



INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSGRADO DE BOTÁNICA

**EFFECTO REGULADOR DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE SEMILLAS OLEAGINOSAS EN EL SISTEMA DE
PERCEPCIÓN DE QUÓRUM DE *Chromobacterium
violaceum*.**

PRESENTA
MACRINA PÉREZ LÓPEZ

T E S I S
COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: EFECTO REGULADOR DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE SEMILLAS OLEAGINOSAS EN EL SISTEMA DE PERCEPCIÓN DE QUÓRUM DE *Chromobacterium violaceum*, realizada por la alumna: Macrina Pérez López, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA.

CONSEJO PARTICULAR:

CONSEJERO:



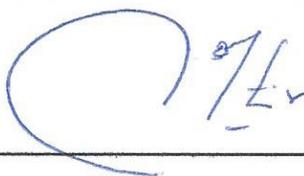
Dr. R. Marcos Soto Hernández

ASESOR:



Dr. Israel Castillo Juárez

ASESOR:



Dr. Mariano Martínez Vázquez

ASESOR:



MC. Rubén San Miguel Chávez

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Septiembre 2015.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haber financiado mis estudios de posgrado (Becario n° 302218) y otorgarme los apoyos complementarios para mujeres indígenas becarias CONACyT 2014 (2) y 2015 (1).

Al Fideicomiso COLPOS 2013. Proyecto 167304. Estudio fitoquímico de especies de uso medicinal en México con actividad inhibidora de la comunicación bacteriana.

Al apoyo complementario del Programa Cátedras-CONACyT 2014. Proyecto 2112. Fitoquímicos inhibidores de comunicación bacteriana: alternativa a la resistencia de antibióticos, con el cual se adquirió equipo para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Marcos Soto Hernández por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y apoyar la realización de este trabajo.

Al Dr. Israel Castillo Juárez por dirigir esta investigación y enseñarme a ser perseverante y honesta.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por su tiempo y sugerencias para mejorar este trabajo.

Al M.C. Rubén San Miguel Chávez por sus comentarios y correcciones del escrito.

Al Dr. Rodolfo García Contreras por su apoyo incondicional en algunas técnicas y ensayos.

Al Dr. José Salud Rodríguez Zavala por apoyarnos en la realización del análisis de acoplamiento molecular.

Al M.C. Emmanuel Ibarra Estrada por el apoyo en el análisis de CG/EM.

A Sr. Domingo, Mercedes y Joaquina por apoyarme durante la estancia.

DEDICATORIA

A María Paulina López† y Filomeno Pérez, mis padres. Por haber fomentado en mí el trabajo, la perseverancia y honestidad como pilares para llegar a donde sea.

A mis hermanos: Vicente, Zena, Rubén, Artemio, Rosa y Tomás por ser mi ejemplo de dedicación y trabajo.

A Quetzalli, mi compañero de vida, mi fortaleza y complemento. Porque la ciencia es un arte que necesita de inspiración.

A la familia González Martínez mi segunda familia, gracias por apoyarme incondicionalmente.

A mis amigos (Paco, Nivi y Refugio) y amigos del mundo (Gloria, Francisco, Rafael Ocampo y Flor) por acompañarme en momentos difíciles y ser parte de buenas experiencias.

A Sofía Trujano, gracias por apoyarme desde el inicio de esta experiencia.

A mis compañeras de laboratorio: Tere, Naybi y Mariana por su compañía y apoyo.

A todos las personas que han contribuido a forjar mi astucia, fortaleza y enseñarme que el camino puede estar lleno de tropiezos, pero siempre hay alguna forma de llegar.

A mi identidad zapoteca que me llena de orgullo.

A la energía divina que mueve el universo.



CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plantas oleaginosas.....	1
1.2. “Girasol” (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	2
1.2.1. Clasificación taxonómica.....	2
1.2.2. Historia del cultivo de girasol.....	2
1.2.3. Importancia económica.....	3
1.2.4. Composición química de la semilla.....	4
1.2.5. Actividad biológica.....	5
1.3. “Chía” (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	6
1.3.1. Clasificación taxonómica.....	6
1.3.2. Historia del cultivo de la chía.....	6
1.3.3. Importancia económica.....	7
1.3.4. Composición química de la semilla.....	8
1.3.5. Actividad biológica.....	8
1.4. “Amaranto” (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.).....	10
1.4.1. Clasificación taxonómica.....	10
1.4.2. Historia del cultivo de amaranto.....	10
1.4.3. Importancia económica.....	11
1.4.4. Composición química de la semilla.....	12
1.4.5. Actividad biológica.....	13
1.5. Resistencia a los antimicrobianos.....	15
1.6. Nuevas alternativas contra la resistencia a los antibióticos.....	16
1.6.1. Percepción de quórum (<i>quorum sensing</i>).....	17
1.6.2. Elementos que constituyen un sistema de percepción de	

quórum (SPQ).....	17
1.6.3. Tipos de autoinductores.....	18
1.6.4. Sistemas de percepción de quórum (SPQ).....	18
1.7. Inhibición de los sistemas de percepción de quórum (I-SPQ).....	20
1.7.1. Productos naturales I-SPQ.....	20
1.7.2. Moléculas con actividad I-SPQ.....	22
1.7.3. Mecanismos de I-SPQ.....	24
1.8. Estudio del acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	25
1.9. <i>Chromobacterium violaceum</i> y su SPQ.....	25
1.9.1. Modelos de infección <i>in vivo</i>	26
2. OBJETIVOS	27
2.1. General.....	27
2.2. Específicos.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Obtención de las semillas.....	28
3.2. Ácidos grasos libres.....	28
3.3. Cepas bacterianas.....	28
3.4. Análisis cromatográfico.....	29
3.5. Animales.....	29
3.6. Extracción de los aceites.....	30
3.6.1. Derivatización de los aceites y análisis de ácidos grasos por CG/EM.....	30
3.7. Estudios <i>in vitro</i>	31
3.7.1. Evaluación de la actividad I-SPQ de los aceites y ácidos grasos libres.....	31
3.7.1.1. Preparación del inóculo.....	31
3.7.1.2. Tratamientos.....	32
3.7.1.3. Determinación del crecimiento bacteriano.....	32
3.7.1.4. Cuantificación de violaceina.....	33
3.7.2. Actividad de la exoproteasa alcalina.....	34
3.7.3. Análisis de acoplamiento molecular.....	34

3.8. Estudios <i>in vivo</i>	35
3.8.1. Preparación del inóculo bacteriano.....	35
3.8.2. Efecto de la dieta a base de semillas en la supervivencia de ratones infectados con <i>C. violaceum</i>	36
3.8.2.1. Preparación de pellets de semillas.....	36
3.8.2.2. Inoculación y tratamientos.....	36
3.8.3. Efecto de la administración oral de aceites de semillas en la supervivencia de ratones infectados con <i>C. violaceum</i> ...	37
3.8.3.1. Inoculación y tratamientos.....	37
3.9. Análisis estadístico.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Rendimiento de los aceites.....	39
4.2. Análisis de los aceites por cromatografía de capa fina (CCF).....	39
4.3. Evaluación <i>in vitro</i> de los aceites de semillas oleaginosas.....	40
4.3.1. Los aceites inhiben la producción de violaceina en <i>C.</i> <i>violaceum</i>	40
4.3.2. Los aceites inhiben la actividad de la exoproteasa alcalina en <i>C. violaceum</i>	41
4.4. Composición de los aceites de las semillas evaluadas.....	42
4.5. Evaluación <i>in vitro</i> de los AG saturados (SAFA).....	44
4.5.1. Crecimiento bacteriano y producción de violaceina en <i>C.</i> <i>violaceum</i>	44
4.6. Evaluación <i>in vitro</i> de los AG insaturados (MUFA y PUFA).....	45
4.6.1. Crecimiento bacteriano y producción de violaceina en <i>C.</i> <i>violaceum</i>	45
4.7. Análisis de acoplamiento molecular de SAFA y MUFA en el sitio activo de la proteína CviR.....	46
4.8. Evaluación <i>in vivo</i>	49
4.8.1. El consumo de semillas de girasol aumenta la supervivencia de ratones infectados con <i>C. violaceum</i>	49

4.8.2. La administración oral de aceite de girasol aumenta la supervivencia de ratones infectados con <i>C. violaceum</i>	50
5. DISCUSIÓN	52
6. CONCLUSIONES	59
7. LITERATURA CITADA	60
8. ANEXOS	78
9. PRODUCCIÓN	81

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. El girasol usado en ofrenda a las deidades y ceremonias de bienvenida.....	3
Figura 2. Inducción de parto con una bebida de chía y carne de la cola de tlacuache.....	7
Figura 3. Recolector de amaranto.....	11
Figura 4. Componentes y mecanismo general del funcionamiento del SPQ.....	17
Figura 5. Estructura de algunas moléculas autoinductoras.....	18
Figura 6. SPQ de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Xanthomonas campestris</i> ..	20
Figura 7. Mecanismos de inhibición de la percepción de quórum.....	24
Figura 8. Cepas de <i>C. violaceum</i> CV12472 (izquierda) y CV026 (derecha).....	28
Figura 9. Condiciones de alojamiento de los roedores en apego a las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999.....	29
Figura 10. Extracción de los aceites de las semillas en el sistema Soxhlet.....	30
Figura 11. Cuantificación de violaceina en placas de 96 pozos (Corning Costar).....	33
Figura 12. Comprimidos hechos a base de semillas (A: chía, B: amaranto y C: girasol) y agua destilada.....	36
Figura 13. Inoculación vía intraperitoneal (A) y alimentación con pellets de semillas (B).....	37
Figura 14. Cánula metálica y administración oral de los aceites de semillas.....	38

Figura 15. Cromatoplasmas de los aceites de girasol, chía, amaranto y algunas muestras de referencia.....	39
Figura 16. Efecto de las diferentes concentraciones de aceites en la producción de violaceína y crecimiento bacteriano en <i>C. violaceum</i>	40
Figura 17. Efecto de la aplicación de los aceites en la actividad de la exoproteasa alcalina en <i>C. violaceum</i>	41
Figura 18. Cromatogramas de los aceites y la abundancia de ácidos grasos.....	43
Figura 19. Efecto del consumo de comprimidos de semillas de girasol y chía en la supervivencia de ratones infectados con <i>C. violaceum</i>	50
Figura 20. Efecto de la administración oral de los aceites de girasol, chía y amaranto en la supervivencia de ratones infectados con <i>C. violaceum</i>	51

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición de 100 g de semillas de girasol.....	4
Tabla 2. Composición de 100 g de semillas de chía.....	8
Tabla 3. Composición de 100 g de semillas de amaranto.....	13
Tabla 4. Moléculas reportadas como I-SPQ de bacterias.....	23
Tabla 5. Rendimiento de los aceites.....	39
Tabla 6. Composición de los aceites de las semillas de amaranto, chía y girasol.....	42
Tabla 7. Efecto de los SAFA en el crecimiento bacteriano y producción de violaceina en <i>C. violaceum</i>	44
Tabla 8. Efecto de los MUFA y PUFA en el crecimiento bacteriano y producción de violaceina en <i>C. violaceum</i>	46
Tabla 9. Acoplamiento molecular de algunos SAFA y MUFA en el sitio activo de la proteína CviR.....	47

ABREVIATURAS

AG	Ácidos grasos
AHLs	Acil-homoserin lactonas
AI	Autoinductor
Als	Autoinductores
AIP	Péptidos señal
CCF	Cromatografía en capa fina
CG/EM	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSF	Señal de factor difusible (diffusible signal factor)
I-SPQ	Inhibición de los sistemas de percepción de quórum
<i>K_d</i>	Constante de disociación
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados (monounsaturated fatty acids)
PBS	Solución buffer de fosfatos
PQ	Percepción de quórum
PQS	Quinolonas
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SAFA	Ácidos grasos saturados (saturated fatty acids)
SPQ	Sistemas de percepción de quórum
U.F.C.	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidad internacional

**EFFECTO REGULADOR DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE SEMILLAS
OLEAGINOSAS EN EL SISTEMA DE PERCEPCIÓN DE QUÓRUM DE
Chromobacterium violaceum.**

Macrina Pérez López, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2015.

RESUMEN

La inhibición de la comunicación bacteriana por medio de la interrupción de los sistemas de percepción de quórum (SPQ), se ha planteado como una alternativa para tratar infecciones sin generar resistencia. En la última década se ha descrito que moléculas del tipo de los ácidos grasos (AG) pueden actuar como autoinductoras de SPQ y de esta manera regular la expresión de factores de virulencia en bacterias patógenas tanto de animales como de plantas. De manera interesante se ha publicado que AG presentes en la carne y la leche, así como de algunos organismos marinos y cianobacterias, pueden actuar como moléculas inhibitoras de SPQ (I-SPQ) en determinados géneros bacterianos. Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se investigó el efecto de los aceites ricos en AG de semillas de amaranto, chía y girasol sobre el SPQ de la bacteria *Chromobacterium violaceum*. Estos ensayos se realizaron *in vitro* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* mostraron que los tres aceites tienen actividad I-SPQ al inhibir la producción de violaceina y la actividad de la exoproteasa alcalina, sin afectar la viabilidad de la bacteria. El análisis de los aceites mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, reveló una composición similar de AG, pero con diferencias en sus proporciones. A través de un estudio de relación estructura-actividad, se identificó a los AG saturados, láurico, mirístico y esteárico como los responsables de la actividad I-SPQ, pero también se identificó a los AG insaturados, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico y cervónico con actividad bactericida, la cual está relacionada con número de insaturaciones en la cadena. El análisis de acoplamiento molecular (“*docking*”) mostró que puede existir una posible interacción entre el sitio activo de la proteína receptora (CviR) y los AG saturados. Esta interacción puede ser la causante de la I-SPQ en *C. violaceum*,

debido a un efecto antagónico de los AG saturados en el sitio activo de CviR. Para los ensayos *in vivo* se desarrolló un modelo de infección con *C. violaceum* en ratones. Mediante el cual se identificó que el consumo por los animales de semillas de girasol, así como del aceite retrasó la muerte y aumentó la supervivencia de los animales. Aún falta definir cuál de los dos posibles efectos (I-SPQ o bactericida) de los AG, es el implicado en la actividad registrada en este modelo. Parece ser que una alta proporción de AG insaturados y una baja de ácido palmítico en el aceite de girasol, pueden estar involucrados en la protección ante la infección con *C. violaceum* en los ratones.

Palabras clave: Percepción de quórum, *Amaranthus hypochondriacus*, *Salvia hispanica*, *Helianthus annuus*, ácidos grasos, inhibición de la percepción de quórum.

REGULATORY EFFECT OF FATTY ACIDS OF OIL SEEDS IN THE QUORUM SENSING SYSTEM OF *Chromobacterium violaceum*.

Macrina Pérez López, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2015.

ABSTRACT

The inhibition of bacterial communication through disruption of quorum sensing systems (QSS) has been proposed as an alternative to treat infections without causing resistance. In the last decade, it has been reported that molecules of fatty acid (FA) type can act as autoinducers of QSS and thus regulate the expression of virulence factors in pathogenic bacteria both animals and plants. Interestingly, it has been reported that FA in meat and milk, as well as some marine organisms and cyanobacteria, can act as inhibitory molecules of QSS (QSS-I) in certain bacterial genus. Taking into account the above, in this study the effect of oils of amaranth, chia and sunflower seeds rich in FA was investigated on the QSS of *Chromobacterium violaceum* bacterium. These assays were performed *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* studies showed that the three oils have QSS-I activity by inhibiting the production of violacein and alkaline exoprotease activity, without affecting the viability of the bacterium. Analysis of the seed oils by gas chromatography/mass spectrometry, revealed a similar composition of FA in oils, but with differences in their proportions. Through a structure-activity relationship study, saturated FA, lauric, myristic and stearic were identified as responsible of QSS-I activity, but also unsaturated FA were identified, oleic, linoleic, linolenic, arachidonic and cervonic with bactericidal activity, which is related to the number of unsaturations in the chain. The analysis of molecular docking showed that there may be a potential interaction between the receptor protein (CviR) and saturated FA in the active site. This interaction may be the cause of the QSS-I in *C. violaceum*, due to an antagonistic effect of saturated fatty acids in the CviR active site. For *in vivo* assays, an infection model with *C. violaceum* in mice was developed. Whereby the consumption of sunflower seed and oil by animals delayed their death and increased their survival. Still need to define

which of the two possible effects (QSS-I or bactericidal) of the FA, is involved in the activity recorded in this model. Apparently, the high proportion of polyunsaturated FA and the low proportion of palmitic acid in sunflower oil appear to be decisive and may be involved in mice protection against the infection with *C. violaceum*.

Key words: *Quorum sensing*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Salvia hispanica*, *Helianthus annuus*, fatty acids, *quorum sensing* inhibition.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plantas oleaginosas.

Las plantas oleaginosas se encuentran entre los cultivos de mayor producción y comercialización a nivel mundial, ya que sus semillas o frutos contienen un alto porcentaje de ácidos grasos indispensables en la nutrición humana y proteínas de alta calidad para la alimentación animal (Comité Nacional Sistema-Producto Oleaginosas, 2015).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2015a) informa que las oleaginosas que más se cultivan en el mundo son la soya, colza, girasol, cacahuate, palma y copra. Dichos cultivos alcanzaron una producción total de 535.89 millones de toneladas métricas (ciclo 2014-2015). Los países que más contribuyeron en esta producción son Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India y Canadá (USDA, 2015b). Entre los países que más exportan oleaginosas están Estados Unidos, Brasil, Canadá, y Argentina, mientras que los importadores son China, la Unión Europea, México y Japón (USDA, 2015b).

La demanda de cultivos oleaginosos para el consumo humano desde el 2011 a la fecha, ha aumentado (27.56 millones de toneladas métricas) debido a que las grasas y los aceites son nutrientes esenciales en la dieta (aportan alrededor del 40% de las calorías) y son fundamentales en el suministro de energéticos alimentarios en los países en desarrollo (Ramadan *et al.*, 2012).

En México, se cultiva cártamo, soya, cacahuate, ajonjolí, canola y girasol pero su producción no es suficiente para la demanda nacional, lo que lo hace uno de los principales países importadores de aceites vegetales (FAO, 2015a).

1.2. “Girasol” (*Helianthus annuus* L.).

1.2.1. Clasificación taxonómica.

De acuerdo a la base de datos del Missouri Botanical Garden (Tropicos.org), la especie se ubica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Equisetopsida</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Género	<i>Helianthus</i>
Especie	<i>annuus</i>

1.2.2. Historia del cultivo de girasol.

La domesticación de este cultivo data alrededor de los 4800 años a.C. (Smith, 2006). Hasta la fecha se sigue debatiendo su centro de origen, pero todo apunta a que los girasoles domesticados actuales se desarrollaron a partir de las especies silvestres del este de Norteamérica (Smith, 2014). Aunque el análisis de documentos históricos y “semillas” arqueológicas (descubiertas en Tabasco y Morelos) indican que México fue el centro de origen más antiguo debido a que los aquenios prehistóricos más grandes y más antiguos son de México. Así también, en los códices se aprecia la importancia que tuvieron los girasoles cultivados tanto en la época prehispánica (Figura 1) como en el Virreinato en el centro del país, donde los Aztecas le denominaban como chimalxochitl, “chimal” = escudo, “xochitl” = flor (Blackman *et al.*, 2011; Bye *et al.*, 2009; Harter *et al.*, 2004; Smith, 2014).

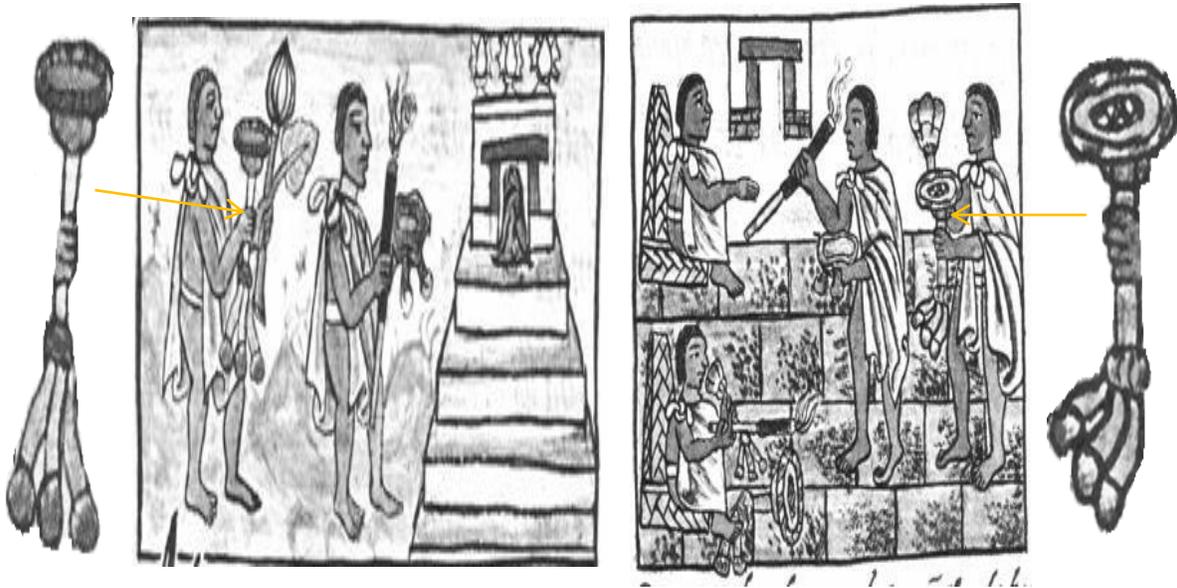


Figura 1. El girasol usado en ofrenda a las deidades y ceremonias de bienvenida. Tomado de Bye *et al.*, 2009.

1.2.3. Importancia económica.

El girasol es una de las seis oleaginosas más cultivadas en el mundo. En el ciclo 2014-2015 su producción mundial osciló en unos 40 millones de toneladas métricas, consolidándose como los principales productores: Ucrania, Unión Europea y Rusia (USDA, 2015a).

De la producción mundial, 15.66 millones de toneladas métricas se destinaron para el consumo humano y principalmente para la producción de aceite (15.127 millones de toneladas métricas) (USDA, 2015a). Debido a que el aceite de girasol es uno de los más importantes aceites comestibles a nivel mundial y representa alrededor del 8-11% de la producción total (USDA, 2015c). Por sus características (estabilidad a altas temperaturas, oxidación, olor, etc.) su demanda en las industrias procesadoras de alimentos, así como de cosméticos, resinas y lubricantes ha incrementado en los últimos años (Paniego *et al.*, 2007). Los residuos que quedan al extraer el aceite se usan como alimento para el ganado ya que son ricos en fibra y tienen bajo contenido calórico (Paniego *et al.*, 2007). También, algunas variedades con semillas grandes se destinan para la confitería y otro pequeño grupo como ornamental (Paniego *et al.*, 2007).

De acuerdo a los datos del cierre agrícola de 2011, en México el cultivo de girasol ocupa el sexto lugar en cuanto a superficie sembrada y producción con respecto a la soya, cártamo, ajonjolí, cacahuate y canola (SIAP, 2015).

