oryza sativa extracts, vanillin and coumaric acid. J Nat Remedies. 2016; 16:88-99.

[53]. Arya SS, Sharma MM, Rookes JE, Cahill DM, Lenka SK. Vanilla modulates the activity of antibiotics and inhibits efflux pumps in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Biología. 2020; 76:781-791.

[54]. Gandhi GR, Vasconcelos ABS, Haran GH, DA Silva Calisto VK, Jothi G, Quintans

JDSS, Gurgel RQ. Essential oils and its bioactive compounds modulating cytokines: A systematic review on anti-asthmatic and immunomodulatory properties. *Phytomedicine*. 2019; 73:1-37.

[55]. Ramadoss DP, Sivalingam N. Vanillin extracted from Proso and Barnyard millets induce apoptotic cell death in HT-29 human colon cancer cell line. *Nutr Cancer*. 2020; 72:1422-1437.

[56]. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiol*. 2006; 152:895-904.

[57]. Hirakawa H, Tomita H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2013; 4(114):1-14.

[58]. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, Gardocki C. The protein data bank. *Acta crystallographica section D: Biological Crystallography*. 2002; 58:899-907.

[59]. Ravichandran V, Zhong L, Wang H, Yu G, Zhang Y, Li A. Virtual screening and biomolecular interactions of CviR-based quorum sensing inhibitors against *Chromobacterium violaceum*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:1-12.

[60]. Joshi JR, Khazanov N, Senderowitz H,

Burdman S, Lipsky A, Yedidia I. Plant Phenolic volatiles inhibit quorum sensing in *Pectobacteria* and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. *Sci Rep*. 2016; 6:1-15.

[61]. De Almeida FA, Pinto UM, Vanetti MCD. Novel insights from molecular docking of SdiA from *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* with quorum sensing and quorum quenching molecules. *Microb pathog*. 2016; 99:178-190.

[62]. Plyuta V, Zaitseva J, Lobakova E, Zagorskina N, Kuznetsov A, Khmel I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*. 2013; 121:1073-1081.

[63]. Skandamis PN, Nychas GJE. Quorum sensing in the context of food microbiology. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78:5473-5482.

[64]. Li T, He B, Mei Y, Wang D, Sun X, Li J. Inhibitory effect of vanillin on the virulence factors and biofilm formation of *Hafnia alvei*. *LWT*. 2019; 102:223-229.

[65]. Erandapurathukadumana Sreedharan H, Cherukara Chellappan H, Selvanesan P, Garvasis J. Quorum sensing mediated response of *Achromobacter denitrificans* SP1 towards prodigiosin production under phtAlate stress. *J Basic Microbiol*. 2020; 60:758-767.

[66]. Zhang J, Xu F, Yao L, Wang L, Wang, M,

Wang G. Ethanol extract of *Campsis grandiflora* flower and its organic acid components have inhibitory effects on autoinducer type 1 quorum sensing. *Molecules*. 2020; 25:1-15.

[67]. Monte J, Abreu AC, Borges A, Simões LC, Simões M. Antimicrobial activity of selected phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and their biofilms. *Pathog*, 2014; 3:473-498.

[68]. Snoussi M, Noumi E, Punchappady-Devasya R, Trabelsi N, Kanekar S, Nazzaro F, AL-Sieni A. Antioxidant properties and anti-quorum sensing potential of *Carum copticum* essential oil and phenolics against *Chromobacterium violaceum*. *Int J Food Sci Technol*. 2018; 55:2824-2832.

[69]. Bound DJ, Murthy PS, Negi PS, Srinivas P. Evaluation of anti-quorum sensing and antimutagenic activity of 2, 3-unsaturated and 2, 3-dideoxyglucosides of terpene Phenols and alcohols. *LWT*. 2020; 122:1-8.

[70]. Rodríguez AC, Oliveira BD, Silva ERD, Sacramento NTB, Bertoldi MC, Pinto UM. Anti-quorum sensing activity of Phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry). *J Food Sci Technol*. 2016; 36:337-343.

[71]. Ahmad A, Viljoen AM, Chenia HY. The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing. *Lett Appl Microbiol*. 2015; 60:8-19.

[72]. Faleiro ML, Miguel MG. Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. In fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils, and their components (pp. 65-94). Academic Press. 2013.

[73]. Baygar T. The inhibition effects of eugenol and pulegone on *Stenotrophomonas maltophilia*: an opportunistic pathogen. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2020; 16:23-29.

[74]. García-Ruiz A, Moreno-Arribas MV, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B. Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2011; 145:426-431.

[75] Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric*. 2015; 96:2952-2962.

[76]. Meng F, Babujee L, Jacobs JM, Allen C. Comparative transcriptome analysis reveals cool virulence factors of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *PloS One*. 2015; 10:1-22.