1.2.4. Composición química de la semilla.

Las semillas de girasol (enteras descascarilladas) contienen una gran cantidad de proteínas y lípidos, en menor proporción calcio, fósforo, almidón, ácidos grasos, aminoácidos y polisacáridos (Arija *et al.*, 1999). Según la base de datos de nutrientes de Estados Unidos (USDA, 2015d), la composición de las semillas de girasol se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de 100 g de semillas de girasol.

Componentes	Concentración
Principales	
Agua	4.73 g
Proteínas	20.78 g
Lípidos totales	51.46 g
Carbohidratos	20.00 g
Fibra	8.6 g
Azúcares totales	2.62 g
Minerales	
Calcio	78 mg
Hierro	5.25 mg
Magnesio	325 mg
Fósforo	660 mg
Potasio	645 mg
Sodio	9 mg
Zinc	5.0 mg
Vitaminas	
Tiamina	1.480 mg
Riboflavina	0.355 mg
Niacina	8.335 mg
Folato	227 µg
Vitamina A	50 UI
Vitamina C	1.4 mg
Vitamina E	35.17 mg
Lípidos	
Ácidos grasos saturados totales	4.455 g
Ácidos grasos monoinsaturados totales	18.528 g
Ácidos grasos poliinsaturados totales	23.137 g

1.2.5. Actividad biológica.

En humanos se ha demostrado que una dieta con aceite de girasol reduce los valores de ciertos factores de coagulación como el XIIc, XIIa y IXc, así como bajo fibrinógeno vinculante sobre las plaquetas (Junker *et al.*, 2001). También se ha informado que el aceite de girasol tiene actividad citotóxica sobre células cancerígenas (AlJumaily *et al.*, 2013; Kapadia *et al.*, 2002). Así mismo se le atribuye la actividad bactericida sobre bacterias patógenas de humanos como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y fungicida en *Candida albicans* (Aboki *et al.*, 2012; Anjali *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Taha *et al.* (2012) informó que los extractos del pericarpio (cáscara) de las semillas de girasol son ricos en compuestos fenólicos y estos tienen gran actividad antibiótica y anticarcinogénica.

Marques *et al.* (2004) observó que tratar las heridas de la piel con el aceite de girasol acelera el proceso de curación. Así mismo se ha obtenido que el uso de este aceite beneficia la humectación y no produce eritema ni estimula la dermatitis atópica (Danby *et al.*, 2013). En otros trabajos se enfatiza el uso del aceite concentrado como una medida terapéutica para el cuidado general de la piel, así también para tratar la dermatitis atópica, pieles sensibles y la inflamación (López-Pérez y Torres-Altamirano, 2006).

En ratas con isquemia miocárdica la adición de semillas de girasol ricas en ácido linoleico a las dietas redujo la ocurrencia de arritmias (Leprán y Szekeres, 1992). Los glucósidos triterpénicos (helianthosidos 1-6) presentes e extractos de los pétalos de las flores de girasol mostraron una buena actividad antiinflamatoria en el modelo del teradecanoilforbol (TPA) en ratones (Ukiya *et al.*, 2007).

1.3. “Chía” (*Salvia hispanica* L.).

1.3.1. Clasificación taxonómica.

En la base de datos del Missouri Botanical Garden (Tropicos.org) se ubica a esta especie de la siguiente manera:

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Equisetopsida</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>hispanica</i>

1.3.2. Historia del cultivo de la chía.

Se ha reportado como centro de origen de la chía a Centroamérica (Bukasov, 1963). Dado a que se han encontrado pocos restos arqueológicos, no se puede saber con precisión el periodo de la primera domesticación y el cultivo de esta especie (Cahill, 2005). Pero se sabe que desde la época prehispánica, en Mesoamérica, las semillas de chía han sido muy valoradas en la alimentación, la medicina (Figura 2) y las artes (Cahill, 2003). Por lo que la chía pudo ser domesticada desde antes de la época precolombina (Guillet, 1981).

Cahill en 2003, hizo una revisión etnobotánica de *S. hispanica* en Mesoamericana, donde analizó los cambios en su uso después de la colonización española, y encontró que en la medicina antes se usaba más como estimulante que hoy en día, en cuanto a los usos culinarios la harina de estas semillas era más valorada que en la actualidad, cabe señalar que sus usos religiosos se perdieron totalmente.



Figura 2. Inducción de parto con una bebida de chía y carne de cola de tlacuache. Tomado de Montúfar, 2007.

1.3.3. Importancia económica.

Se estima que la superficie destinada para el cultivo de chía en el 2013 fue de 250,000 hectáreas a nivel mundial (González, 2014), siendo los principales países productores Argentina, México, Bolivia y Paraguay (Busilacchi *et al.*, 2015). En el contexto internacional, la demanda de esta semilla va en aumento y es liderada por Estados Unidos, ya que este país está desarrollando cada vez más productos industrializados a base de estas semillas como jugos, mantecas, aceites, etc. Otros países que se están incorporando al consumo de semillas son Japón y Europa (Busilacchi *et al.*, 2015).

De acuerdo al cierre de la producción agrícola del 2011, en México se cultivaron 2,750 hectáreas de chía, obteniéndose una producción de 3,449 toneladas (SIAP, 2015). Los principales estados productores de estas semillas son Jalisco y Puebla (SIAP, 2015).

1.3.4. Composición química de la semilla.

Las semillas de chía contienen principalmente lípidos, proteínas y fibra (Jiménez *et al.*, 2013). La composición de las semillas que informa la base de datos de nutrientes de Estados Unidos (USDA, 2015d) se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de 100 g de semillas de chía.

Componentes	Concentración
Principales	
Agua	5.80 g
Proteínas	16.54 g
Lípidos totales	30.74 g
Carbohidratos	42.12
Fibra	34.4
Minerales	
Calcio	631 mg
Hierro	7.72 mg
Magnesio	335 mg
Fósforo	860 mg
Potasio	407 mg
Sodio	16 mg
Zinc	4.58 mg
Vitaminas	
Tiamina	0.620 mg
Riboflavina	0.170 mg
Niacina	8.830 mg
Vitamina A	54 UI
Vitamina E	0.50 mg
Lípidos	
Ácidos grasos saturados totales	3.330 g
Ácidos grasos monoinsaturados totales	2.309 g
Ácidos grasos poliinsaturados totales	23.665 g
Ácidos grasos <i>trans</i> totales	0.140 g

1.3.5. Actividad biológica.

En los últimos años el consumo de la chía ha aumentado debido a sus posibles propiedades benéficas para equilibrar los niveles de azúcar en la sangre, reducir el colesterol, los triglicéridos, la presión arterial, y promover la pérdida de peso (ASN, 2009). También puede controlar distintos padecimientos como el cáncer, enfermedades cardíacas y trastornos hormonales (Ulbricht *et al.*, 2009). Otras

evidencia sugieren que puede tener actividad anticoagulante, antioxidante y antiviral (Ulbricht *et al.*, 2009).

Por otro lado, la incorporación de semillas de chía en la dieta de pollos aumenta el contenido de ácidos grasos omega (ω)-3 en los huevos comparado con otras semillas como linaza o colza (Mohd *et al.*, 2012; Salazar-Vega *et al.*, 2009). La alimentación de cerdos con estas semillas mejora el sabor y aroma de la carne, así también aumenta la cantidad de ácido α -linolénico y disminuye los ácidos grasos saturados en esta (Coates y Ayerza, 2009). Otros estudios en animales respaldan el beneficio de alimentarlos con estas semillas ya que el sabor y consistencia de la carne mejora (Ayerza *et al.*, 2002; Masoero *et al.*, 2008).

Un estudio con mujeres en postmenopausia que consumieron 25 g de semillas de chía molida por siete semanas mostró un significativo incremento en el plasma de ácido α linolénico (ALA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) (Jin *et al.*, 2012) que puede asociarse con un efecto cardioprotector (Vedtofte *et al.*, 2011). Otros estudios en pacientes con síndrome metabólico han reportado que una dieta rica en nopal, chía, proteína de soya y avena reducen los niveles de triglicéridos e intolerancia a la glucosa (Guevara-Cruz *et al.*, 2012). La ingestión de dosis ascendentes de aceite de chía reducen la glucemia postprandial, esto puede ser una posible explicación en la mejora de la presión arterial, la coagulación y la inflamación previamente observados después de la suplementación de chía en diabéticos (Vuksan *et al.*, 2010).

Se ha observado en personas con enfermedades en la piel (prurito y xerosis) que la aplicación tópica del aceite reduce los síntomas y las erupciones, así como también mejora la hidratación (Jeong *et al.*, 2010).

Segura-Campos *et al.* (2013) menciona que la proteína hidrolizada de la chía tiene actividad bactericida sobre bacterias patógenas de humanos como *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, etc.

1.4. “Amaranto” (*Amaranthus hypochondriacus* L.).

1.4.1. Clasificación taxonómica.

De acuerdo a la base de datos del Missouri Botanical Garden (Tropicos.org), la especie se ubica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Equisetopsida</i>
Subclase	<i>Magnoliidae</i>
Orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Amaranthaceae</i>
Género	<i>Amaranthus</i>
Especie	<i>hypochondriacus</i>

1.4.2. Historia del cultivo de amaranto.

Las evidencias históricas indican que la domesticación y el cultivo del amaranto se desarrolló en el sureste y centro de México (Figura 3) hace unos 5000 a 8000 años (Becerra, 2000; Rastogi y Shukla, 2013). Se sabe que se cultivaban principalmente tres especies del género *Amaranthus*, debido a su alta producción de semillas: *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* nativas de México y Guatemala, y *A. caudatus* nativa de Perú y los Andes (National Research Council, 1984).

El uso histórico más importante del amaranto como cultivo de granos fue en el centro de México, durante la civilización Azteca (denominado como huahutli) (Sauer, 1950; Rastogi y Shukla, 2013). *A. hypochondriacus* fue la especie que más utilizaron en la comida, prácticas religiosas y tributos (Sauer, 1950; Bukasov, 1963; National Research Council, 1984; Myers, 1996) ya que sus primeros restos se han encontrado en cuevas de Tehuacán, Puebla (Myers, 1996; National Research Council, 1984).

Después de la llegada de los españoles, el cultivo se redujo drásticamente, posiblemente por la represión y desprestigio de los ritos y ceremonias donde este se usaba (Rastogi y Shukla, 2013). Para el siglo XVIII, el cultivo se extendió por Europa con uso ornamental principalmente (Rastogi y Shukla, 2013). Durante el siglo XX se empezó a cultivar en China, la India, África y Europa, así como en el norte y sur de América (Kauffman y Weber 1990; Myers, 1996). En 2005, las Organizaciones no Gubernamentales (ONG's) de Uganda introdujeron este cultivo como una fuente potencial para mejorar la alimentación de las comunidades con altos niveles de desnutrición, ya que estudios previos reflejaron produce una mejoría en el crecimiento de los niños (Muyonga *et al.*, 2008).



Figura 3. Recolector de amaranto. Tomado de Ardón, 1993.

1.4.3. Importancia económica.

En los últimos veinte años ha aumentado notoriamente la producción e investigación del amaranto en América, Asia, África, y varios países del este de Europa (Jacobsen *et al.*, 2002). Los principales países que cultivan amaranto de grano son China, India, Kenia, México, Nepal, Perú, Estados Unidos y Rusia (Bale y Kauffman, 1992). En otros países se utiliza además de la semilla, la planta (tallos y hojas) que se procesa

y consume en la alimentación humana, como forraje para los animales y en la industria farmacéutica (Morales-Guerrero *et al.*, 2009).

En 1982 se introdujeron algunas variedades de amaranto de grano en China; hoy en día, se cultivan de manera comercial alrededor de 86,000 hectáreas en este país que posee uno de los bancos de germoplasma más importantes del mundo (González, 2014).

En Estados Unidos también se ha extendido este cultivo alcanzando en el 2002 unos 379 hectáreas sembradas (AgMRC, 2014).

En México se cultivaron en 2011 alrededor de 3354 hectáreas de amaranto de los cuales se obtuvo una producción de 3600 toneladas de semilla (SIAP, 2015). Los principales estados productores de amaranto son Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Morelos y Distrito Federal (SIAP, 2015).

1.4.4. Composición química de la semilla.

Se ha reportado que las semillas contienen principalmente proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales (Sánchez, 1980). Mientras tanto, la base de datos de nutrientes de Estados Unidos (USDA, 2015d), menciona los siguientes componentes (Tabla 3):

Tabla 3. Composición de 100 g de semillas de amaranto.

Componentes	Valor nutritivo
Principales	
Agua	11.29 g
Proteínas	13.56 g
Lípidos totales	7.02 g
Carbohidratos	65.25 g
Fibra	6.7 g
Azúcares totales	1.69 g
Minerales	
Calcio	159 mg
Hierro	7.61 mg
Magnesio	248 mg
Fósforo	557 mg
Potasio	508 mg
Sodio	4 mg
Zinc	2.87 mg
Vitaminas	
Tiamina	0.116 mg
Riboflavina	0.200 mg
Niacina	0.923 mg
Folato	82 µg
Vitamina A	2 UI
Vitamina B	0.591 mg
Vitamina C	4.2 mg
Vitamina E	1.19 mg
Lípidos	
Ácidos grasos saturados totales	1.459 g
Ácidos grasos monoinsaturados totales	1.685 g
Ácidos grasos poliinsaturados totales	2.778 g

1.4.5. Actividad biológica.

Se ha encontrado en las proteínas de la semilla de amaranto, péptidos bioactivos con funciones biológicas que podrían ser beneficiosos para la salud, principalmente con actividad anti-hipertensiva, como el caso del péptido lunasina (Silva-Sánchez *et al.*, 2008).

A. hypochondriacus es una buena fuente de compuestos fenólicos y ejerce un efecto protector en el suero e hígado de ratas intoxicadas con etanol (López *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que el metabolismo del etanol es muy similar en ratas y seres

humanos, los resultados obtenidos sugieren que estos pueden proteger el hígado humano frente a la lesión oxidativa causada por el consumo de etanol (López *et al.*, 2011). También, puede prevenir el estrés oxidativo producido por otros agentes y que están involucrados en numerosas situaciones patológicas (López *et al.*, 2011).

Se ha comprobado que las semillas de amaranto y su aceite inhiben la biosíntesis de colesterol en gallinas, debido a la presencia de tocotrienoles y escualeno (Qureshi *et al.*, 1996).

La inclusión de aceite de amaranto en la dieta tiene un efecto beneficioso sobre las enfermedades coronarias y la hipertensión, disminuyendo la cantidad de colesterol total y triglicéridos significativamente (Martirosyan *et al.*, 2007). Así también, puede ser considerado como un suplemento antioxidante natural eficaz para proteger las membranas celulares contra el daño oxidativo (Martirosyan *et al.*, 2007).

1.5. Resistencia a los antimicrobianos.

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública que va aumentando en el mundo (Casellas, 2011; Gervas *et al.*, 2000). Actualmente, las muertes por infecciones resistentes a los antimicrobianos cobran alrededor de 50,000 vidas al año en Europa y los Estados Unidos (O'Neill, 2014). Aunque la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural, su rápida propagación se debe al mal uso de los medicamentos, los inadecuados o inexistentes programas de prevención y control de infecciones e insuficiente regulación del uso de los medicamentos antimicrobianos (WHO, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha puesto en marcha un plan de acción a nivel mundial para contrarrestar la resistencia a los antimicrobianos (WHO, 2001). Esta estrategia involucra la educación a pacientes, médicos y distribuidores en el uso racional de los antimicrobianos. Así como establecer programas de control de infecciones, un buen diagnóstico e identificación de microorganismos en los hospitales y el cumplimiento de políticas de salud (WHO, 2001).

La resistencia a los antibióticos representa una grave amenaza a nivel mundial. Cada año en los Estados Unidos, alrededor de 2 millones de personas sufren de infecciones bacterianas con cepas multirresistentes y aproximadamente 23,000 personas mueren anualmente por estas infecciones (CDC, 2013).

En México, los antimicrobianos se encuentran entre los medicamentos que más se consumen (Dreser *et al.*, 2008). La prescripción injustificada, la dispensación inadecuada y la automedicación, son algunos de los factores que se han relacionado con este alto consumo y la aparición de resistencia a estos medicamentos. A partir del 2010 entró en vigor el acuerdo que regula la venta y distribución de antibióticos, con lo que se espera que la sociedad consuma responsablemente estos medicamentos (Cofepris, 2014)

1.6. Nuevas alternativas contra la resistencia a los antibióticos.

En los últimos años se ha buscado otras alternativas de control con diferentes mecanismos de acción que eviten la aparición de la resistencia. A continuación se describen algunas de las nuevas alternativas que están en diferentes etapas de desarrollo para contrarrestar estos problemas.

Los **peptidomiméticos** son péptidos estables a la degradación enzimática con gran actividad antimicrobiana. Se ha visto que tiene una potente actividad contra las bacterias multirresistentes. Varios peptidomiméticos antimicrobianos se encuentran en ensayos de fase clínica (Haug *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009; Srinivas *et al.*, 2010). Las **nanopartículas** han recibido atención en varios campos debido a sus propiedades físico-químicas únicas y la eficacia biológica mostrada (Tillotson y Theriault, 2013). Algunas de las nanopartículas que se han probado son ZnO, CuO y Fe₂O₃ sobre bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), siendo más efectivo el ZnO sobre ambas (Azam *et al.*, 2012). Se ha reportado que mientras menor sea el tamaño de la partícula, mejor actividad antibacteriana presentan (Tillotson y Theriault, 2013). Otros estudios han probado el uso de nanotransportadores (nanoemulsiones y transportadores lipídicos nanoestructurados) para aumentar la eficacia de algunos antibióticos, tal es el caso de la tetraciclina para el tratamiento del acné (Lin *et al.*, 2013).

Otras alternativas que se están investigando son las **moléculas inhibidoras de percepción de quórum** que inhiben la expresión de los factores de virulencia sin afectar la viabilidad celular y propone pueden controlar eficazmente las infecciones causadas por estos patógenos (Gospodarek *et al.*, 2009; Lesic *et al.*, 2007; Nazzaro *et al.*, 2013; Rasmussen y Givskov 2006).

1.6.1. Percepción de quórum (*quorum sensing*).

La percepción de quórum (PQ) es un mecanismo empleado principalmente por células bacterianas para regular la expresión de determinados fenotipos, el cual involucra la liberación y la detección de moléculas de señalización en el medio denominadas autoinductoras (AIs) (Bassler, 2002). Este proceso es dependiente de la densidad celular, ya que a medida que la densidad poblacional incrementa, la concentración de moléculas AIs en el medio aumentan hasta alcanzar un umbral crítico, al cual las bacterias responden alterando su expresión génica a nivel poblacional (Bassler, 2002; Bassler y Losick, 2006).

La PQ puede regular la expresión de bioluminiscencia, secreción de factores de virulencia, formación de biopelículas, producción de pigmentos, etc. de una manera coordinada a través de los sistemas de percepción de quórum (SPQ) (Lesic *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2008; Gospodarek *et al.*, 2009).

1.6.2. Elementos que constituyen un sistema de percepción de quórum (SPQ).

Existen varios SPQ, algunos simples y otros más complejos que involucran redes de señalización, pero todos están constituidos de 3 elementos principales: una señal libremente difusible (autoinductor: AI), una sintasa que produce esta señal y un receptor que interactúa con la señal para regular la expresión de genes (Figura 4) (Adonizio, 2008).

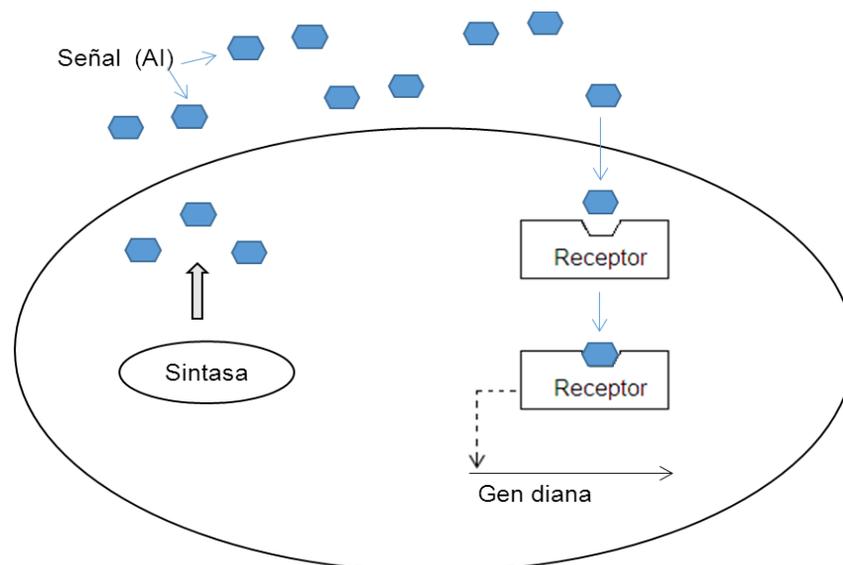


Figura 4. Componentes y mecanismo general del funcionamiento del SPQ.

1.6.3. Tipos de autoinductores.

Los autoinductores más estudiados se han agrupado en tres categorías: acil-homoserin lactonas (AHLs o AI-1) usadas por las bacterias Gram negativas, los péptidos señal (AIP) utilizados por bacterias Gram positivas y el autoinductor-2 (AI-2) utilizadas por ambas bacterias Gram positivas y Gram negativas (Schauder y Bassler, 2001; Bassler, 2002; LaSarre y Federle, 2013). Hay algunas otras moléculas que no se incluyen en estas categorías (Figura 5) como las quinolonas (PQS), factor de señal difusible (DSF) y autoinductor-3 (AI-3) (Shiner *et al.*, 2005; LaSarre y Federle, 2013).

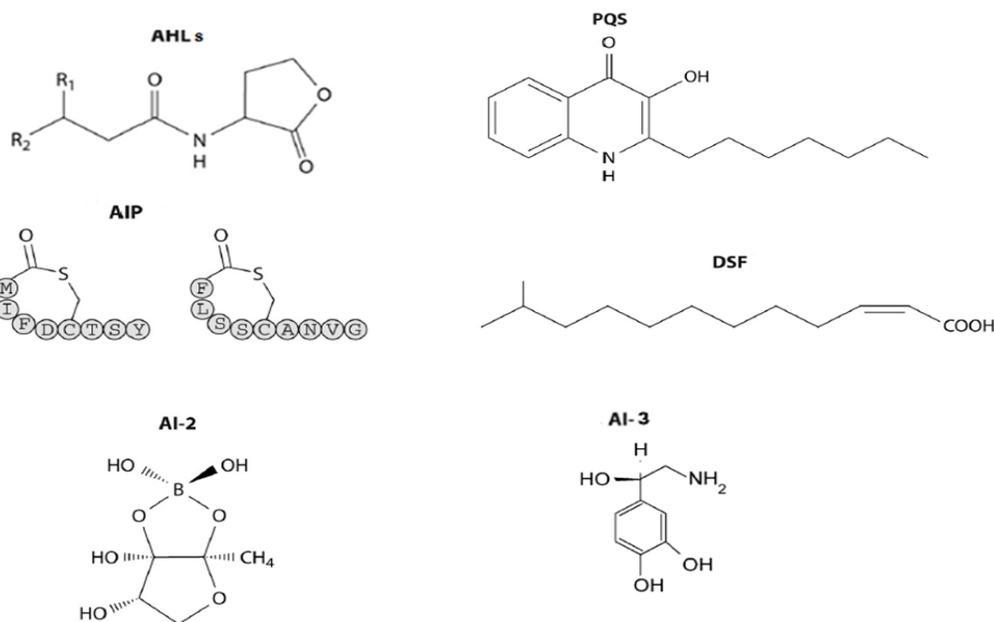


Figura 5. Estructura de algunas moléculas autoinductoras. Tomado y modificado de LaSarre y Federle, 2013.

1.6.4. Sistemas de percepción de quórum (SPQ).

Las bacterias Gram-negativas como *Vibrio fischeri*, producen acil-homoserin lactonas (AHLs) como moléculas autoinductoras, las cuales son sintetizadas por una enzima (sintasa: *LuxI*) codificada por el primer gen del operón lux (Nazzaro *et al.*, 2013). Estas moléculas (AI: 3-oxo-C₆-HSL) se difunden libremente a través de la membrana celular de la bacteria y cuando hay una baja densidad de células bacterianas, el bajo

nivel de la transcripción del operón lux es insuficiente para la activación del receptor *LuxR* (Nazzaro *et al.*, 2013). Pero si aumenta la densidad celular y los niveles del AI alcanzan un nivel de umbral especificado, se activa *LuxR* y se forma el complejo LuxR / 3-oxo-C6-HSL que activa la transcripción, dando lugar a la expresión de otros genes (Nazzaro *et al.*, 2013). En el caso *V.fischeri* los genes lux AB codifican la luciferasa y lux CDE, que codifica las enzimas que producen el sustrato para la luciferasa y por lo tanto, la bioluminiscencia (Nazzaro *et al.*, 2013).

El SPQ de *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los más estudiados y mejor caracterizados (Bjarnsholt y Givskov, 2007). Comprende un complejo de redes que utilizan distintas moléculas autoinductoras como son las acil-homoserin lactonas (AHLs) y quinolonas (PQS) (Figura 6) que regulan en esta especie varios factores de virulencia (piocianina, elastasa, formación de biopelícula, etc.) (LaSarre y Federle, 2013). Recientemente se ha identificado moléculas del tipo de ácidos grasos que también regulan factores de virulencia en *P. aeruginosa* (Twomey *et al.*, 2012; Davies y Marques, 2009; Ryan y Dow, 2011). Este sistema regulado por moléculas AI del tipo ácido graso (AG) se describió por primera vez en el patógeno de plantas *Xanthomonas campestris* (Büttner y Bonas 2010). Sin embargo, se ha visto que el sistema se encuentra distribuido en otras bacterias, dentro de las cuales se encuentran *Burkholderia cenocepacia* y *Xylella fastidiosa*, en donde se ha demostrado su participación en la regulación de la virulencia, formación de biopelícula y tolerancia a los antibióticos (Deng *et al.*, 2011). Cada vez se han descubierto nuevos AIs basados en la estructura química de AG, de tal manera que se han agrupado dentro de una familia denominada “factor de señal difusible” o DSF por sus siglas en inglés “diffusible signal factor” (Deng *et al.*, 2011).

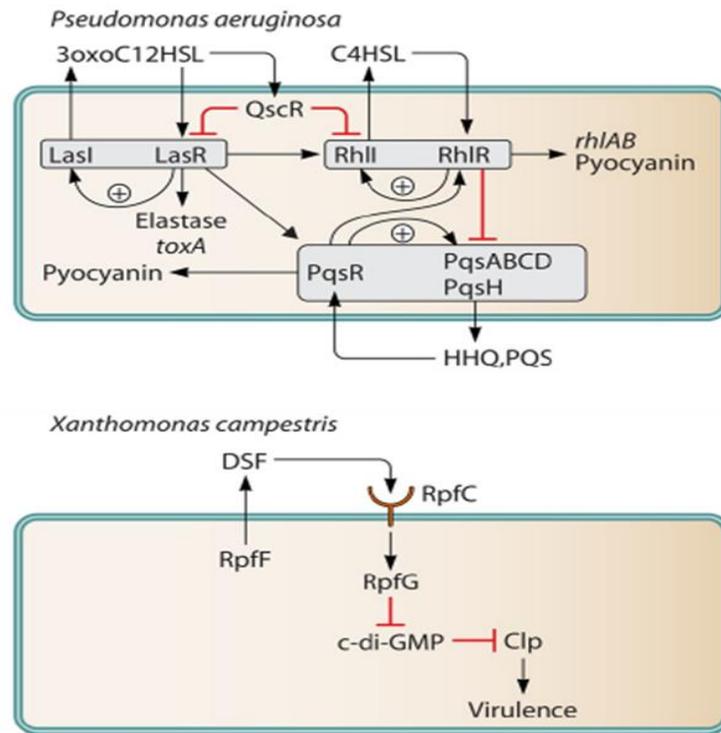


Figura 6. SPQ de *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas campestris*. Tomado de LaSarre y Federle, 2013.

1.7. Inhibición de los sistemas de percepción de quórum (I-SPQ).

1.7.1. Productos naturales I-SPQ.

En la medicina tradicional, los productos naturales han tenido gran importancia por su valor terapéutico. Hasta la fecha, los componentes biológicamente activos de productos naturales, especialmente los derivados de las plantas, han llevado al descubrimiento de nuevos fármacos (Hanson, 2003; Koh *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha incrementado el interés de su uso en otras funciones biológicas y ecológicas como lo es la regulación de las interacciones con los microorganismos (Koh *et al.*, 2013).

En cuanto a la I-SPQ, se ha descubierto que exudados radiculares de plántulas de chícharo (*Pisum sativum*) inhiben la producción de violaceína, actividad de la

exoquitinasa y proteasa en *C. violaceum* (Teplitski *et al.*, 2000). Extractos obtenidos de brotes de clavo (*Syzygium aromaticum*) inhiben la producción de violaceína en *C. violaceum* así también reducen la producción de bioluminiscencia en *Escherichia coli* y pirocianina en *P. aeruginosa* (Krishnan *et al.*, 2012).

Los extractos de ajo reducen la virulencia y producción de biopelículas en *P. aeruginosa* (Rasmussen *et al.*, 2005) así como promueven la eliminación de infecciones pulmonares con esta bacteria (Bjarnsholt *et al.*, 2005).

También, se han analizado diversas plantas usadas en la medicina tradicional de Florida, en donde se ha buscado especies con el potencial de I-SPQ (Adonizio *et al.*, 2006). En este estudio, Adonizio *et al.* (2006) evaluaron 50 especies de las cuales solo 6 (*Conocarpus erectus*, *Chamaecybe hypericifolia*, *Callistemon viminalis*, *Bucida burceras*, *Tetrazygia bicolor* y *Quercus virginiana*) tuvieron efecto en *C. violaceum* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Especies como *Prunus armeniaca*, *Prunella vulgaris*, *Nelumbo nucifera*, *Panax notoginseng*, *Punica granatum*, *Areca catechu*, e *Imperata cylindrica*, usadas en la medicina tradicional China también han tenido un buen efecto I-SPQ en *C. violaceum* y *P. aeruginosa* (Koh y Tham, 2011). A esta lista se suman especies usadas en la medicina Hindú como la raíz de *Hemidesmus indicus*, corteza de *Holarrhena antidysenterica*, semillas de *Mangifera indica*, pericarpio de *Punica granatum*, y semillas de *Psoralea corylifolia* con efecto en la inhibición de violaceína en *C. violaceum* y la motilidad (tipo “swarming”) en *P. aeruginosa* (Zahin *et al.*, 2010).

Otras fuentes como el extracto fúngico de *Ganoderma lucidum* se ha visto que inhiben la producción de violaceína en *C. violaceum* (Zhu *et al.*, 2011). Aceites esenciales de plantas del género *Piper* también han mostrado ser efectivos sobre esta bacteria (Olivero *et al.*, 2011).

Es importante destacar que la mayoría de los trabajos anteriores se realizaron *in vitro* y con extractos completos, por lo tanto no se determinó cuales metabolitos son los implicados en el efecto obtenido.

1.7.2. Moléculas con actividad I-SPQ.

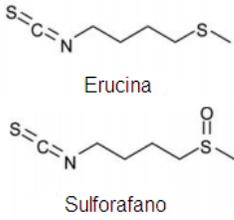
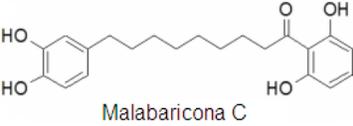
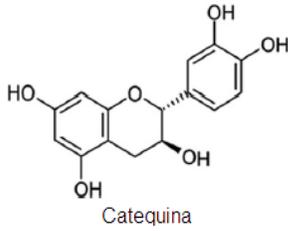
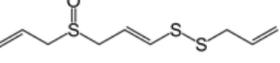
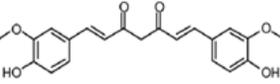
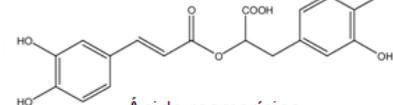
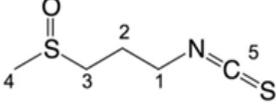
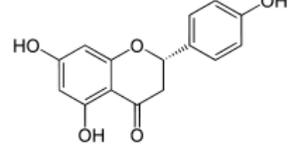
Las furanonas halogenadas producidas por el alga marina *Delisea pulchra* fueron de las primeras moléculas I-SPQ que se caracterizaron. Estas interfieren en los sistemas regulados por las AHLs en bacterias Gram negativas como *Vibrio fischeri*, *C. violaceum*, *Serratia liquefaciens*, etc. (Givskov *et al.*, 1996; Manefield *et al.*, 1999; Martinelli *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2000).

Posteriormente, se han reportado diversas moléculas con esta actividad, a continuación se describen algunas de ellas, sobre que fenotipos actúan y en que sistemas biológicos han sido probados (Tabla 4).

Recientemente, Castillo-Juárez *et al.* (2013) reportó una mezcla de ácidos anacárdicos provenientes de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) con actividad I-SPQ en *C. violaceum* (inhibiendo producción de violaceína) y *P. aeruginosa* (inhibiendo producción de piocianina, ramnolípidos y actividad de la elastasa).

También se ha empezado a reportar con los AG un fenómeno similar al que se descubrió con el primer grupo de AIs acil-homoserin lactonas (AHLs) en el que modificaciones químicas en su estructura hacen que presenten un efecto antagónico y bloquean la producción de factores de virulencia (Pérez *et al.*, 2012). En la literatura, se reporta al ácido lyngbióico (AG con un ciclopropano en la cadena) y el pitinóico (AG con un grupo metilo en la cadena) aislados de cianobacterias, con la propiedad de inhibir el SPQ de *P. aeruginosa* (Kwan *et al.* 2011). Así también, los AG comunes en distintas fuentes comestibles, como el ácido palmítico, esteárico y oleico presentes en la carne de pollo, muestran un efecto I-SPQ en bacterias que emplean sistemas con AI-2 y AHLs (Widmer *et al.*, 2007). Se ha reportado que los bulbos de cebolla infectados con *P. aeruginosa* secretan exudados que contienen ácido mirístico y linoleico como respuesta de defensa al ataque de *P. aeruginosa*, este efecto fue corroborado *in vitro* donde la adición exógena del ácido mirístico inhibió significativamente la producción de piocianina, actividad de la proteasa, lipasa y poligalacturonasa, sin afectar el crecimiento bacteriano (Abd-Alla y Bashandi, 2012).

Tabla 4. Moléculas reportadas como I-SPQ de bacterias.

Nombre	Inhibición	Referencia
 <p>Erucina</p> <p>Sulforafano</p>	Formación de biopelícula y producción de piocianina en <i>P. aeruginosa</i> .	Ganin <i>et al.</i> , 2013
 <p>Malabaricon C</p>	Producción de violaceína en <i>C. violaceum</i> .	Chong <i>et al.</i> , 2011
 <p>Catequina</p>	Producción de elastasa, formación de biopelícula, y piocianina en <i>P. aeruginosa</i> .	Vandeputte <i>et al.</i> , 2010
 <p>Ajoeno</p>	Producción de ramnolípidos, formación de biopelícula y AHLs en <i>P. aeruginosa</i> .	Jakobsen <i>et al.</i> , 2012a
 <p>Curcumina</p>	Producción de piocianina, elastasa, proteasa, formación de biopelícula y AHLs en <i>P. aeruginosa</i> .	Rudrappa y Bais, 2008
 <p>Ácido rosmarinico</p>	Formación de biopelícula en <i>P. aeruginosa</i> .	Walker <i>et al.</i> , 2004
 <p>Iberina</p>	Producción de ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> .	Jakobsen <i>et al.</i> , 2012b
 <p>Naringenina</p>	Producción de piocianina, elastasa y homoserin lactonas en <i>P. aeruginosa</i> .	Vandeputte <i>et al.</i> , 2011

1.7.3. Mecanismos de I-SPQ.

La percepción de quórum (PQ) se puede interrumpir por diferentes mecanismos, los más comunes son:

i) la degradación e inactivación de la molécula señal (autoinductor) a través del uso de enzimas (acilasas, lactonasas u oxidoreductasas) o por su secuestro usando anticuerpos (Figura 7A) (Kalia *et al.*, 2013; LaSarre y Federle, 2013).

ii) la inhibición de la biosíntesis de la molécula señal (Figura 7B) a través de moléculas capaces de inhibir la sintasa que produce la señal (como el farnesol, pirogalol, furanona, iberina, ajoeno, etc.) (Kalia *et al.*, 2013; LaSarre y Federle, 2013).

iii) la inhibición de la detección de la señal con análogos antagonistas que compitan por la unión al receptor dando como resultado la inactivación de la proteína receptora (Figura 7C), como los análogos de las AHLs (Smith e Iglewski, 2003; Kalia, 2013; Kalia *et al.*, 2014; LaSarre y Federle, 2013).

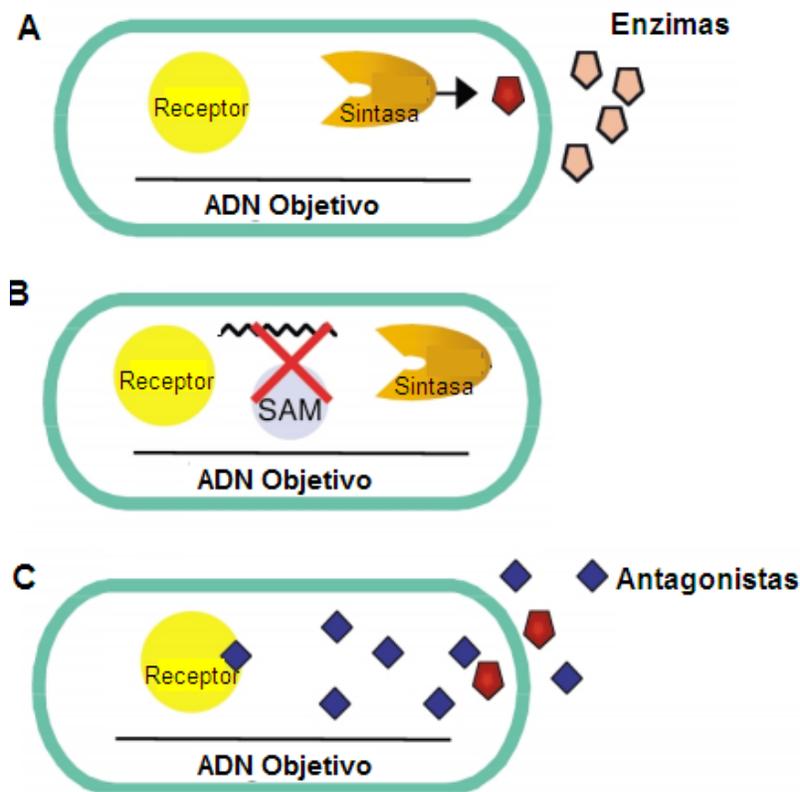


Figura 7. Mecanismos de inhibición de la percepción de quórum. Tomado y modificado de Smith e Iglewski, 2003).

1.8. Estudio del acoplamiento molecular (*docking*).

Esta técnica se ha convertido en una herramienta cada vez más importante para el descubrimiento de fármacos (Meng *et al.*, 2011) y consiste en predecir la afinidad de la estructura de una molécula (ligando) en el sitio activo del receptor (proteína) a través de métodos computacionales basados en algoritmos (Meng *et al.*, 2011; Elokely y Doerksen, 2013).

Para realizar un modelado molecular es necesario tener la estructura de la proteína (determinada por cristalografía de rayos x o resonancia magnética nuclear) y la base de datos de los ligandos (moléculas con estructuras tridimensionales conocidas) para ingresarlos al programa que calcula el acoplamiento. A través de una serie de conformaciones espaciales y orientaciones entre la proteína y el ligando se obtienen las conformaciones más estables (la que menos energía requiera ya que a menor energía, más fuerte es la unión) (Elokely y Doerksen, 2013; Padilla-Zúñiga y Rojo-Domínguez, 2002).

1.9. *Chromobacterium violaceum* y su SPQ.

C. violaceum es una bacteria Gram negativa que se encuentra en suelo y agua de regiones tropicales y subtropicales (Richards, 1993). Es considerada saprófita pero en ocasiones puede actuar como patógeno oportunista en humanos y animales, ocasionando septicemias fatales, lesiones en la piel y abscesos en pulmones e hígado (Midani y Rathore, 1998; Richards, 1993; Ma *et al.*, 2006). Se han reportado varios casos de infecciones graves en humanos por esta bacteria principalmente en zonas tropicales y subtropicales del mundo, algunos de ellos descubiertos en la India, Cambodia y Brasil (Karthik *et al.*, 2012; Ke *et al.*, 2012; Britto *et al.*, 2014).

En esta especie varias características fenotípicas como la producción de proteasa, agregación bacteriana, formación de biopelícula y motilidad están reguladas por el SPQ (Oca-Mejía *et al.*, 2015). La producción de violaceína es una de los fenotipos que es totalmente regulado por el SPQ, específicamente por el sistema Cvil/CviR

que produce y reconoce AHLs (Duran *et al.*, 2007). Esta particularidad de las cepas silvestres y una cepa mutante (Cv026) derivada de estas (que no produce la molécula AHLs, pero es capaz de detectarla) los coloca como un sistema modelo para probar moléculas I-SPQ (McLean *et al.*, 1997; McLean *et al.*, 2004).

1.9.1. Modelos de infección *in vivo*.

Existen varios modelos animales donde se han usado diferentes especies de invertebrados para comprender las interacciones patógeno-hospedante, tal es el caso del nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y el pez cebra (*Danio rerio*) donde se ha estudiado la patogenicidad de *P. aeruginosa* (Bjarnsholt *et al.*, 2010; Papaioannou *et al.*, 2013). En cuanto a la infección con *C. violaceum* se han descrito dos modelos en ratón donde la inoculación se realizó vía intraperitoneal (Segal *et al.*, 2003; Miki *et al.*, 2010). Se observó en los ratones infectados con *C. violaceum* la inducción de hepatitis necrótica fulminante (Miki *et al.*, 2010) y bacteremia (Segal *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de los aceites de las semillas de amaranto, chía y girasol en el sistema de percepción de quórum de *Chromobacterium violaceum* mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos:

- ❖ Obtener los aceites de las semillas y caracterizar sus ácidos grasos por cromatografía de gases/espectrometría de masas.
- ❖ Identificar los ácidos grasos responsables de actividad inhibidora de percepción de quórum de *C. violaceum*.
- ❖ Implementar un modelo de infección con *C. violaceum* en ratón.
- ❖ Analizar el efecto de la dieta de semillas y aceites en la supervivencia de animales infectados con *C. violaceum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Obtención de las semillas.

Se compraron semillas de chía “negra” (*Salvia hispánica* L.) con un productor del poblado de San Mateo Coatepec, Atzitzihuacán, Puebla. El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L. cv. PQ2) se consiguió con el Dr. Sergio Barrales Domínguez profesor investigador de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Las semillas de girasol confitero (*Helianthus annuus* L.) provienen de Argentina y se compraron con un proveedor (Mexicana de Viveres MSV, S.A. de C.V.) de la marca sunflower INSHELL®.

3.2. Ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos saturados (caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behénico, lignocérico: EC10A-1KT Supelco, y pelargónico: 73982 Fluka) e insaturados (palmitoleico, petroselinico, elaidico, oleico, linoleico, linolénico, araquidónico, erúcico, cervónico y nervónico: UN10-1KT Supelco) se adquirieron con un proveedor de Sigma Aldrich.

3.3. Cepas bacterianas.

Las dos cepas de *C. violaceum*, una silvestre (CV12472) y otra mutante (CV026) (Figura 8), están disponibles en el Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados y han sido empleadas en trabajos previos (González-Islas, 2013; Muñoz-Cazares, 2013).



Figura 8. Cepas de *C. violaceum* CV12472 (izquierda) y CV026 (derecha).

3.4. Análisis cromatográfico.

Se usaron placas de cromatografía en capa fina (CCF, 60 F₂₅₄, Merck) de 5 x 10 cm. Después de la aplicación los aceites y muestras de referencia, las placas se eluyeron con hexano: acetato de etilo a diferentes proporciones (v:v) y se revelaron con: vainillina/ácido sulfúrico, vapores de yodo y ácido sulfúrico al 50% en metanol para visualizar la presencia de ácidos grasos.

3.5. Animales.

Los ratones CD1 machos de 4-5 semanas de edad fueron adquiridos en el Bioterio General de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron trasladados y mantenidos en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, siguiendo en todo momento las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para manejo y uso de animales de laboratorio.

Se mantuvieron en un cuarto de experimentación con máximo 15 animales por jaula (32 x 47 x 20 cm), con alimentación estándar, ciclos de luz oscuridad de 12 h y camas de aserrín estéril (Figura 9). En todo momento se buscó generar la menor molestia a los animales, así como trabajar con grupos de animales reducidos.



Figura 9. Condiciones de alojamiento de los roedores en apego a las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999.

3.6. Extracción de los aceites.

Las semillas se pulverizaron en una licuadora (Hamilton Beach Mod. 600-6) y se depositaron en sobres de papel filtro (Whatman 4). Las muestras se extrajeron en el sistema Soxhlet con 300 mL de hexano (J.T. Baker) (Figura 10). El equipo se mantuvo por 8 horas en reflujo a aproximadamente 60°C (Ixtaina *et al.*, 2011). El disolvente se destiló a presión reducida mediante un evaporador rotatorio (BUCHI-R114, Switzerland) a 40°C obteniéndose el extracto correspondiente. Los extractos se guardaron en frascos color ámbar, en un lugar fresco y oscuro para su uso posterior.



Figura 10. Extracción de los aceites de las semillas en el sistema Soxhlet.

3.6.1. Derivatización de los aceites y análisis de ácidos grasos por CG/EM.

La derivatización se hizo de acuerdo a Gotoh *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Se tomaron 10 μ L (aprox. 10 mg) del aceite y se agregó 1 mL de NaOH 0.5 M, se dejó reaccionar por 30 min a 75°C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de trifluoruro de boro (BF_3) en MeOH (14 %) (Sigma Aldrich) y se incubó por 20 minutos más, a la misma temperatura. Posteriormente se agregó 1 ml de agua destilada, más 2 ml de hexano (J.T. Baker) y

agitó vigorosamente. Se colectó la fase orgánica en viales de cromatografía de gases y se guardaron a 2°C para su análisis posterior.