[77]. Truchado P, López-Gálvez F, GIL MI, Tomás-Barberán FA, Allende A. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities

of honeys and the relationship with individual Phenolics. Food Chem. 2009; 115:1337-1344.

[78]. Gemiarto AT, Ninyio NN, Lee SW, Logis J, Fatima A, Chan EWC, Lim CSY. Isoprenyl caffeate, a major compound in manuka propolis, is a quorum-sensing inhibitor in *Chromobacterium violaceum*. ALJMAO. 2015; 108(2):491-504.

[79]. Bucio-Cano A, Reyes-Arellano A, Correa-Basurto J, Bello M, Torres-Jaramillo J, Salgado-Zamora H, Avila-Sorrosa A. Targeting quorum sensing by designing azoline derivatives to inhibit the N-hexanoyl homoserine lactone-receptor CviR: Synthesis as well as biological and theoretical evaluations. Bioorg Med Chem. 2015; 23: 7565-7577.

[80]. Bernal-Mercado AT, Gutiérrez-Pacheco MM, Encinas-Basurto, D Mata-Haro V, López-Zavala AA, Islas-Osuna MA, Ayala-Zavala JF. Synergistic mode of action of catechin, vanillic and protocatechuic acids to inhibit the adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* on silicone surfaces. J Appl Microbiol. 2020; 128:387-400.

[81]. Alvarado-Martinez Z, Bravo P, Kennedy NF, Krishna M, Hussain S, Young AC, Biswas D. Antimicrobial and antivirulence impacts of Phenolics on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Antibiotics. 2020; 9:1-16.

[82]. Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M,

Hirakawa M, Itoh M, Yamanishi Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. Nucleic Acids Res. 2017; 36(suppl\_1):480-484.

[83]. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol. 2016; 14(9):576-588.

[84]. Davis RM, Muller RY, Haynes KA. Can the natural diversity of quorum-sensing advance synthetic biology? Front Bioeng Biotechnol. 2015; 3(30):1-10.

[85]. Rajput A, Kumar M. Computational exploration of putative LuxR Solos in archaea and their functional implications in quorum sensing. Front microbiol. 2017; 8(798):1-16.

[86]. Wu H, Li M, Guo H, Zhou H, Li B, Xu Q, He J. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* VqmA-ligand-DNA complex provides insight into ligand-binding mechanisms relevant for drug design. J Biol Chem. 2019; 294(8):2580-5171.

[87]. Bottomley MJ, Muraglia E, Bazzo R, Carfi A. Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. JBC. 2007; 282(18):13592-13600.

[88]. Página de rangos de toxicidad en ratón. Disponible en:

<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/toxicidad-salud-humana>).

Revisado 15 de enero del 2021.

[89]. Talapatra SN, Sarkar A. Acute toxicity prediction of synthetic and natural preservatives in rat by using QSAR modeling software. *Int J Adv. Res.* 2015; 3(7):1424-1438.

[90]. Salau VF, Erukainure OL, Ibeji CU, Olasehinde TA, Koorbanally NA, Islam MS. Ferulic acid modulates dysfunctional metabolic pathways and purinergic activities, while stalling redox imbalance and cholinergic activities in oxidative brain injury. *Neurotox Res.* 2019; 1-12.

[91]. Ingvast-Larsson JC, Axén VC, Kiessling AK. Effects of isoeugenol on *in vitro* neuromuscular blockade of rat phrenic nerve-diaphragm preparations. *Am J Vet Res.* 2003; 64(6):690-693.

[92]. Elton DC, Boukouvalas Z, Butrico MS, Fuge MD, Chung PW. Applying machine learning techniques to predict the properties of energetic materials. *Sci rep.* 2018; 8(1):1-12.

[93]. Chen XM, Wei M, Zhang HM, Luo CH, Chen YK, Chen Y. Effect of vanillin and ethyl vanillin on cytochrome P450 activity *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(6):1897-1901.

[94]. Zhang L, Li-Fang Zhou, Zhang T, Ai-Hong Yang. Simultaneous evaluation of inhibition on human CYP450 of asarum volatile oil by a cocktail approach. *Destech Transactions on Biology and Health.* 2018; 271-276.

[95]. Han EH, Hwang YP, Jeong TC, Lee SS, Shin JG, Jeong HG. Eugenol inhibit. 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: bifunctional effects on CYP1 and NAD (P) H: quinone oxidoreductase. *FEBS Lett.* 2007; 581(4):749-756.

[96]. Zehetner P, Höferl M, Buchbauer G. Essential oil components and cytochrome P450 enzymes: a review. *Flavour Fragr J.* 2019; 34(4):223-240.

[97]. Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Zsidó BZ, Hetényi C, Mladěnka P, Poór M. Testing the pharmacokinetic interactions of 24 colonic flavonoid metabolites with human Serum albumin and cytochrome P450 enzymes. *Biomolecules.* 2020;10(3):1-19.

[98]. Basheer L, Kerem Z. Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 1-16.