Los derivados se analizaron en el cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (CG/EM) de baja masa térmica (Agilent 5975T LTM/MSD) de acuerdo a Zhao (2012), con algunas modificaciones. El CG estaba equipado con una columna HP-5MS (30 m de largo x 0.25 mm diámetro x 0.25 µm de espesor de la película). Se utilizó un volumen de inyección de 1 µL, modo de inyección: splitless, temperatura de entrada: 250°C, gas portador: Helio. Horno de baja masa térmica: 70°C 1 min a 10°C/min hasta 200°C 1 min, 5°C/min hasta 280°C y se mantuvo a esta temperatura 2 minutos. Detector selectivo de masas: 280°C, fuente de iones: 230°C, temperatura del cuadrupolo: 150°C, ionización por impacto electrónico (70 eV), modo de barrido: completo, tiempo de corte del solvente: 3.0 minutos. Tiempo total de análisis: 33 minutos. Los resultados se expresaron como el porcentaje de área relativa.

3.7. Estudios *in vitro*.

3.7.1. Evaluación de la actividad I-SPQ de los aceites y ácidos grasos libres.

Se midió la inhibición de un fenotipo controlado por el SPQ, que en el caso de *C. violaceum* es la atenuación del pigmento violaceina (en CV12472). La cepa CV026 presenta una mutación que impide la síntesis del autoinductor por lo tanto no produce la violaceina, esto permite medir el crecimiento bacteriano sin que el pigmento interfiera. Pero si se añade exógenamente el autoinductor, esta cepa es capaz de producir dicho pigmento.

3.7.1.1. Preparación del inóculo.

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio LB (Luria Bertani) sólido. Posteriormente, se colocó una colonia de cada cepa en 5 mL de medio LB líquido y

se mantuvo en agitación constante (150 r.p.m.) a 28°C. Veinticuatro horas después, el inóculo se ajustó con medio LB líquido a una $D.O_{660\text{ nm}} = 0.1$ (Muñoz-Cazares, 2013). Se tomaron 200 μL del inóculo ajustado y se depositaron en los pozos de la placa (96 pozos de fondo plano y estériles, Corning Costar).

3.7.1.2 Tratamientos.

Los aceites de las semillas se ajustaron a las siguientes concentraciones: 20, 10, 5, 2.5 mg mL^{-1} en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich). Posteriormente, se depositaron 5 μL de cada tratamiento sobre los 200 μL de inóculo colocado en la placa multipozos, para tener una concentración final de 500, 250, 125 y 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se usó como control positivo una mezcla de ácidos anacárdicos (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) previamente descrita como I-SPQ (Castillo-Juárez *et al.*, 2013) y el control negativo DMSO que fue el vehículo.

También, se evaluó el efecto de los ácidos grasos saturados (SAFA); ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a las concentraciones de 40, 4, 0.4 y 0.04 mM en DMSO. Se agregaron 5 μL de cada dilución a los pozos con inóculo para que las concentraciones finales quedaran en 1000, 100, 10 y 1 μM . Se usó como control negativo el DMSO ya que con este se disolvieron los ácidos grasos.

Las placas se incubaron a 28°C a 150 r.p.m. por 48 h para después determinar el crecimiento bacteriano y la producción de violaceina.

3.7.1.3 Determinación del crecimiento bacteriano.

Inicialmente, en la cepa CV026 se midió la absorbancia del cultivo antes y después de haber aplicado los tratamientos en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan spectrum, Thermo scientific) a 660 nm. Posteriormente, a las 48 h se midió el crecimiento a 660 nm y a estos valores se les restó los de la absorbancia

producida por la incorporación de los aceites. Los resultados se convirtieron a porcentaje con respecto al control que corresponde al DMSO. El ensayo se realizó por triplicado con tres replicas por tratamiento (Muñoz-Cazares, 2013).

3.7.1.4 Cuantificación de violaceina.

La cuantificación se realizó en CV12472 a las 48 h después del tratamiento de acuerdo a Castillo-Juárez *et al.* (2013). El contenido de cada pozo se mezcló con 200 μ L de acetato de etilo (J.T. Baker) y se centrifugó a 15,000 r.p.m. en una centrifuga (Microfuge E BECKMAN, USA). Se colectó el sobrenadante coloreado y se evaporó a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, se resuspendió la violaceina seca en 200 μ L de DMSO (Figura 11) y se cuantificó a 575 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan spectrumM, Thermo scientific). Los resultados se convirtieron a porcentaje de violaceina con respecto al control (DMSO). El ensayo se realizó por triplicado con tres replicas por tratamiento.

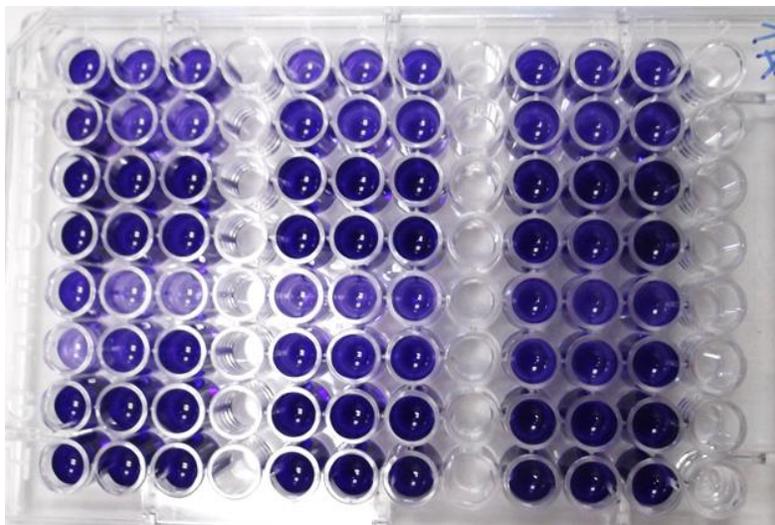


Figura 11. Cuantificación de violaceina en placas de 96 pozos (Corning Costar).

3.7.2. Actividad de la exoproteasa alcalina.

La cepa CV12472 se cultivó en 5 mL de medio LB a 37°C y con agitación constante (200 r.p.m.). Cuando el cultivo alcanzó una $D.O_{600nm} = 1.0$, a cada tubo se añadió 100 μ L de aceite (amaranto, chíá, girasol) o DMSO como control negativo. Estas muestras se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1,5 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 13,000 r.p.m. durante 1 minuto para obtener los sobrenadantes. Después, 150 μ L de cada sobrenadante se mezcló con 10 mg de polvo de Remazol azul (Sigma Aldrich) y se suspendió en 1 ml de tampón (Tris 20 mM CaCl₂ 1 mM a pH de 8,0). Esta mezcla se incubó a 37°C con agitación constante (200 r.p.m.) durante 1 h y luego se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, para eliminar el polvo de Remazol azul que no se hidrolizó. Se cuantificó el pigmento azul solubilizado en los sobrenadantes (proporcional a la actividad de la exoproteasa) espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 595 nm. La actividad se normalizó por el crecimiento de los cultivos ($DO_{600 nm}$) (Howe e Iglewski, 1984; Oca-Mejía *et al.*, 2015). Los experimentos se realizaron en cuatro cultivos independientes.

3.7.3. Análisis de acoplamiento molecular.

La estructura cristalina del dominio unión-ligando CviR unido al ligando nativo C6-HSL se obtuvo del banco de datos de proteínas (número de acceso 3QP1). Se generaron y optimizaron los modelos tridimensionales de los ácidos grasos utilizados en el estudio con los software ArgusLab 4.0.1 disponible en: <http://www.arguslab.com> (Thompson, 2010) y Maestro versión 9.1 (Schrodinger, LLC, de Nueva York, NY, 2010). Para analizar el acoplamiento, se eliminó el ligando de la estructura del dominio unión-ligando CviR usando del software UCSF Chimera paquete 1.6 (Pettersen *et al.*, 2004). La estructura de dominio de unión-ligando CviR y los modelos de ácidos grasos se prepararon para el acoplamiento, utilizando el software ADT 1.5.2 (Sanner, 1999; Morris *et al.*, 2009). El análisis de acoplamiento del dominio de unión-ligando CviR con los diferentes ácidos grasos se llevó a cabo usando el software Autodock 4.2.5.1 disponible en: <http://autodock.scripps.edu/>

(Huey *et al.*, 2007). Cien conformaciones de cada ácido graso se obtuvieron después del acoplamiento y se agruparon para el análisis utilizando el software ADT 1.5.2. Las conformaciones seleccionadas corresponden a los valores más bajos de energía vinculante y constante de disociación (K_d). Los análisis de las estructuras resultantes y la generación de las figuras se hizo con PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.r1, Schrodinger, LLC).

3.8. Estudios *in vivo*.

3.8.1. Preparación del inóculo bacteriano.

De un placa de cultivo con dos días de crecimiento se tomaron dos colonias y se resuspendieron en 5 ml de medio LB en un tubo de 50 ml (Falcón). El inóculo se mantuvo en agitación a 200 r.p.m., a 28°C durante 24 h. Posteriormente se ajustó a un volumen final de 13 ml con una $D.O._{660nm}=0.5-0.6$. Diez mililitros fueron transferidos a 10 tubos (1 mL por tubo) de plástico estériles (Axygen 1.5 mL) y se centrifugaron a 15,000 r.p.m. por un minuto en una centrifuga (Microfuge E BECKMAN, USA). El sobrenadante se desechó y la pastilla bacteriana se lavó con 1ml de PBS estéril. Se volvió a centrifugar a 15,000 r.p.m. por 1 minuto y la pastilla bacteriana se resuspendió en 1ml de PBS estéril, el cual se empleó para inocular a los animales.

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) se utilizó la metodología de cuenta viable (Reynolds, 2013). Del inóculo final, se tomaron 100 μ l y se realizaron diluciones seriales 1/10 en volúmenes de 900 μ l en PBS estéril hasta 1×10^{-10} . Se sembraron 20 μ l de las diluciones pares en una placa de LB dividida en 5 regiones, las cuales se incubaron a 28°C por tres días. Se cuantificó el número de colonias y se consideraron para el cálculo las diluciones que tuvieran el intervalo de 30 a 300 colonias.

Para el cálculo de las U.F.C. que se inoculó a los ratones, se emplearon las siguiente fórmulas: número de colonias x factor de dilución = U.F.C./ 20 μ l y después 300 μ l x U.F.C./ 20 μ l entre 20 μ l = número de U.F.C./ratón.

3.8.2 Efecto de la dieta a base de semillas en la supervivencia de ratones infectados con *C. violaceum*.

3.8.2.1. Preparación de pellets de semillas.

Las semillas se pulverizaron en una licuadora (Hamilton Beach Mod. 600-6) y se mezclaron con agua destilada (2:1, p:v) para formar una pasta, la cual se moldeó en pellets que se dejaron secar a temperatura ambiente (Figura 12) para posteriormente administrarse como dieta a los animales.



Figura 12. Comprimidos hechos a base de semillas (A: chíá, B: amaranto y C: girasol) y agua destilada.

3.8.2.2. Inoculación y tratamientos.

Los animales se dejaron en ayuno por 13 h con libre acceso a agua y tres horas antes de la inoculación (vía intraperitoneal con 300 μ L de una concentración bacteriana $\sim 1.1 \times 10^9$ U.F.C.) se les suministraron las distintas dietas (Figura 13) las cuales se mantuvieron durante toda la fase experimental que fue de 2 días.

Se manejaron grupos de 5 a 6 animales, como control negativo se usó alimento comercial de la marca Purina con las siguientes especificaciones nutrimentales: humedad 12% máximo, grasa 3% mínimo, proteína 23% mínimo y fibra 6% máximo.

Para las condiciones experimentales se les proporcionó los distintos pellets hechos de semillas de girasol, chía y amaranto. Se evaluó la supervivencia de los animales cada 6 h.

El experimento se realizó con dos repeticiones independientes, se observó la mortalidad en el tiempo y los datos fueron transformados a porcentaje de supervivencia.



Figura 13. Inoculación vía intraperitoneal (A) y alimentación con pellets de semillas (B).

3.8.3. Efecto de la administración oral de aceites de semillas en la supervivencia de ratones infectados con *C. violaceum*.

3.8.3.1. Inoculación y tratamientos.

Se formaron grupos de 10 animales, los cuales se sometieron a un ayuno de 6 h. Dos horas previas a la inoculación bacteriana (300 μ L de una concentración de $\sim 8.6 \times 10^{10}$ U.F.C vía intraperitoneal), se les administró vía oral mediante una cánula metálica 200 μ L de aceite de amaranto, chía, girasol y como control negativo a un grupo se le administró PBS (Figura 14). Durante toda la fase experimental (48 h) los grupos fueron alimentados con pellet comerciales y se evaluó la supervivencia cada 2 h. Los resultados de las tres repeticiones se transformaron a porcentaje de supervivencia.



Figura 14. Cánula metálica y administración oral de los aceites de semillas.

3.9. Análisis estadístico.

Las gráficas se procesaron con el software SigmaPlot versión 10 (Systat Software, Inc., San José California USA). A los resultados de los ensayos *in vitro* se les aplicó un ANOVA y la prueba de Dunnett ($\alpha=0.05$) para comparar las medias de los tratamientos con el control de DMSO (menor que el control) en el software Statistix versión 9 Analytical Software, Tallahassee, FL, EEUU). Los resultados *in vivo* se analizaron con el test de U-Man Whitney ($\alpha=0.05$) en el software SPSS versión 15 (SPSS for Windows, Chicago, SPSS Inc.)

4. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de los aceites.

Las semillas de chía y girasol tuvieron mayor contenido de aceite con respecto a las de amaranto. En la Tabla 5 se muestra el contenido en porcentaje de cada uno de los aceites.

Tabla 5. Rendimiento de los aceites.

Aceite	Rendimiento (%)
Amaranto	5.5
Chía	33.2
Girasol	37.5

4.2. Análisis por CCF de los aceites.

Las placas cromatográficas con las muestras de aceite fueron eluidas en diferentes proporciones de hexano: acetato de etilo y se asperjaron con reveladores específicos para analizar ácidos grasos. En la Figura 15 se muestran las placas con los aceites y algunas muestras de referencia reveladas.

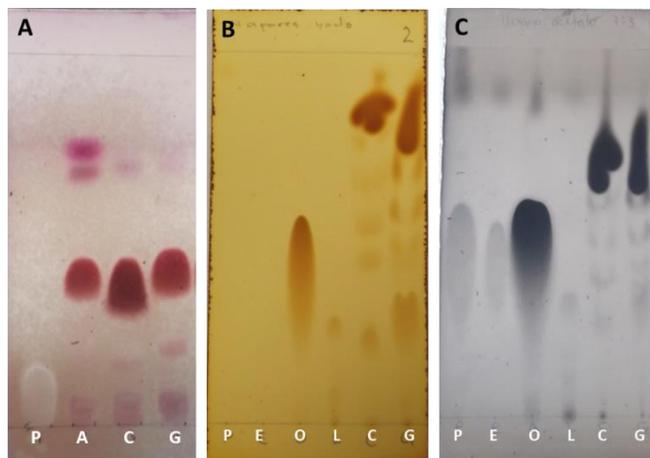


Figura 15. Cromatoplasmas de los aceites. **A)** Fase móvil (FM): hexano-acetato de etilo (9:1, v:v), revelador: vainillina en ácido sulfúrico (1%). **B)** FM: hexano-acetato de etilo (7:3, v:v), rev.: vapores de yodo. **C)** FM: hexano-acetato de etilo (7:3, v:v), rev.: Ácido sulfúrico al 50% en metanol + 110°C (45 min.). P: ác. palmítico, A: amaranto, C: chía, G: girasol, E: ác. esteárico, O: ác. oleico, L: ác. linoleico.

4.3. Evaluación *in vitro* de los aceites de semillas oleaginosas.

4.3.1. Los aceites inhiben la producción de violaceina en *C. violaceum*.

Los tres aceites mostraron un efecto positivo en la inhibición de la producción de violaceina (Figura 16). Ensayos previos confirmaron que no todos los aceites pueden tener este efecto, ya que encontramos que los aceites de canola y cártamo estimularon la producción del pigmento (datos no mostrados).

En la Figura 16 se observa que ninguna de las concentraciones evaluadas inhibió el crecimiento bacteriano, sin embargo se aprecia un efecto dosis-respuesta en la producción de violaceina. Las concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fueron significativamente diferentes con respecto al control (DMSO), inhibiendo de un 50 al 80 % la producción de violaceina, respectivamente. El efecto del control positivo (AA: mezcla de ácidos anacárdicos) y los aceites de amaranto y chíya a la concentración de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue muy similar.

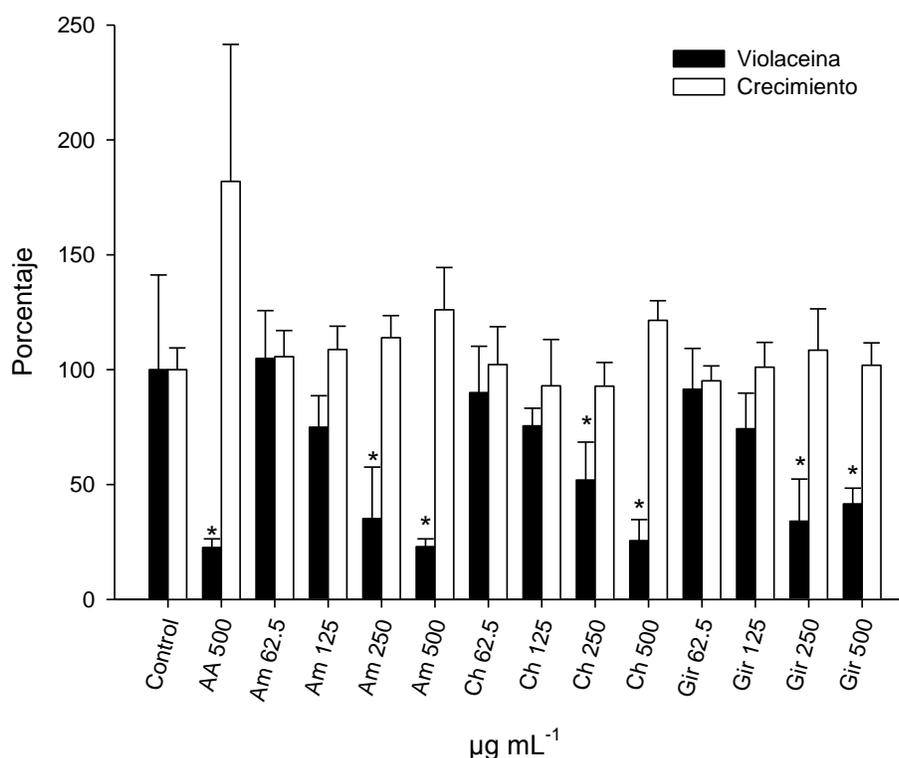


Figura 16. Efecto de las diferentes concentraciones de aceites en la producción de violaceina y crecimiento bacteriano en *C. violaceum*. Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media. * Estadísticamente significativo comparado con el control (prueba de Dunnett ($\alpha= 0.05$)). AA: mezcla de ácidos anacárdicos, Am: amaranto, Ch: chíya, Gir: girasol.

4.3.2. Los aceites inhiben la actividad de la exoproteasa alcalina en *C. violaceum*.

La exoproteasa alcalina es otro de los fenotipos que se reportó recientemente que es regulado por el SPQ de *C. violaceum* (Oca-Mejía *et al.*, 2015). En este ensayo se probó el efecto de los aceites en la inhibición de la actividad de la enzima. Los resultados mostraron que los aceites de chía y girasol inhibieron significativamente actividad de la exoproteasa con respecto al control sin tratamiento (Figura 17), mientras que el efecto del aceite de amaranto no fue significativo.

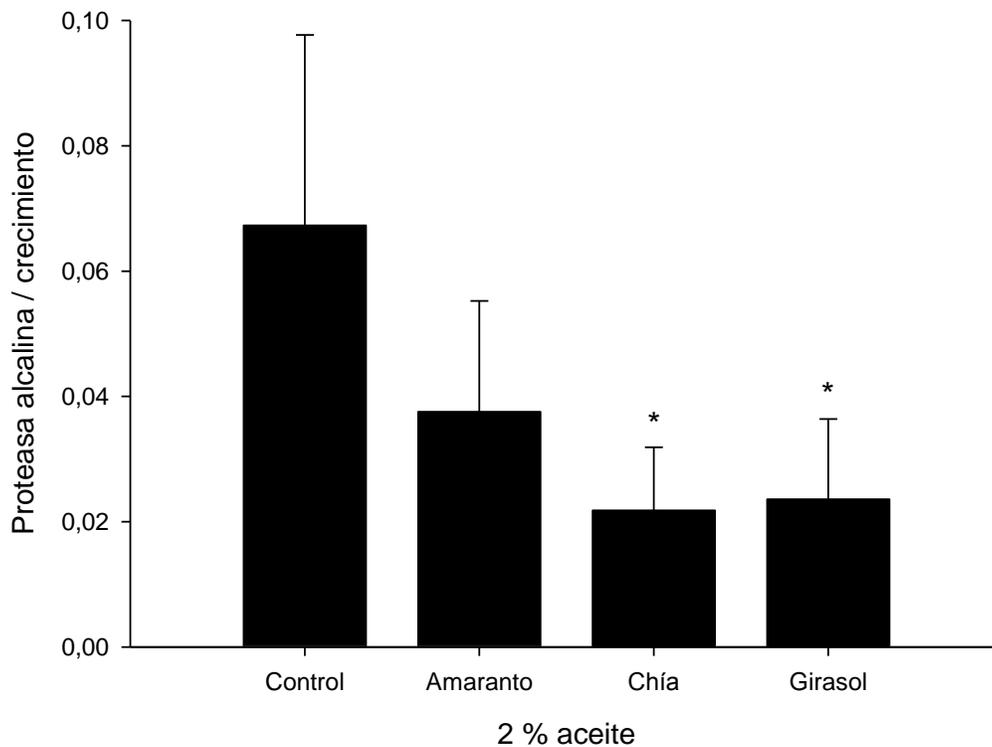


Figura 17. Efecto de la aplicación de los aceites en la actividad de la exoproteasa alcalina en *C. violaceum*. Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media.

* Estadísticamente significativo comparado con el control (prueba de Dunnett ($\alpha=0.05$)).

Al inhibir dos de los fenotipos regulados por el SPQ en *C. violaceum* sugiere que los aceites, principalmente de chía y girasol pueden contener moléculas con potencial I-SPQ sobre *C. violaceum*.

4.4. Composición de los aceites de las semillas evaluadas.

Para conocer las diferencias en la composición de ácidos grasos de los aceites de las semillas de girasol, chía y amanto se obtuvieron derivados metilados y se analizaron mediante CG/EM. Los tres aceites mostraron estar compuestos de ácidos grasos similares, sin embargo la proporción fue distinta (Figura 18). El aceite de girasol tuvo el porcentaje más alto de AG insaturados (89.39 %) siendo los ácidos oleico (40%) y linoleico (39%) los más abundantes. Mientras que la cantidad total de AG saturados fue de 19.7%, siendo el ácido palmítico con el 15.1% (Tabla 6) el más representativo. En el aceite de amaranto, la proporción de AG insaturados fue la más baja de las tres muestras con 55.8%, sin embargo, fue el que tuvo una mayor cantidad de AG saturados (44.14%), siendo el ácido palmítico el componente principal con 38.8 % (Tabla 6). Mientras que el aceite de chía presentó concentraciones intermedias de AG insaturados (76.8%), AG saturados (23.1%) y ácido palmítico (19.1%) (Tabla 6). En el caso del ácido esteárico la proporción fue similar en los tres aceites, sin embargo, el ácido mirístico solamente fue identificado en los aceites de girasol y amaranto (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de los aceites de las semillas de amaranto, chía y girasol.

Ácido graso	% de ácidos grasos totales		
	Girasol	Chía	Amaranto
Mirístico (14:0)	0.42	--	0.89
Palmítico (16:0)	15.14	19.14	38.88
Margárico (17:0)	--	--	0.38
Esteárico (18:0)	4.18	4.01	3.50
Araquídico (20:0)	--	--	0.49
AG saturados totales	19.74	23.14	44.14
<i>Trans</i> -13 octadecenoico (18:1n-5)	4.18	0.59	0.65
Oleico (18:1n-9)	40.20	58.73	19.95
Linoleico (18:2n-6)	39.01	17.51	35.21
AG insaturados totales	83.39	76.83	55.81

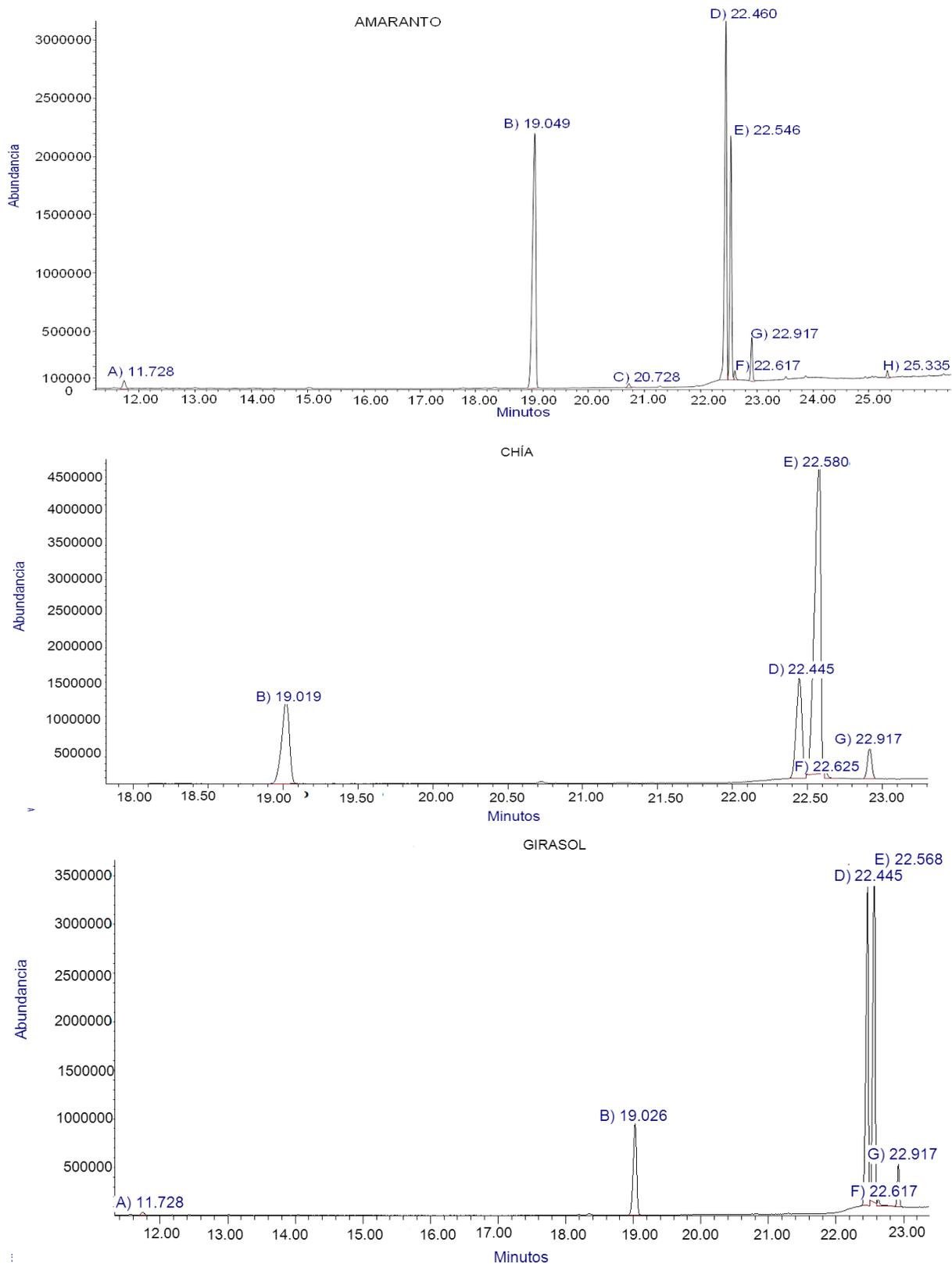


Figura 18. Cromatogramas de los aceites y la abundancia de ácidos grasos. A) ácido mirístico, B) ácido palmítico, C) ácido margárico, D) ácido linoleico, E) ácido oleico, F) ácido trans-13-octadecenoico, G) ácido esteárico, H) ácido araquídico. Espectros de masas en anexos.

Con el objetivo de determinar el efecto I-SPQ de manera individual de los principales ácidos grasos presentes en los aceites, se procedió a realizar un estudio de relación estructura-actividad *in vitro*, empleando moléculas adquiridas comercialmente.

4.5. Evaluación *in vitro* de los AG saturados (SAFA).

4.5.1 Crecimiento bacteriano y producción de violaceina en *C. violaceum*.

De los once SAFAs y las concentraciones probadas, sólo los ácidos láurico, mirístico, esteárico y palmítico mostraron un efecto positivo en la inhibición del pigmento, a la concentración de 1 mM (Tabla 7). El análisis estadístico mostró que son significativamente diferentes con respecto al control (DMSO) los ácidos láurico, mirístico y esteárico. Estas moléculas no afectaron significativamente el crecimiento bacteriano (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de los SAFA en el crecimiento bacteriano y producción de violaceina en *C. violaceum*.

Ácido graso	Nombre IUPAC (Ácido)	% Inhibición [1mM]	
		Violaceina	Crecimiento
Caproico	Hexanoico (6:0)	---	---
Caprílico	Octanoico (8:0)	---	---
Pelargónico	Nonanoico (9:0)	---	---
Cáprico	Decanoico (10:0)	---	---
Láurico	Dodecanoico (12:0)	84.38±1.18*	---
Mirístico	Tetradecanoico (14:0)	79.55±5.21*	3.35±39.64
Palmítico	Hexadecanoico (16:0)	41.76±34.41	6.47±17.04
Esteárico	Octadecanoico (18:0)	63.02±11.54*	---
Araquídico	Eicosanoico (20:0)	---	---
Behénico	Docosanoico (22:0)	---	---
Lignocérico	Tetracosanoico (24:0)	---	---

* Estadísticamente significativo comparado con el control (test de Dunnett ($\alpha= 0.05$)).

± Representa la desviación estándar de la media. ---= sin efecto.

Una característica interesante de las moléculas activas es que su longitud de cadena va de 12 a 18 átomos de carbono, longitudes menores o mayores a estas no tuvieron efecto sobre la inhibición de violaceina.

4.6. Evaluación *in vitro* de los AG insaturados (MUFA Y PUFA).

4.6.1. Crecimiento bacteriano y producción de violaceina en *C. violaceum*.

Los AG insaturados probados mostraron principalmente un efecto bactericida, debido a que inhibieron el crecimiento de la bacteria, por lo que la inhibición en la violaceina no puede atribuirse a un efecto I-SPQ, además que no fueron significativos estos valores (Tabla 8). El ácido erúcido es el único que no afectó el crecimiento bacteriano, pero su efecto en la inhibición de la violaceina no fue significativo. Contrario a esto, los ácidos oleico, linoleico, linolénico araquidónico y cervónico, mostraron un efecto bactericida significativo en la inhibición del crecimiento de *C. violaceum*, cuya actividad es directamente proporcional al número de insaturaciones en la cadena alifática. Siendo el más efectivo en inhibir el crecimiento de la bacteria el cervónico, conocido popularmente como DHA con el 92% y con seis insaturaciones.

Tabla 8. Efecto de los MUFA y PUFA en el crecimiento bacteriano y producción de violaceína en *C. violaceum*.

Ácido graso	Nombre IUPAC (Ácido)	% Inhibición [1mM]	
		Violaceína	Crecimiento
Palmitoleico	<i>cis</i> -9-hexadecenoico (16:1)	43.46±14.73	19.25±10.54
Petroselínico	<i>cis</i> -6-octadecenoico (18:1)	70.30±11.34	10.42±17.70
Elaidico	<i>trans</i> -9-octadecenoico (18:1)	64.71±26.61	22.71±22.39
Oleico	<i>cis</i> -9-octadecenoico (18:1)	60.24±17.88	22.95±9.51*
Linoleico	<i>cis</i> -9,12,15- octadecatrienoico (18:2)	48.02±21.34	37.51±4.37*
Linolénico (ALA)	<i>cis</i> -9,12,15- octadecatrienoico (18:3)	34.57±16.51	64.48±3.92*
Araquidónico (ARA)	<i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetrienico (20:4)	48.53±20.64	79.59±18.32*
Erúcico	<i>cis</i> -13-docosenoico (22:1)	46.85±8.59	---
Cervónico (DHA)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico (22:6)	57.65±13.38	92.51±9.01*
Nervónico	<i>cis</i> -15-tetracosanoico (24:1)	---	---

* Estadísticamente significativo comparado con el control (test de Dunnett ($\alpha = 0.05$)).

± Representa la desviación estándar de la media. ---= sin efecto.

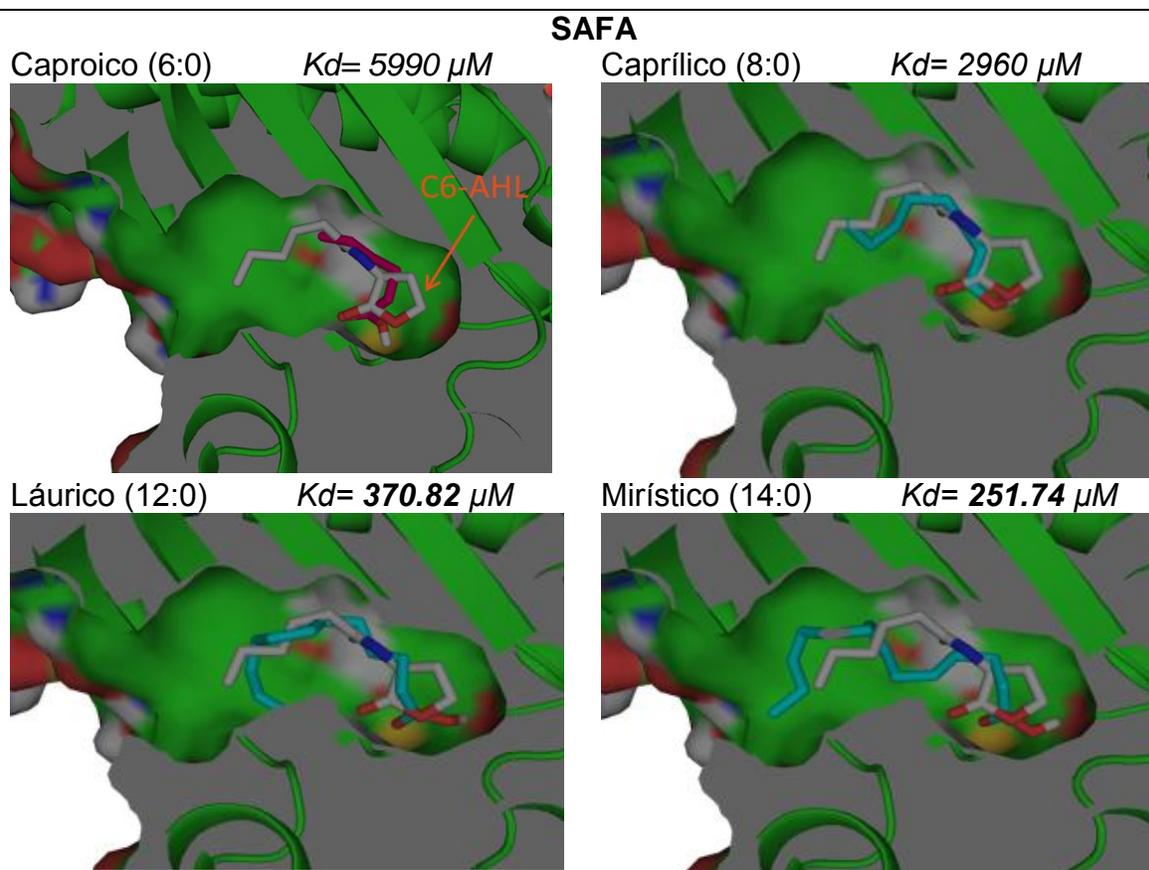
4.7. Análisis de acoplamiento molecular de SAFA y MUFA en el sitio activo de la proteína CviR.

Con el fin de investigar si la actividad I-SPQ de *C. violaceum* por los AG está relacionado con su unión y por lo tanto la inhibición del receptor CviR, se realizó un análisis de acoplamiento molecular utilizando el programa de simulación Autodock. Las conformaciones del complejo CviR-AG seleccionados corresponden a los valores más bajos de constantes de disociación (K_d) (Tabla 9). Como modelo de referencia, el autoinductor natural C6-AHL estaba acoplado en el dominio de unión-ligando CviR (Tabla 9). Los resultados del análisis de acoplamiento molecular sugieren que la actividad I-SPQ exhibida por los aceites de las semillas, podría estar relacionado con la unión de los SAFA de cadena larga (12 a 18 átomos de carbono) a CviR.

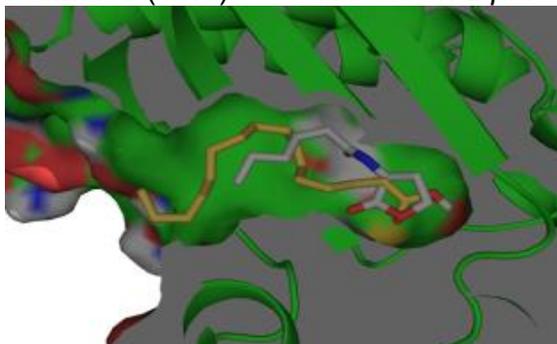
El acoplamiento de SAFA (12 a 18 átomos de carbono) en el sitio activo CviR mostró los valores de K_d de 251.74 μM a 879.72 μM (Tabla 9). De éstos, los ácidos láurico,

mirístico y esteárico tuvieron los valores más bajos de K_d de la conformación más favorecida, lo que sugiere una mayor afinidad de unión al sitio activo de la proteína CviR. En contraste, el ácido lignocérico (con una cadena más larga hidrófoba) y el ácido caproico (con una cadena hidrófoba más corto) no mostraron una disposición estable en el interior del sitio activo de la proteína (Tabla 9). Además, los ácidos grasos monoinsaturados (ácidos elaidico, oleico y erúcico) se acoplaron en el sitio activo con valores de K_d en el rango de 1060 a 8390 μM (Tabla 9).

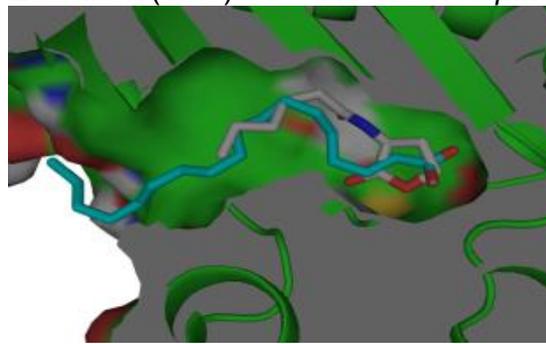
Tabla 9. Acoplamiento molecular de algunos SAFA y MUFA en el sitio activo de la proteína CviR.



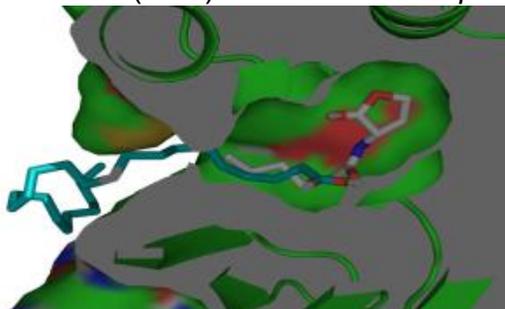
Palmítico (16:0) $K_d = 879.72 \mu M$



Esteárico (18:0) $K_d = 838.33 \mu M$

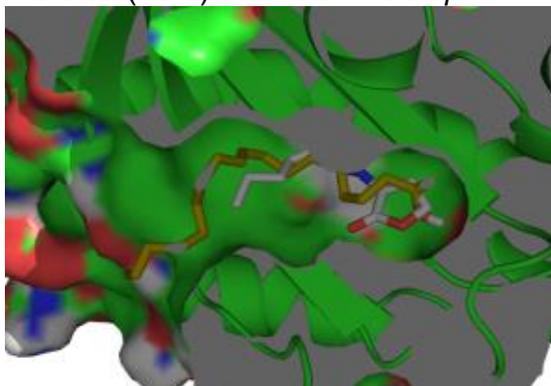


Lignocérico (24:0) $K_d = 140880 \mu M$

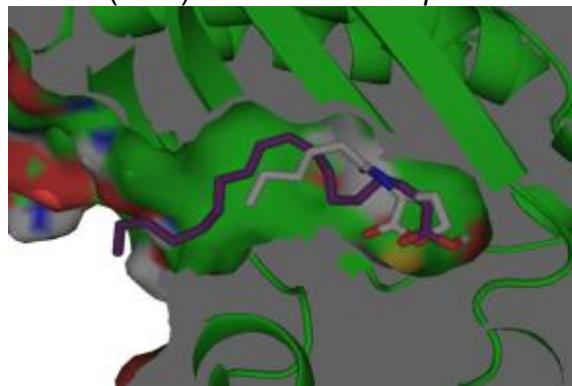


MUFA

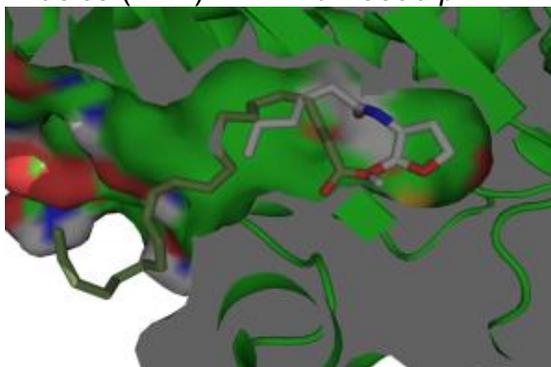
Elaidico (18:1) $K_d = 1060 \mu M$



Oleico (18:1) $K_d = 1190 \mu M$



Erúxico (22:1) $K_d = 8390 \mu M$



4.8. Evaluación *in vivo*.

4.8.1. El consumo de semillas de girasol aumenta la supervivencia de ratones infectados con *C. violaceum*.

Se observó una diferencia significativa en el aumento de la supervivencia de animales que consumieron comprimidos de semilla de girasol en comparación con el grupo control alimentado con la dieta comercial (Figura 19). El máximo efecto se presentó a las 36 h de experimentación con un aumento en la supervivencia del 33%, y se mantuvo hasta las 48 h en que se concluyó el experimento. Para este experimento los animales fueron inoculados con $\sim 1.1 \times 10^9$ U.F.C./ratón causando un 75 % de mortalidad en el grupo control. Es importante señalar que cuando el inóculo bacteriano se aumentó a $\sim 1 \times 10^{14}$ U.F.C./ratón, causó 100% de mortalidad en el grupo de control y no se observó efecto significativo de la dieta de girasol sobre la supervivencia de los animales (datos no mostrados). En el caso de los pellets de chíá se observó la misma tendencia (aumento del 10% en la supervivencia), pero este no fue significativo. Los pellets de amaranto no fueron consumidos por los animales en los experimentos anteriores, por lo que no se incluyeron en este ensayo.

Cabe señalar que el estado general de los animales sobrevivientes era malo, presentaron una reducción en el movimiento y el apetito. Además, la infección les causó estreñimiento e inflamación de los párpados. También, se pudo aislar la bacteria del hígado de estos animales lo que indica una propagación grave de la infección.

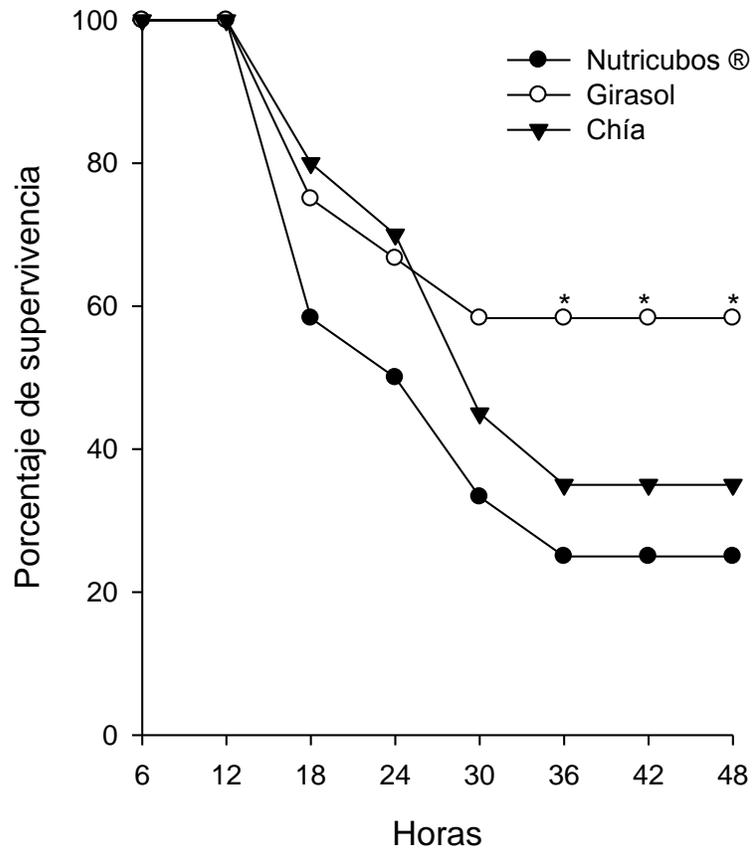


Figura 19. Efecto del consumo de comprimidos de semillas de girasol y chía en la supervivencia de ratones infectados con *C. violaceum*. Los animales se mantuvieron en un ayuno prolongado de 13 h y 3 h previas a la infección se proporcionaron las dietas que se conservaron hasta el final del experimento (48 h). Promedio de dos experimentos con $n = 6$, inoculados con un promedio de $\sim 1.1 \times 10^9$ U.F.C. *significancia estadística $p < 0.05$; U Man-Whitney.

4.8.2. La administración oral de aceite de girasol aumentan la supervivencia de ratones infectados con *C. violaceum*.

Con los tres aceites evaluados se observó una tendencia de retraso de la muerte de los animales, sin embargo únicamente el aceite de girasol mostró valores significativos (Figura 20). Con un inóculo de $\sim 8.6 \times 10^{10}$ U.F.C. se registró la muerte del 100 % de los animales a las 22 h después de ser tratados con PBS y a las 26 h para los tratados con aceite de amaranto. Para el caso de los tratados con aceite de chía presenta un aumento de la supervivencia de 6.6 %. El aceite que mostró un mejor efecto fue el de girasol, el cual presenta valores significativos desde las

primeras horas de infección y retrasa la muerte de los animales en 10 % hasta las 48 h, que fue el tiempo en que se concluyó el experimento.

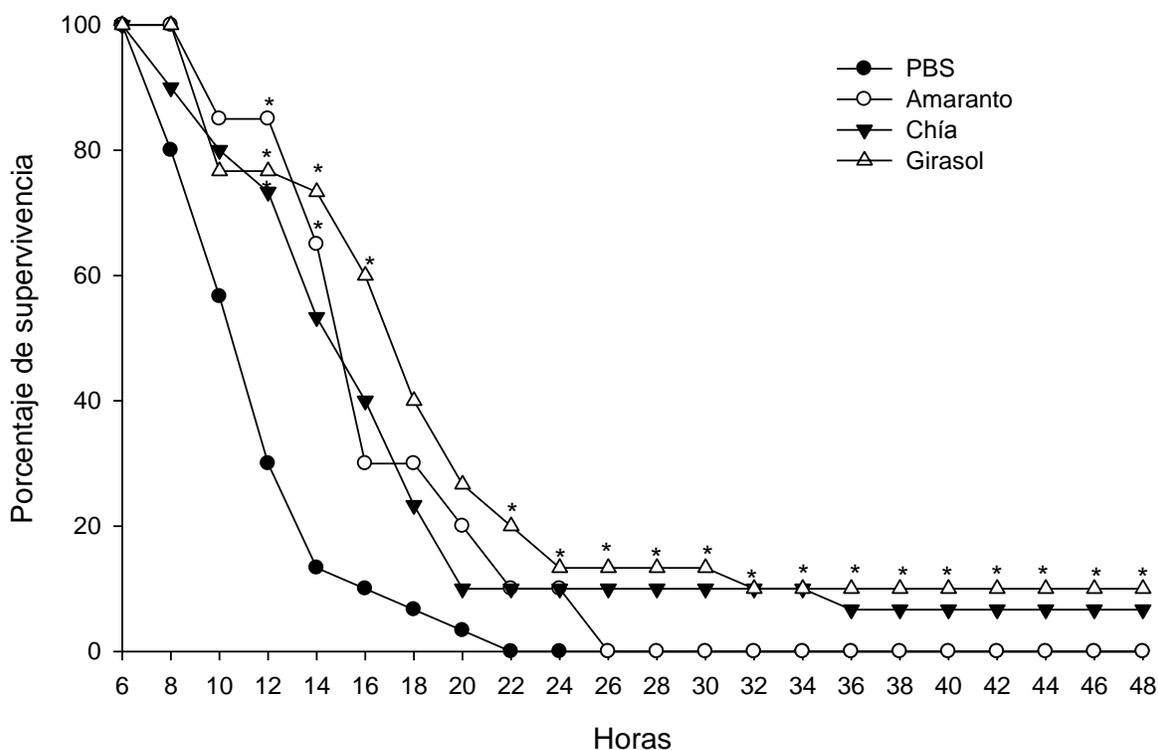


Figura 20. Efecto de la administración oral de los aceites de girasol, chía y amaranto en la supervivencia de ratones infectados con *C. violaceum*. Los animales se sometieron a un ayuno prolongado de 6 h y 2 h previas a la infección se administró oralmente 0.2 mL de los distintos aceites mediante una cánula metálica. Promedio de tres experimentos con n = 10. Inoculados con un promedio de $\sim 8.6 \times 10^{10}$ C.F.U. *significancia estadística $p < 0.05$; U Man-Whitney.

5. DISCUSIÓN

Este estudio se centró en analizar el efecto protector inducido por el **consumo de semillas** oleaginosas ante una infección bacteriana, por un mecanismo que implica la I-SPQ empleando la bacteria *C. violaceum*. Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, únicamente las semillas de girasol mostraron un efecto significativo al retardar la muerte y aumentar la supervivencia de los animales. Este efecto es muy relevante, debido a que representa el primer informe en el que se demuestra que el consumo de semillas o sus aceites, pueden ayudar a proteger de un proceso infeccioso en un sistema modelo con animales vertebrados. De igual manera, resulta importante mencionar que este efecto se presenta en una condición que se puede considerar extrema, debido a que se manejaron inóculos bacterianos altos y una vía de administración que facilita a la bacteria su ingreso a sangre, así como diseminarse rápidamente y generar septicemia.

El efecto positivo obtenido se presentó con la ingesta de las semillas (o aceites) horas antes de la infección y previo a un ayuno prolongado. Sin embargo, no se determinó si el consumo posterior de las semillas pudiera potencializar el efecto. La mayoría de los animales unas horas después de la inoculación, presentaron un cambio conductual en el que redujeron su movimiento y ya no consumían alimento ni agua. Esta situación limitó el seguimiento de los ensayos a tiempos mayores de 48 h, porque éticamente no es posible mantener a los animales en esa condición. Además la muerte podría deberse a un proceso de deshidratación e inanición y no a la infección como tal.

Por otra parte, en ensayos previos con las distintas dietas de semillas se observó que los animales no consumían los pellets de amaranto, así como no se controlaba la cantidad de semilla o dosis por animal. De tal manera que para homogenizar estos parámetros se decidieron obtener los **aceites de las semillas** y administrarlos vía oral mediante una cánula metálica.

Cabe señalar que se emplearon distintos inóculos bacterianos para los dos ensayos, pero ambos fueron mayores a los reportados en la literatura para este modelo ya que con 1×10^5 U.F.C./ratón bajo las condiciones experimentales manejadas no se alcanzaba el 100% de mortalidad (Miki *et al.*, 2010). Así también, no se observaron lesiones en el hígado como se reporta en el estudio de Miki *et al.* (2010), sin embargo los animales presentaron piloerección, disminución de movilidad, así como abultamiento en la zona cercana al ano (posible estreñimiento) y en algunos casos ceguera. A pesar de que no se cuantificó la bacteria en los animales, si se aisló del hígado y bazo.

Para el ensayo de *consumo de semillas* se empleó la concentración bacteriana de $\sim 1 \times 10^9$ U.F.C./ratón con lo que se obtuvo 70% de mortalidad del grupo control, ya que a concentraciones mayores no se observó un efecto positivo claro de la protección de las semillas. En cuanto a la *administración del aceite* se usó un inóculo bacteriano de $\sim 8 \times 10^{10}$ U.F.C./ratón con el que se obtuvo 100 % de mortalidad en el grupo control tratado con PBS y se pudo observar una tendencia por parte de los tres aceites en retrasar la muerte y aumentar la supervivencia de los animales, pero únicamente se registraron efectos significativos en los tratados con el de girasol. Sin embargo, es factible que aumentando el número de dosis o disminuyendo el inóculo bacteriano, el efecto se potencialice y resulten significativos los demás.

En este sentido para fines de esta investigación, resultaba interesante y ventajoso que los tres aceites mostraran diferentes grados de actividad bajo estas condiciones *in vivo*, ya que permitiría comparar la actividad registrada y correlacionarla con las diferencias en el tipo y contenido de metabolitos. Contario a esto, todos los aceites mostraron actividad I-SPQ determinado por inhibición de la violaceina y la exoproteasa de *C. violaceum*, aunque esta última no fue significativa para el amaranto.

Mediante el análisis de CG/EM se encontró que los tres aceites son ricos en AG, pero cada uno contiene diferente proporción de ellos. Mediante ensayos *in vitro* se

identificó como los responsables de la actividad I-SPQ a AG saturados de determinado largo de cadena (12 a 18 átomos de carbono), como los ácidos láurico, mirístico y esteárico. Es interesante que la longitud de la cadena de los AG y moléculas relacionadas juega un papel importante en la regulación (activación/inhibición) de distintos SPQ, tal es el caso de los AG saturados láurico y mirístico que pueden actuar como una señal que media la comunicación entre especies del género *Pseudomonas* (Fernández-Piñar *et al.*, 2012). Los AG monoinsaturados como el oleico y linygbióico inhiben el SPQ de *P. aeruginosa* y *C. violaceum* (Kwan *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013), al igual que la mayoría de los autoinductores integrantes de la familia DSF (Deng *et al.*, 2011). Estos resultados son importantes para la exploración y diseño de síntesis de nuevos I-SPQ a base de AG.

Este es el primer reporte de la actividad I-SPQ de AG (ácido láurico y mirístico) en el sistema de *C. violaceum*. De igual manera, los estudios de análisis “*docking*” se correlacionan con esta actividad indicando una posible relación estructural del largo de cadena de los AG y la unión con el receptor CviR de *C. violaceum*.

Por otra parte resulta interesante que el ácido palmítico a pesar de encontrarse dentro del largo de cadena de los AG I-SPQ, presenta la constante de disociación (*Kd*) más alta y su actividad *in vitro* no es significativa, esto contradice a otros reportes en los que lo señalan como uno de los posibles responsables de la actividad I-SPQ (Widmer *et al.*, 2007; Soni *et al.*, 2008). El único MUFA que mostró actividad I-SPQ fue el ácido erúxico, aunque su efecto es moderado, presentó un valor de *kd* muy alto indicando una baja interacción con el receptor CviR.

Contrario a lo anterior los PUFA, ácido oleico, linoleico, linolénico, araquidónico y cervónico mostraron actividad bactericida *in vitro*, cuya potencia es directamente proporcional al número de insaturaciones que presentan. El análisis *docking* mostró que los ácidos grasos con cadenas insaturadas no presentan una afinidad por el receptor CviR ya que se obtienen valores de *Kd* altos.

En la literatura se ha reportado que el ácido oleico, producido por una bacteria rizosférica (*Stenotrophomonas maltophilia* BJ01) muestra actividad I-SPQ en *C. violaceum* y antibiopelícula en *P. aeruginosa* (Singh *et al.*, 2013), sin embargo en este estudio registramos una inhibición significativa del crecimiento (22.9%) de *C. violaceum*. Asimismo, se ha reportado que ácido láurico presenta efecto bactericida sobre *Propionibacterium acnes* y *Enterococcus*, y el ácido caprílico contra bacterias coliformes (Yang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2002).

En cuanto al tipo de AG y proporciones identificadas en las muestras de aceites, estas presentan diferencias con respecto a las reportadas en la literatura, pero esto puede deberse al manejo y condiciones de cultivo, al cultivar o incluso al método de extracción del aceite (Ixtaina *et al.*, 2011).

Una de las diferencias que destaca del aceite de girasol, que fue el que mostró una actividad significativa *in vivo*, en su mayor contenido de AG insaturados totales (83.3 %) y baja cantidad de ácido palmítico (15.1%). Situación contraria con el amaranto que no mostró un efecto significativo, cuya proporción fue de 58.8% de AG insaturados y 38.8% de ácido palmítico.

Aunque los estudios *in vitro*, indican que el efecto I-SPQ y el bactericida se deben a determinada clase de AG, hasta el momento no es claro cuál es la participación de cada uno en el efecto positivo que se observa en los estudios *in vivo*, o en su caso se trate de una combinación de efectos.

Recientemente se ha reportado que la combinación de AG, DSF y estructuras relacionadas potencializan la susceptibilidad de bacterias a los antibióticos, aumentando su eficiencia contra diferentes géneros bacterianos (Deng *et al.*, 2014). De igual manera, es factible puedan intervenir otros fenómenos como son la regulación del sistema inmune por los AG (Fritsche, 2006). Sin embargo, Fenton *et al.* (2013) señalan que puede ser contraproducente el consumo de AG omega-3, debido a que su ingesta en pacientes puede conducir a alteraciones del sistema

inmune que dificulten la eliminación de infecciones por microorganismos. También, hay que considerar los procesos de bioconversión que se dan por enzimas en el hígado, ya que se ha visto que la presencia de ácido α -linolénico (ALA, 18:3 omega-3) actúa como un precursor aumentando los AG PUFA (ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 omega-6) y ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 omega-3) de cadena larga como un proceso de bioconversión en ratas alimentadas con semillas (González- Mañan *et al.*, 2012).

Con respecto a los resultados obtenidos: ¿Cuál de los dos efectos registrados *in vitro* es el responsable de la actividad mostrada *in vivo*? Se puede sugerir que se debe a un efecto bactericida dado por los PUFA que son mayoritarios en el girasol, pero también es factible que los SAFA puedan tener una participación como I-SPQ o potenciando la actividad bactericida de los PUFA. No obstante, al analizar la concentración de los dos AG I-SPQ (mirístico y esteárico), la proporción es muy similar en los tres aceites (girasol 4.6%, chía únicamente esteárico 4.01% y amaranto 4.39%). A pesar de esto, el menos activo que fue el de amaranto, presenta un 38.8% de ácido palmítico el cual no mostró actividad I-SPQ significativa, por lo que es factible que la presencia de este AG en particular este disminuyendo el efecto positivo que se registra *in vivo*, ya sea porque su presencia diluya la concentración de los AG activos (bactericida/I-SPQ) o intervenga directamente en la unión al receptor CviR y no permita que los AG mirístico o esteárico interactúen para bloquear el SPQ de *C. violaceum*.

En la literatura se ha reportado la **capacidad bactericida** de los AG SAFA y PUFA provenientes de moluscos sobre algunos géneros como son *Lactococcus garvieae* y *Vibrio* incluyendo *V. harveyi* (Benkendorff *et al.*, 2004), así como los presentes en el aceite de cocodrilo (*Crocodylus niloticus*) contra *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Buthelezi *et al.*, 2012), en ambos casos se les atribuye la actividad a los AG palmítico, esteárico, oleico, linoleico (Benkendorff *et al.*, 2004; Buthelezi *et al.*, 2012). Aunque los primeros reportes de AG presentes en alimentos con **capacidad I-SPQ** fueron obtenidos en carne de pollo ("Poultry meat") y res comercial (carne

molida), en donde se identifican extractos y fracciones enriquecidas con AG como el palmítico, oleico, linoleico y esteárico, los cuales inhiben el sistema AI-2 en la cepa biosensora de *Vibrio harveyi* y en el caso de los extractos de la carne molida, también contrarrestan la formación de biopelículas en *Escherichia coli* K-12 (Widmer *et al.*, 2007; Soni *et al.*, 2008). Pese a ello, este es el primer trabajo que reporta la actividad I-SPQ de semillas oleaginosas, en donde la concentración de ácidos grasos es superior que en otras fuentes comestibles, además de que se analiza sobre el sistema de AI del tipo de AHLs como es el de *C.violaceum*, la cual ha sido una bacteria modelo para el estudio de SPQ (McClellan *et al.*, 1997). También, se propone de manera más detallada la idea de dos actividades que pueden estar actuando, la I-SPQ debida a los SAFA y la bactericida a los PUFA.

Una limitante que presenta la aplicación de nuevas alternativas antimicrobianas incluidas las moléculas I-SPQ, es la falta de estudios *in vivo* que correlacionen los efectos encontrados en los estudios *in vitro* (Castillo-Juárez *et al.*, 2013), por lo que el efecto positivo en un modelo animal vertebrado es de gran relevancia. El empleo de *C. violaceum* para estudios *in vivo* es un buen sistema, debido a la sencillez de su SPQ (McClellan *et al.*, 1997). Se ha observado en otros sistemas modelo, como el del crustáceo planctónico *Daphnia magna*, que la administración de una dieta rica en ácidos grasos PUFA, aumenta su supervivencia y reproducción ante la exposición a un patógeno oportunista (*Pseudomonas* sp.). Se le atribuye este efecto al ácido araquidónico (ARA) disponible en las dietas y más probablemente al efecto de los eicosanoides derivados del ARA como resultado de una posible modulación en el patógeno o mecanismos de defensa del huésped (Schlotz *et al.*, 2014).

En otro trabajo se reporta que el ácido *cis*-2-dodecenoico (BDSF), es capaz de atenuar la virulencia de *P. aeruginosa* mediante la interferencia con su SPQ y sistemas de secreción tipo III, aumentando la supervivencia en el modelo de pez cebra (*Danio rerio*) frente a la infección con *P. aeruginosa* (Deng *et al.*, 2013).

Los resultados de este trabajo se complementan con los estudios previos y nos indican un potencial importante para la aplicación de moléculas del tipo AG para

usarse como alternativa para el control de infecciones bacterianas. Pero es necesario realizar más estudios encaminados a la eficiencia *in vivo*, así como al efecto que pueden tener en los SPQ de cada bacteria en las que se desee aplicar. Esto último considerando los resultados que hasta el momento se tienen, que indican que la interacción final de determinado AG, va a depender del género bacteriano, ya que pueden inhibir el crecimiento, favorecer la comunicación con otras especies, estimular o inhibir los SPQ. Con respecto a los aceites, se sugiere que el resultado final estará determinado por las proporciones de cada AG que contenga, por lo que la actividad aquí reportada pueda variar de acuerdo a la composición del aceite que se pretenda evaluar.

Así también, son necesario ensayos adicionales que se enfoquen en evaluar la actividad de los SAFA Y PUFA por separado en el modelo *in vivo*, además de cuantificar las bacterias en el hígado después de estos tratamientos. De igual manera, determinar el papel que juega el ácido palmítico y su concentración con respecto a la I-SPQ debida a los ácidos esteárico, láurico y mirístico.

6. CONCLUSIONES

- Los aceites de semillas oleaginosas como son las de girasol, chía y amaranto, contienen ácidos grasos que inhiben el SPQ de la bacteria *C. violaceum*.
- Los ácidos grasos I-SPQ de *C. violaceum* son del tipo saturados de cadenas de 12 a 18 átomos de carbono y se plantea actúan interfiriendo con la unión al receptor del autoinductor nativo (AHLs).
- Los aceites de las semillas oleaginosas contienen también ácidos grasos insaturados que presentan actividad bactericida sobre *C. violaceum*.
- Consumir las semillas o el aceite de girasol tienen un efecto benéfico para contrarrestar la infección por *C. violaceum in vivo*, no obstante faltan estudios para determinar la participación de los ácidos grasos I-SPQ y los bactericidas en este efecto.

7. LITERATURA CITADA

- Abd-Alla M.H. and Bashandy S.R. (2012). Production of quorum sensing inhibitors in growing onion bulbs infected with *Pseudomonas aeruginosa* E (HQ324110). *ISRN Microbiol.*, 2012: 161890.
- Aboki M.A., Mohammed M., Musa S.H., Zuru B.S., Aliyu H.M., Gero M., Alibe I.M. and Inuwa B. (2012). Physicochemical and anti-microbial properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil. *International Journal of Science and Technology*, 2(4): 151-154.
- Adonizio A., Kong K.F. and Mathee K. (2008). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south Florida plant extracts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(1): 198–203.
- Adonizio A.L., Downum K., Bennett B.C. and Mathee K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J. Ethnopharmacol.*, 105(3): 427-435.
- AgMRC. (2014). Agricultural Marketing Resource Center. Amaranth. Disponible en http://www.agmrc.org/commodities__products/specialty_crops/amaranth/ (acceso: 23-07-15).
- AlJumaily R.M., Al-ShammaN.M., Al-Halbosiy M.M. and Al-Shamma L.M. (2013). Anticancer activity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds oil against cell lines. *Iraqi J. Sci.*, 54(4): 1003-1009.
- ASN. American Society for Nutrition. (2009). The Real Scoop on Chia Seeds. Disponible en: <https://www.nutrition.org/asn-blog/2012/03/the-real-scoop-on-chia-seeds/> (acceso: 17-08-15).
- Anjali C. H., Madhusmita D., Chandrasekaran N. and Amitava M. (2010). Anti bacterial activity of sunflower oil microemulsion. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol 2, suppl 1.
- Ardón M.M. (1993). Agricultura Prehispánica y Colonial. Edit. Guaymuras. 187 p.
- Arija I., Viveros A., Brenes A. y Canales R. (1999). Estudio del valor nutritivo de la semilla de girasol entera descascarillada en raciones de pollos broiler y su

- efecto sobre la concentración de ácidos grasos en la grasa abdominal. *Arch. Zootec.*, 48: 249-259.
- Ayerza R., Coates W. and Lauria M. (2002). Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an ω -3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poult. Sci.*, 81: 826-837.
- Azam A., Ahmed A.S., Oves M., Khan M.S., Habib S.S. and Memic A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int. J. Nanomedicine*, 7: 6003-6009.
- Bale J. R. and Kauffman C.S. (1992). Special issue on grain amaranth: New potential for an old crop. *Food Rev. Int.*, 8: 1-190.
- Bassler B.L. and Losick R. (2006). Bacterially speaking. *Cell.*, 125(2): 237-246.
- Bassler B.L. (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.*, 109(4): 421-424.
- Becerra R. (2000). El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. CONABIO. *Biodiversitas*, 30: 1-6.
- Benkendorff K., Davis A.R., Rogers C.N. and Bremner J.B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 316 (1): 29–44.
- Bjarnsholt T., van Gennip M., Jakobsen T.H., Christensen L.D., Jensen P.Ø. and Givskov M. (2010). *In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect. *Nat. Protoc.*, 5(2): 282-293.
- Bjarnsholt T. and Givskov M. (2007). The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387(2): 409-414.
- Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Rasmussen T.B., Christophersen L., Calum H., Hentzer M., Hougen H.P., Rygaard J., Moser C., Eberl L., Høiby N. and Givskov M. (2005). Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151(12): 3873-3880.

- Blackman B. K., Scascitelli M., Kanec N.C., Lutona H.H., David A. Rasmussen D.A., Byed R.A., Lentze D.L. and Rieseberg L.H. (2011). Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(34): 14360-14365.
- Britto C.M., Luz K.G., de Albuquerque D.L., Nunes M.M. and Almeida D. (2014). *Chromobacterium violaceum*: a fatal case in the northeast of the Brazil. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 50(4): 278-279.
- Bukasov S.M. (1963). Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia. Versión al español de Jorge León. CATIE, Costa Rica. 168 p.
- Busilacchi H., Qüesta T. y Zuliani S. (2015). La chía como una nueva alternativa productiva para la región pampeana. *Agromensajes* 41: 37-46
- Büttner D. and Bonas U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34(2): 107-133.
- Buthelezi S., Southway C., Govinden U., Bodenstien J. and du Toit K. (2012). An investigation of the antimicrobial and anti-inflammatory activities of crocodile oil. *J. Ethnopharmacol.*, 143: 325–330.
- Bye R., Linares E. y Lentz D. (2009). México: centro de origen de la domesticación del girasol. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 12(1): 5-12.
- Cahill J.P. (2005). Human selection and domestication of chia (*Salvia hispanica* L.). *J. Ethnobiol.*, 25(2): 155-174.
- Cahill J.P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, 57(4): 604-618.
- Casellas J. M. (2011). Antibacterial drug resistance in Latin America: consequences for infectious disease control. *Rev. Panam. Salud Públ.*, 30: 519-528.
- Castillo-Juárez I., García-Contreras R., Velázquez-Guadarrama N., Soto-Hernández M. and Martínez-Vázquez M. (2013). Anacardic acid from *Amphypterygium adstringens* inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Med. Res.*, 44: 488-494.

- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/> (acceso: 28-07-15).
- Choi S., Isaacs A, Clements D., Liu D., Kim H., Scoth R.W., Winkler J.D. and DeGrado W.F. (2009). De novo design and in vivo activity of conformationally restrained antimicrobial arylamide foldamers. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(17): 6968–6973.
- Chong Y.M., Yin W.F., Ho C.Y., Mustafa M.R., Hadi A.H., Awang K., Narrima P., Koh C.L., Appleton D.R. and Chan K.G. (2011). Malabaricone C from *Myristica cinnamomea* exhibits anti-quorum sensing activity. *J. Nat. Prod.*, 74(10): 2261-2264.
- Coates W. and Ayerza R. (2009). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed as an n-3 fatty acid source for finishing pigs: effects on fatty acid composition and fat stability of the meat and internal fat, growth performance, and meat sensory characteristics. *J. Anim. Sci.*, 87: 3798–3804.
- COFEPRIS. (2014). Guía de manejo y asistencia en la dispensación de medicamentos e insumos para la salud en farmacias. Disponible en: www.cofepris.gob.mx/Documents/LoMasReciente/10042014.pdf (acceso: 28-07-15).
- Comité Nacional Sistema-Producto Oleaginosas. (2015). Las oleaginosas. <http://www.oleaginosas.org> (acceso: 16-07-15)
- Danby S., Aienezi T., Sultan A., Lavender T., Chittock J., Brown K. and Cork M. (2013). Effect of olive and sunflower seed oil on the adult skin barrier: Implications for neonatal skin care. *Pediatr. Dermatol.*, 30(1): 42–50.
- Davies D.G. and Marques C.N. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.*, 191(5): 1393-1403.
- Deng Y., Wu J., Tao F. and Zhang L. (2011). Listening to a new language: DSF-Based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem. Rev.*, 111: 160-173.
- Deng Y., Lim A., Lee J., Chen S., An S., Dong Y.H. and Zhang L.H. (2014) Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules

- enhance the antimicrobial efficacy of antibiotics against some bacterial pathogens. *BMC Microbiol.*, 14: 51.
- Deng Y., Boon C., Chen S., Lim A. and Zhang L.H. (2013). Cis-2-dodecenoic acid signal modulates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* through interference with quorum sensing systems and T3SS. *BMC Microbiol.*, 13: 231.
- Dresler A., Wirtz V.J., Corbett K.K. y Echániz G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública Mex.*, 50(4): S480-S487.
- Duran N., Justo G.Z., Ferreira C.V., Melo P.S., Cordi L. and Martins D. (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol. Appl. Bioc.*, 4(3): 127-133.
- Elokely K.M. and Doerksen R.J. (2013). Docking challenge: protein sampling and molecular docking performance. *J. Chem. Inf. Model.*, 53(8): 1934-1945.
- FAO. (2015a). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. Disponible en:<http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm#TopOfPage> (acceso: 10-07-15)
- Fenton J.I., Hord N.G., Ghosh S. and Gutzell E.A. (2013). Immunomodulation by dietary long chain omega-3 fatty acids and the potential for adverse health outcomes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 89(6): 379-390.
- Fernández-Piñar R., Espinosa-Urgel M., Dubern J.F., Heeb S., Ramos J.L. and Cámara M. 2012. Fatty acid-mediated signalling between two *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol. Rep.*, 4(4): 417-423.
- Fritsche K. (2006). Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu. Rev. Nutr.*, 26: 45-73.
- Ganin H., Rayo J., Amara N., Levy N., Krief P. and Meijler M.M. (2013). Sulforaphane and erucin, natural isothiocyanates from broccoli, inhibit bacterial quorum sensing. *Med. Chem. Commun.*, 4: 175-179.
- Gervas J. (2000). La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Atención Primaria*, 25(8): 589-596.
- Givskov M., de Nys R., Manfield M., Gram L., Maximilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P.D. and Kjelleberg S. (1996). Eukaryotic interference with

- homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol.*, 178(22): 6618-6622.
- Guevara-Cruz M., Tovar A.R., Aguilar-Salinas C.A., Medina-Vera I., Gil-Zenteno L., Hernández-Viveros I., López-Romero P., Ordaz-Nava G., Canizales-Quinteros S., Guillen P.L. and Torres N. (2012). A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 142(1): 64-69.
- Guillet H. (1981). Le chia, graine mucilagineuse mexicaine, fait son apparition en France. *J. Agric. Trad. Bot. Appl.* 28: 183-187.
- González G. (2014). Cultivos ancestrales: semillas de amaranto y chía, y papa andina. En Informe final Desarrollo institucional para la inversión. Disponible en: www.fao.org/fileadmin/user_upload/rlc/utf017arg/valles.../08.pdf (acceso: 10-07-15)
- González-Islas V. (2013). Estudio fitoquímico preliminar del rizoma de *Smilax* sp. y su evaluación de la actividad reguladora del sistema de censado de quórum de *Chromobacterium violaceum*. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F.
- Gonzalez-Mañán D., Tapia G., Gormaz J.G., D'Espessailles A., Espinosa A., Masson L., Varela P., Valenzuela A. and Valenzuela R. (2012). Bioconversion of alpha-linolenic acid to n-3 LCPUFA and expression of PPAR-alpha, acyl Coenzyme A oxidase 1 and carnitine acyl transferase I are incremented after feeding rats with alpha-linolenic acid-rich oils. *Food Funct.*, 3(7): 765-772.
- Gospodarek E., Bogiel T. and Zalas-Wiecek P. (2009). Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors. *Pol. J. Microbiol.*, 58: 191-198.
- Gotoh N., Iwasawa A., Watanabe H., Osato R. and Wada S. (2007). Oxidation of fats and oils in instant noodles stored under various conditions. *J. Food Lipids*, 14: 350–365.
- Haug B.E., Stensen W., Kalaaji M., Rekdal Ø. and Svendsen J.S. (2008). Synthetic antimicrobial peptidomimetics with therapeutic potential. *J. Med. Chem.*, 51: 4306-4314.

- Harter A.V., Gardner K.A., Falush D., Lentz D.L., Bye R. A. and Rieseberg L. H. (2004). Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature*, 430: 201-205.
- Hanson, J.R. (2003). The classes of natural product and their isolation; In Natural products: The secondary metabolites. *Roy. Soc. Ch.*, Cambridge UK; pp. 1-34.
- Howe T.R. and Iglewski B.H. (1984). Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect. Immun.*, 43(3): 1058-1063.
- Huey R., Morris G.M., Olson A.J. and Goodsell D.S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comp. Chem.*, 28(6): 1145-1152.
- Ixtaina V. Y., Martínez M. L., Sportono V., Mateo C. M., Maestri D. M., Diehl B. W. K., Nolasco S. M. and Tomas M. C. 2011. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J. Food Comp. Anal.*, 24(2): 166-174.
- Jacobsen S.E., Iteno K. y Mujica A. (2002). Amaranto como un cultivo nuevo en el norte de Europa. *Agronomía Tropical*, 52(1): 109-119.
- Jakobsen T.H., van Gennip M., Phipps R.K., Shanmugham M.S., Christensen L.D., Alhede M., Skindersoe M.E., Rasmussen T.B., Friedrich K., Uthe F., Jensen P.Ø., Moser C., Nielsen K.F., Eberl L., Larsen T.O., Tanner D., Høiby N., Bjarnsholt T. and Givskov M. (2012). Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob. Agents Ch.*, 56(5): 2314-2325.
- Jakobsen T.H., Bragason S.K., Phipps R.K., Christensen L.D., van Gennip M., Alhede M., Skindersoe M., Larsen T.O., Høiby N., Bjarnsholt T. and Givskov M. (2012). Food as a source for quorum sensing inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microb.*, 78(7): 2410-2421.
- Jeong S.K., Park H.J., Park B.D. y Kim I.H. (2010). Effectiveness of topical chia seed oil on pruritus of end-stage renal disease (ESRD) patients and healthy volunteers. *Ann. Dermatol.*, 22(2): 143-148.

- Jiménez P.P., Masson S.L., Quitral R.V. (2013). Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Rev. Chil. Nutr.*, 40(2): 155-160.
- Jin F., Nieman D. C., Sha W., Xie G., Qiu Y and Jia W. (2012). Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Food Hum. Nutr.*, 67(2): 105-110.
- Junker R., Kratz M., Neufeld M., Erren M., Nofer J.R., Schulte H., Nowak-Göttl U., Assmann G. and Wahrburg U. (2001). Effects of diets containing olive oil, sunflower oil, or rapeseed oil on the hemostatic system. *J. Thromb. Haemost.*, 85(2): 280-286.
- Kalia V.C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol. Adv.*, 31(2): 224-245.
- Kalia V.C., Wood T.K. and Kumar P. (2014). Evolution of resistance to quorum-sensing inhibitors. *Microb Ecol.*, 68(1): 13-23.
- Kapadia G.J., Azuine M.A., Tokuda H., Takasaki M., Mukainaka T., Konoshima T. and Nishino H. (2002). Chemopreventive effect of resveratrol, sesamol, sesame oil and sunflower oil in the epstein–barr virus early antigen activation assay and the mouse skin two-stage carcinogenesis. *Pharmacol. Res.*, 45(6): 499-505.
- Karthik R., Pancharatnam P. and Balaji V. (2012). Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia in a South Indian adult. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 6(10): 751-755.
- Kauffman, C.S. and Weber L.E. (1990). Grain amaranth. p. 127-139. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR.
- Ke L., An K.P, Heng S., Riley M., Sona S., Moore C.E., Parry C.M., Stoesser N. and Chanpheaktra N. (2012). Paediatric *Chromobacterium violaceum* in Cambodia: the first documented case. *Trop. Doct.*, 42(3): 178-179.
- Koh C.L., Sam C.K., Yin W.F., Tan L.Y., Krishnan T., Chong Y.M. and Chan K.G. (2013). Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors*, 13(5): 6217-6228.
- Koh K.H. and Tham F.Y. (2011). Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *J. Microbiol. Immunol.*, 44(2): 144-148.

- Krishnan T., Yin W.F. and Chan K.G. (2012). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by ayurveda spice clove (*Syzygium Aromaticum*) bud extract. *Sensors*, 12(4): 4016-4030.
- Kwan J.C., Meickle T., Ladwa D., Teplitski M., Paul V. and Luesch H. (2011). Lyngbyoic acid, a “tagged” fatty acid from a marine cyanobacterium, disrupts quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biosyst.*, 7(4): 1205-1216.
- LaSarre B. and Federle M.J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77(1): 73-111.
- Leprán I. and Szekeres L. (1992). Effect of dietary sunflower seed oil on the severity of reperfusion-induced arrhythmias in anesthetized rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 19(1): 40-4.
- Lesic B., Lepine E., Deziel J., Zhang Q., Zhang K., Padfield M., Castonguay S., Milot S., Stachel A., Tzika R., Tompkins G. and Rahme L. (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLOS Pathog.*, 3: 1229-1239.
- Lin C.H., Fang Y.P., Al-Suwayeh S.A., Yang S.Y. and Fang J.Y. 2013. Percutaneous absorption and antibacterial activities of lipid nanocarriers loaded with dual drugs for acne treatment. *Biol. Pharm. Bull.*, 36(2): 276-286.
- López-Pérez G. and Torres-Altamirano M. (2006). Indications for sunflower oil concentrate in the treatment of atopic dermatitis. *Rev. Alergia Mex.*, 53(6): 217-225.
- López V.R., Razzeto G.S., Giménez M.S. and Escudero N.L. (2011). Antioxidant properties of *Amaranthus hypochondriacus* seeds and their effect on the liver of alcohol-treated rats. *Plant Food Hum. Nutr.*, 66 (2): 157-162.
- Masoero G., Sala G., Meineri G., Cornale P., Tassone S. and Peiretti P.G. (2008). NIR spectroscopy and electronic nose evaluation on live rabbits and on the meat of rabbits fed increasing levels of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *J. Anim. Vet. Adv.*, 7(11): 1394-1399.
- Ma S.K., Chuang S.K., Cheung T.L., Kam K.M. and Tsang H.F. (2006). A fatal case of *Chromobacterium violaceum* septicaemia in Hong Kong. *SE. Asian J. Trop. Med.*, 37(6): 1179-1182.

- Manefield M., de Nys R., Kumar N., Read R., Givskov M., Steinberg P. and Kjelleberg S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, 145(2): 283-291.
- Marques S.R., Peixoto C.A., Messias J.B., Ribeiro de Albuquerque A. and Silva Junior V.A. (2004). The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta cirurgica Brasil.*, 19(3): 196-209.
- Martinelli D., Grossmann G., Séquin U., Brandl H. and Bachofen R. (2004). Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiol.*, 4: 25.
- Martirosyan D.M., Miroshnichenko L.A., Kulakova S.N., Pogojeva A.V. and Zolodov V.I. (2007). Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis.*, 6: 1-12.
- McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Camara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S. and Williams I.P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of n-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 4(12): 3703-3711.
- McLean R.J., Pierson L.S. and Fuqua C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J. Microbiol. Meth.*, 58(3): 351-360.
- Meng X.Y., Zhang H.Z., Mezei M. and Cui M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput-Aid. Drug*, 7(2): 146-157.
- Midani S. and Rathore M. (1998). *Chromobacterium violaceum* infection. *South. Med. J.*, 91(5): 464-466.
- Miki T., Iguchi M., Akiba K., Hosono M., Sobue T., Danbara H. and Okada N. (2010) *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. *Mol. Microbiol.*, 77(4): 855-872.

- Mohd A.N., Keong Y.S., Yong H.W., Kee B.B., Wei T.S. and Guan T.S. (2012). The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, Article ID 171956, 9 pages.
- Montúfar A. (2007). Las chías sagradas del templo mayor de Tenochtitlan. *Arqueología Mexicana*. Disponible en: <http://www.arqueomex.com/s2n3nchias84.html> (acceso: 21-07-15)
- Morales Guerrero, J. C., Vázquez Mata, N., & Bressani Castignoli, R. (2009). El Amaranto, Características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricional. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. México, D.F. 269 p.
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S. and Olson A.J. (2009). Autodock4 and AutoDockTools 4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 30(16): 2785-2791.
- Myers R.L. (1996). Amaranth: New crop opportunity. p. 207-220. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Muñoz-Cazares N. (2013). Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad inhibidora del sistema de censado de quórum bacteriano, de las cortezas de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl y *Ceiba* spp. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. México.
- Muyonga J. H., Nabakabya D., Nakimbugwe D. N. and Masinde D. (2008). Efforts to promote amaranth production and consumption in Uganda to fight malnutrition. Chapter 8 from *Using Food Science and Technology to Improve Nutrition and Promote National Development*, Robertson, G.L. and Lupien, J.R. (Eds), International Union of Food Science & Technology.
- National Research Council. (1984). Amaranth. Modern prospects for an ancient crop. National Academy Press. Washington, D.C. pp. 81.
- Nazzaro F., Fratianni F. and Coppola, R. (2013). Quorum Sensing and Phytochemicals. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(6): 12607-12619.
- Oca-Mejía M., Castillo-Juárez I., Martínez-Vázquez M., Soto-Hernández M. and García-Contreras R. (2015). Influence of quorum sensing in multiple phenotypes of the bacterial pathogen *Chromobacterium violaceum*. *Pathog. Dis.*, 73(2): 1-4.

- Olivero V.J., Pájaro C. N. and Stashenko E. (2011). Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus *Piper*. *Vitae*, 18(1): 77-82.
- O'Neill J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Disponible en: <http://amr-review.org/> (acceso: 27-07-15).
- Padilla-Zúñiga A.J. y Rojo-Domínguez A. (2002). Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos. Mensaje Bioquímico, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq02v26p12_9_Rojo.pdf (acceso: 30-07-15).
- Paniego N., Heinz R., Fernandez P., Talia P., Nishinakamasu V. and Esteban Hopp E. (2007). Sunflower. In Genome mapping and molecular breeding in plants. Oilseeds. Kole C. (Editor) Volumen 2. Edit. Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. 301 p.
- Papaioannou E., Utari P.D. and Quax W.J. (2013). Choosing an Appropriate Infection Model to Study Quorum Sensing Inhibition in *Pseudomonas* Infections. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(9): 19309-19340.
- Pérez L.J., Ng W.L, Marano P., Brook K., Bassler B.L. and Semmelhack M.F. (2012). Role of the CAI-1 fatty acid tail in the *Vibrio cholerae* quorum sensing response. *J. Med. Chem.*, 55(22): 9669–9681.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C. and Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13): 160521612.
- Qureshi A.A., Lehmann J.W. and Peterson D.M. (1996). Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-week-old female chickens. *J. Nutr.*, 126(8): 1972-1978.
- Ramadan H.M., Rohn S., Farouk O.H., Matthäus B. and Adam M.A. (2012). Oilseeds Crops: Agronomy, Science, and Technology. *Int. J. Agron.*, vol. 2012, ID 278534, 2 pages.

- Rasmussen T. and Givskov M. (2006). Quorum Sensing Inhibitors: a Bargain of Effects. *Microbiology*, 152(4): 895-904.
- Rasmussen T.B., Manefield M., Andersen J.B., Eberl L., Anthoni U., Christophersen C., Steinberg P., Kjelleberg S. and Givskov M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*, 146(12): 3237-3244.
- Rasmussen T.B., Bjarnsholt T., Skindersoe M.E., Hentzer M., Kristoffersen P., Kôte M., Nielsen J., Eberl L. and Givskov M. (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol.*, 187(5): 1799-1814.
- Rastogi A. and Shukla S. (2013). Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values. *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.*, 53(2): 109-125.
- Reynolds J. (2013). Serial Dilution Protocols. ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology. Disponible en: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2884-serial-dilution-protocols> (acceso: 17-07-15)
- Rice S.A., McDougald D., Givskov M. and Kjelleberg S. (2008). Detection and inhibition of bacterial cell-cell communication. *Methods Mol. Biol.*, 431: 55-68.
- Richard C. (1993). *Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 86(3): 169-173.
- Ryan R.P. and Dow J.M. (2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends Microbiol.*, 19(3): 145-152.
- Rudrappa T and Bais H.P. (2008). Curcumin, a Known Phenolic from *Curcuma longa*, Attenuates the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in Whole Plant and Animal Pathogenicity Models. *J. Agr. Food Chem.* 56(6): 1955-1962.
- Salazar-Vega M.I., Rosado-Rubio J.G., Chel-Guerrero L.A., Betancur-Ancona D.A. y Castellanos-Ruelas A.F. (2009). Composición en ácido graso alfa linoléico (w3) en huevo y carne de aves empleando chía (*Salvia hispanica* L.) en el alimento. *Interciencia*, 34(3): 209-213.
- Sánchez M.A. (1980). Potencialidades agroindustriales del Amaranto. México, Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. 283 p

- Sauer J.D. (1950). The Grain Amaranths: A Survey of Their History and Classification. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 37(4): 561-632.
- Sanner MF. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *J Mol. Graph. Model.*, 17(1): 57-61.
- Schlotz N., Pester M., Freese H.M. and Martin-Creuzburg D. (2014). A dietary polyunsaturated fatty acid improves consumer performance during challenge with an opportunistic bacterial pathogen. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 90(2): 467-477.
- Segal B.H., Ding L. and Holland S.M. (2003). Phagocyte NADPH oxidase, but not inducible nitric oxide synthase, is essential for early control of *Burkholderia cepacia* and *Chromobacterium violaceum* infection in mice. *Infect. Immun.*, 71(1): 205-210.
- Segura-Campos M.R., Salazar-Vega I.M., Chel-Guerrero L.A., and Betancur D.A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *Food Sci. Tech.*, 50(2): 723-731.
- SIAP. (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera http://raw.siap.gob.mx/raw/reporte/agricola_cierre.php (acceso: 15-07-15).
- Singh V.K., Kavita K., Prabhakaran R. and Jha B. (2013). Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling*, 29(7): 855-867.
- Shiner E.K., Rumbaugh K.P. and Williams S.C. (2005). Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(5): 935-947.
- Silva L.P, Graziella A. Joanitti G. A., Jose Roberto S. A. Leite and Ricardo B. Azevedo. (2011). Comparative Study of the Antimicrobial Activities and Mammalian Cytotoxicity of 10 Fatty Acid-Rich Oils and Fats from Animal and Vegetable. *Nat. Prod. J.*, 1(1): 40-46.
- Silva-Sánchez C., Barba de la Rosa A.P., León-Galván M.F., de Lumen B.O., de León-Rodríguez A. and González de Mejía E. (2008). Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. *J. Agr. Food Chem.*, 56(4): 1233–1240.

- Singh V.K., Kavita K., Prabhakaran R. y Jha B. (2013). Cis-9-octadecenoic acid from the rhizospheric bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 shows quorum quenching and anti-biofilm activities. *Biofouling*, 29(7): 855-867.
- Smith B. D. (2014). The domestication of *Helianthus annuus* L. (sunflower). *Veg. Hist Archaeobot.*, 23(1): 57-74.
- Smith R.S. e Iglewski B.H. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J. Clin. Invest.*, 112(10):1 460-1465.
- Smith B.D. (2006). Eastern North America as an independent center of plant domestication. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(33):12223-12228.
- Soni K.A., Jesudhasan P., Cepeda M., Widmer K., Jayaprakasha G.K., Patil B.S., Hume M.E. and Pillai S.D. (2008). Identification of ground beef-derived fatty acid inhibitors of autoinducer-2-based cell signaling. *J. Food Prot.*, 71(1): 134-138.
- Srinivas N., Jetter P., Ueberbacher B.J., Werneburg M., Zerbe K., Steinmann J., Van der Meijden B., Bernardini F., Lederer A., Dias R.L., Misson P.E., Henze H., Zumbrunn J., Gombert F.O., Obrecht D., Hunziker P., Schauer S., Ziegler U., Käch A., Eberl L., Riedel K., DeMarco S.J. and Robinson J.A. (2010). Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 327(5968): 1010–1013.
- Schauder S. and Bassler B.L. (2001). The languages of bacteria. *Gene. Dev.*, 15(12): 1468-1480.
- Sun C.Q., O'Connor C.J. and Robertson A.M. (2003). Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 36(1-2): 9-17.
- Taha F.S., Wagdy S.M., Hassanein M.M and Hamed S.F. (2012). Evaluation of the biological activity of sunflower hull extracts. *Grasas y aceites*, 63 (2): 184-192.
- Teplitski M., Robinson J.B. and Bauer W.D. (2000). Plants Secrete Substances That Mimic Bacterial N-Acyl Homoserine Lactone Signal Activities and Affect Population Density-Dependent Behaviors in Associated Bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13(6): 637-648.
- Tillotson G.S. and Theriault N. (2013). New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance. *F1000 Prime Rep.*, 5: 51.

- Thompson M. A. (2010) Planaria Software LLC, Seattle, WA. Disponible en: <http://www.arguslab.com>.
- Tropicos.org. (2015). Missouri Botanical Garden. Disponible en: <http://www.tropicos.org> (acceso: 09-07-15)
- Twomey K.B., O'Connell O.J., McCarthy Y., Dow J.M., O'Toole G.A., Barry J Plant B.J. and Ryan R.P. (2012). Bacterial cis-2-unsaturated fatty acids found in the cystic fibrosis airway modulate virulence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J.*, 6(5): 939-950.
- Ukiya M., Akihisa T., Yasukawa K., Koike K., Takahashi A., Suzuki T. and Kimura Y. (2007). Triterpene glycosides from the flower petals of sunflower (*Helianthus annuus*) and their anti-inflammatory activity. *J. Nat. Prod.*, 70(5): 813-816.
- Ulbricht C., Chao W., Nummy K., Rusie E., Tanguay-Colucci S., Iannuzzi C.M., Plammoottil J.B., Varghese M. and Weissner W. (2009). Chia (*Salvia hispanica*): a systematic review by the natural standard research collaboration. *Rev. Recent Clin. Trials*, 4(3): 168-174.
- USDA. (2015a). Oilseeds: World Markets and Trade. Disponible en: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> (acceso: 15-07-15)
- USDA. (2015b). World Agricultural Production. Disponible en: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (acceso: 15-07-15)
- USDA. (2015c). USDA Economic Research Service-Sunflowerseed. Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/sunflowerseed.aspx> (acceso: 15-07-15).
- USDA. (2015d). National Nutrient data base. Disponible en: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods> (acceso: 16-07-15)
- Vandeputte O.M., Kiendrebeogo M., Rajaonson S., Diallo B., Mol A., El Jaziri M. and Baucher M. (2010). Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microb.*, 76(1): 243-253.
- Vandeputte O.M., Kiendrebeogo M., Rasamiravaka T., Stévigny C., Duez P., Rajaonson S., Diallo B., Mol A., Baucher M. and El Jaziri M. (2011). The

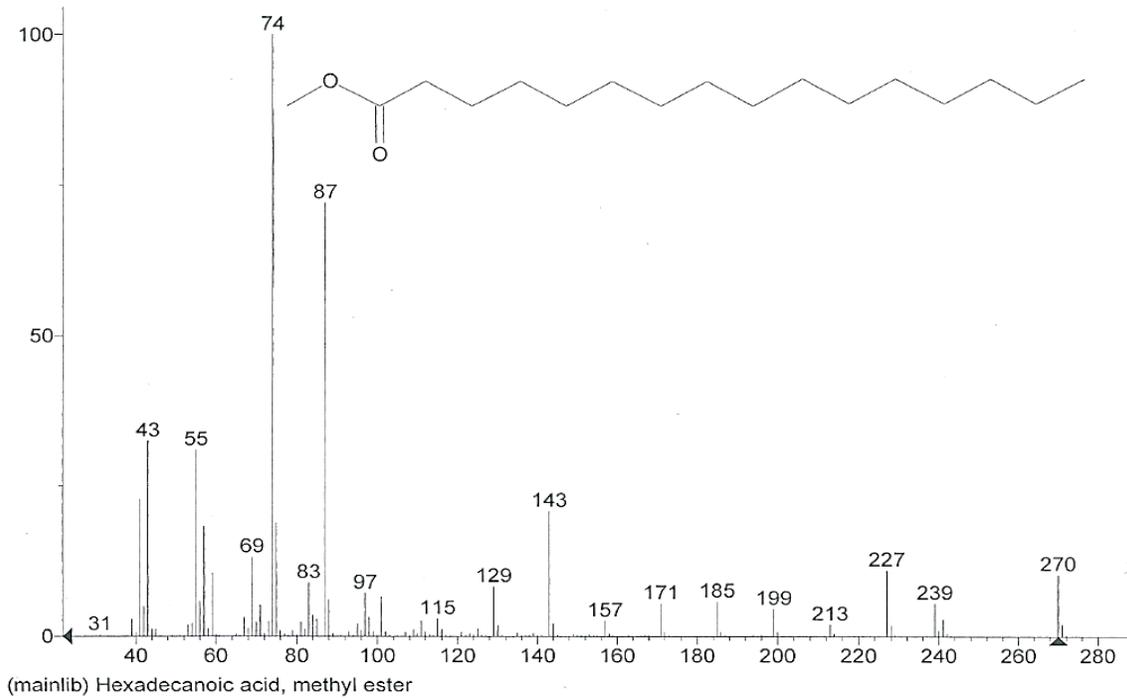
- flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 157(7): 2120-2132.
- Vedtofte M.S., Jakobsen M.U., Lauritzen L. and Heitmann B.L. (2011). Dietary α -linolenic acid, linoleic acid, and n-3 long-chain PUFA and risk of ischemic heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 94(4): 1097-1103.
- Vuksan V., Jenkins A.L., Dias A.G., Lee A.S., Jovanovski E., Rogovik A.L. and Hanna A. (2010). Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia hispanica* L.). *Eur. J. Clin. Nutr.*, 64(4): 436-438.
- Widmer K., Soni K., Hume M., Beier R., Jesudhasan P. and Pillai S. (2007). Identification of Poultry Meat-Derived Fatty Acids Functioning as Quorum Sensing Signal Inhibitors to Autoinducer-2 (AI-2). *J. Food Sci.*, 72(9): M363-368.
- Walker T.S., Bais H.P., Déziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R. and Vivanco J.M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol.*, 134(1): 320-331.
- WHO. (2001). WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Disponible en: http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf (acceso: 28-07-15).
- WHO. (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/163473/1/WHO_HSE_PED_AIP_2015.1_eng.pdf?ua=1 (acceso: 27-07-15)
- Yang D., Pornpattananangkul D., Nakatsuji T., Chan M., Carson D., Huang C.M. and Zhang L. (2009). The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. *Biomaterials*, 30(30): 6035-6040.
- Zahin M., Hasan S., Aqil F., Khan M.S., Husain F.M. and Ahmad I. (2010). Screening of certain medicinal plants from India for their anti-quorum sensing activity. *Indian J. Exp. Biol.*, 48(12): 1219-1224.

- Zhao S. (2012). Analysis of fatty acid methyl esters by Agilent 5975T LTM GCMS. Application note. Agilent technologies (Shanghai) Co., Ltd. Disponible en: <http://hpst.cz/sites/default/files/attachments/5991-1437en-analysis-fatty-acid-methyl-esters-agilent-5975t-ltm-gc-ms.pdf> (acceso: 18-06-15)
- Zhu H., Liu W., Tian B., Liu H. y Ning S. (2011). Inhibition of quorum sensing in the opportunistic pathogenic bacterium *Chromobacterium violaceum* by an extract from fruiting bodies of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, 13(6): 559-564.

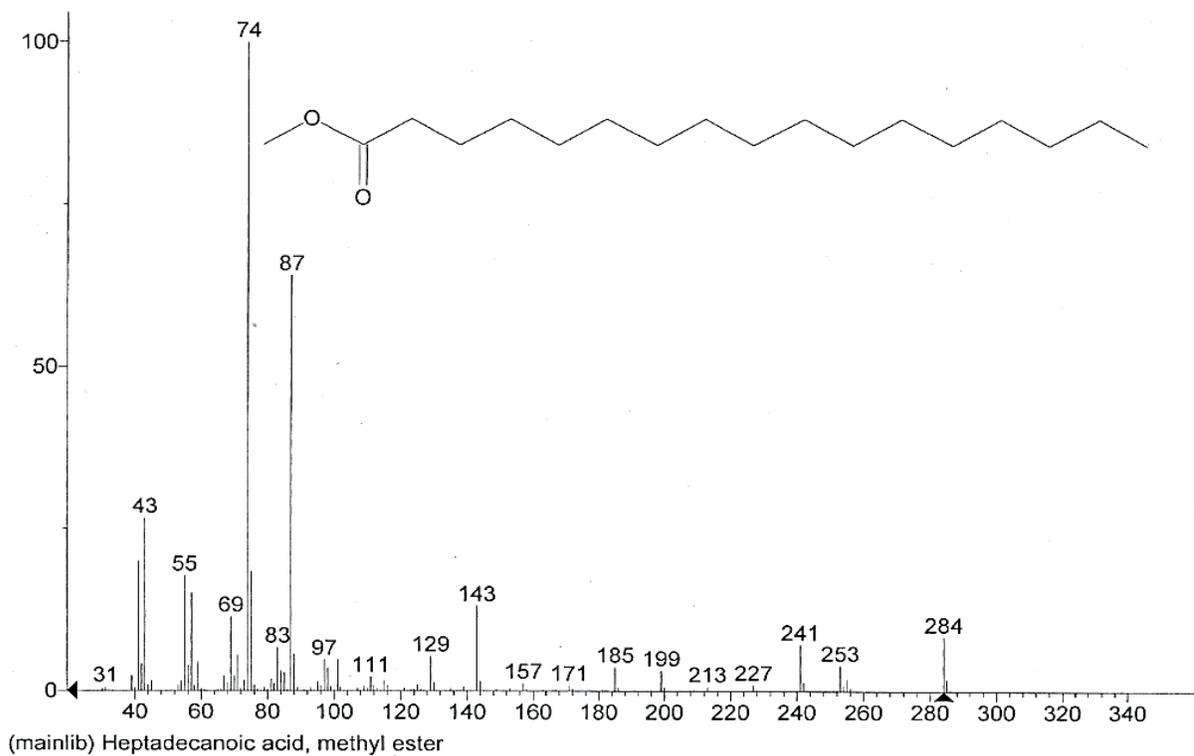
8. ANEXOS

Espectros de masas.

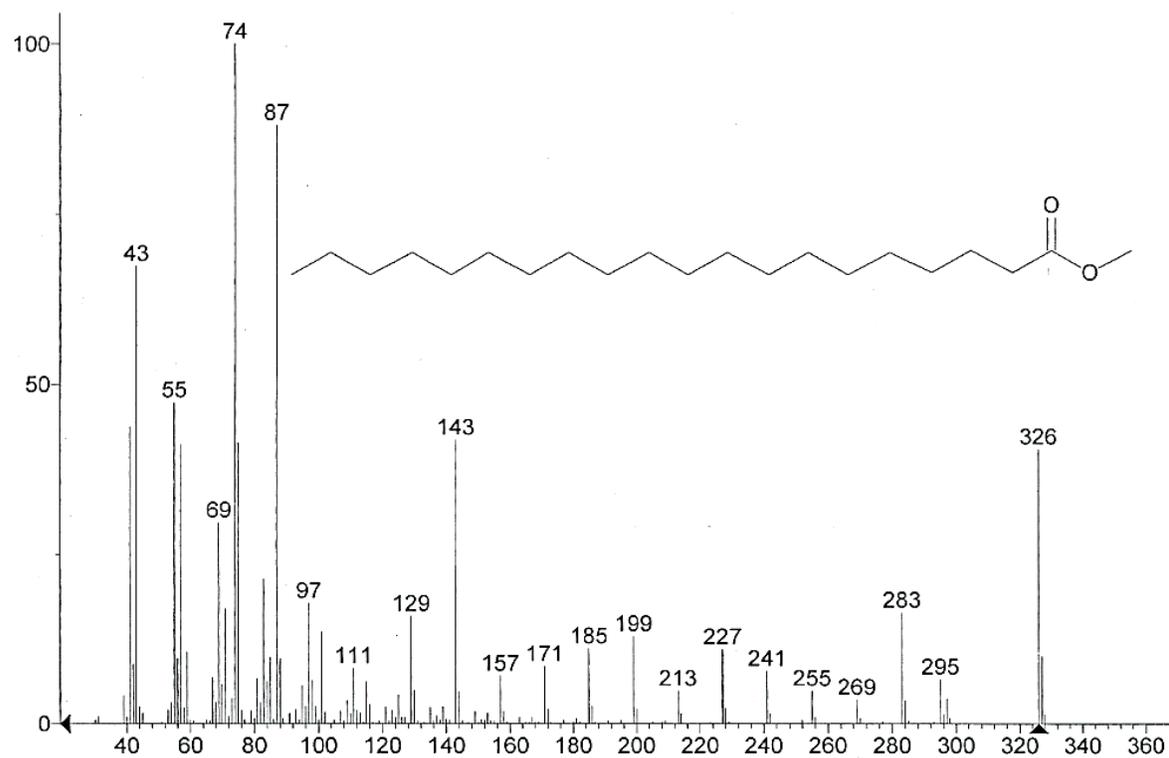
Ácido palmítico:



Ácido margárico:

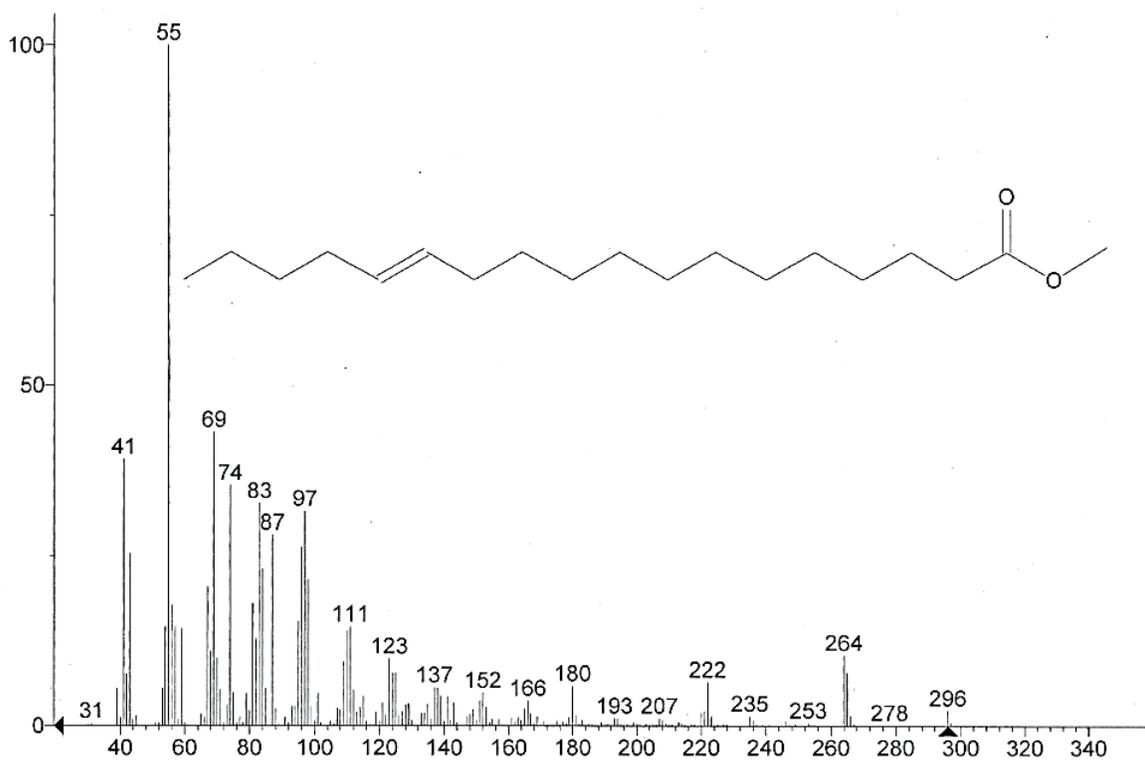


Ácido araquídico:



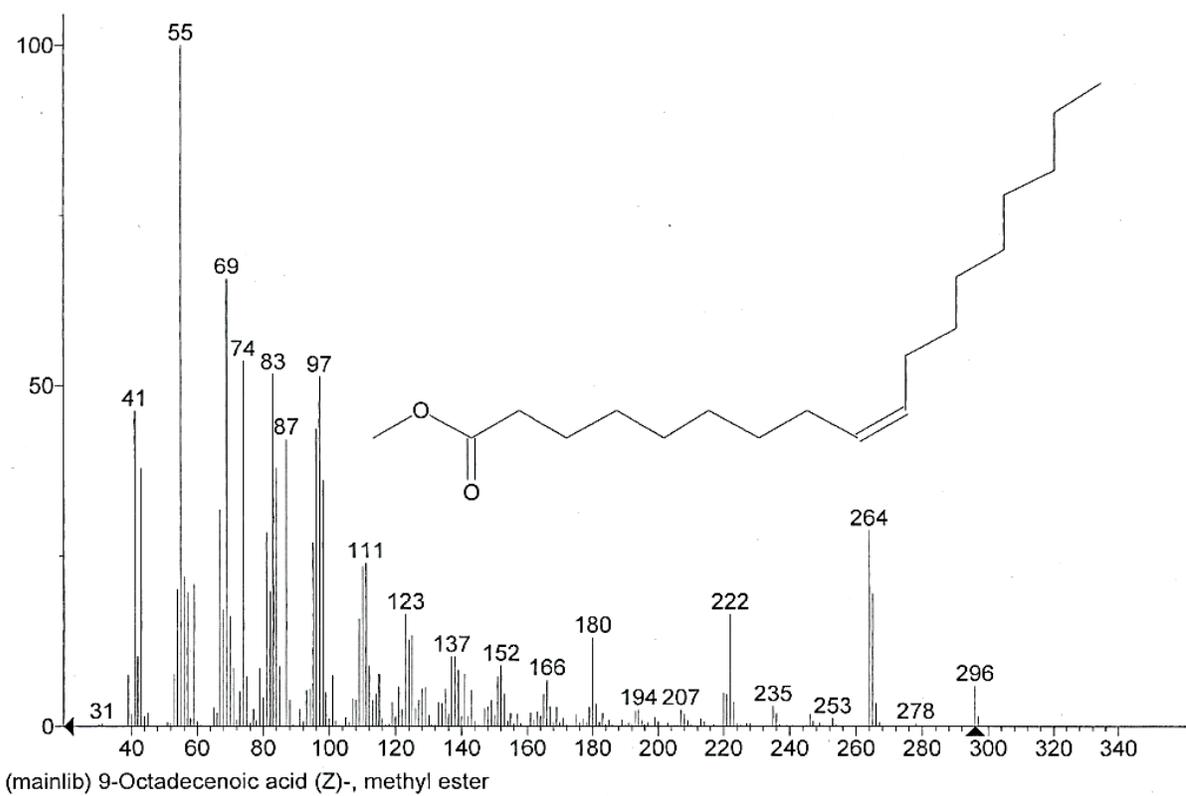
(mainlib) Eicosanoic acid, methyl ester

Ácido *Trans*-13 octadecenoico:

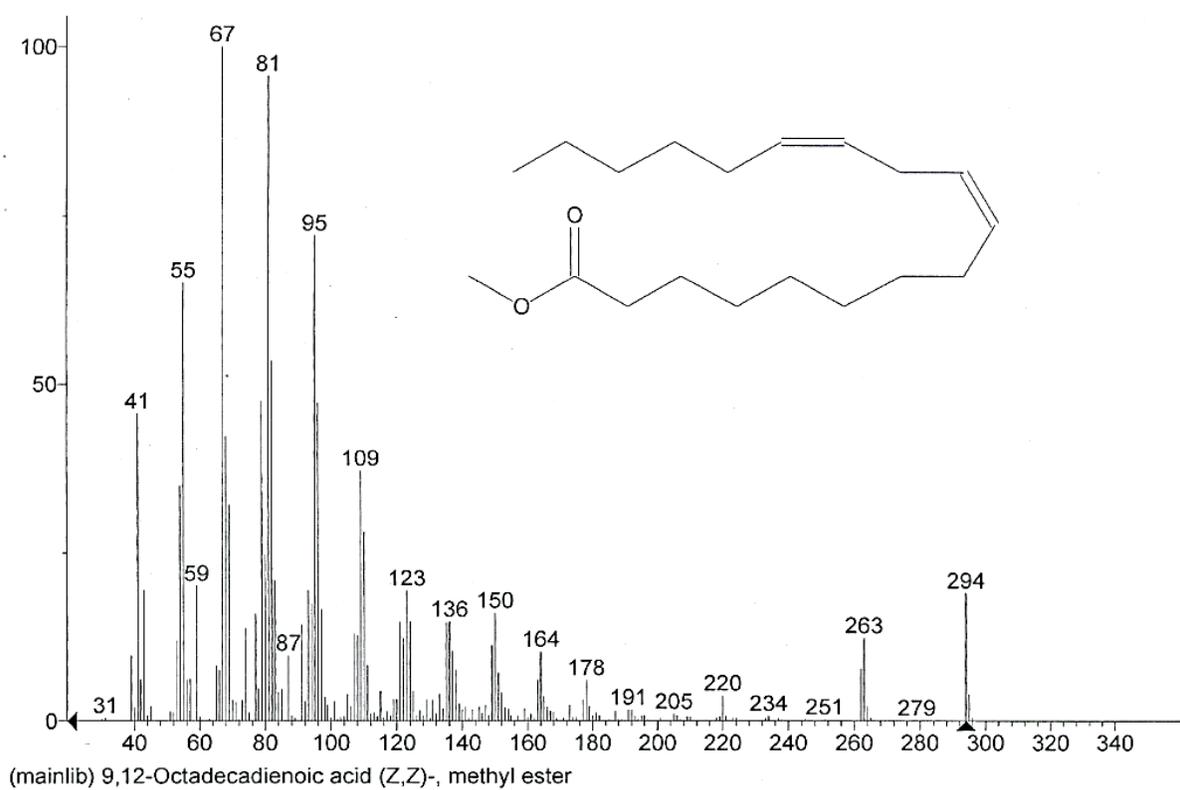


(mainlib) *trans*-13-Octadecenoic acid, methyl ester

Ácido oleico:



Ácido linoleico:



9. PRODUCCIÓN.



<input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál: <input type="checkbox"/> Modelo Industrial <input type="checkbox"/> Dibujo Industrial	Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI. Sello Folio de entrada Fecha y hora de recepción	INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisinal de Patentes Solicitud Expediente: MX/a/2015/007607 Fecha: 15/JUN/2015 Hora: 11:58:24 Folio: MX/E/2015/042763 791823
---	---	--

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): Colegio de Postgraduados	
2) Nacionalidad (es): Mexicana	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: km. 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Montecillo 56230	
Población, Estado y País: Texcoco, Estado de México, México.	
4) Teléfono (clave): 5804-59-00 ext. 1008 5) Fax (clave):	

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): Israel Castillo Juárez ¹ , Macrina Pérez López ² , Marcos Soto Hernández ³ , Rodolfo García Contreras ⁴ , Mariano Martínez Vázquez ⁵	
7) Nacionalidad (es): Mexicana ^{1,2,3,4,5}	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: km. 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Montecillo, 56230	
Población, Estado y País: Texcoco, Estado de México, México.	
9) Teléfono (clave): 5804-59-00 ext. 1008 10) Fax (clave):	

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): Lic. Filiberto Gastélum Serna	12) RGP:
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: km. 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Montecillo 56230	
Población, Estado y País: Texcoco, Estado de México, México 14) Teléfono (clave): 5804 59 00 Ext.1008 15) Fax (clave):	
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: Elva Mariana Pérez Reyes y Mercedes González Cabrera	

17) Denominación o Título de la Invención:
USO DE SUBSTANCIAS RICAS EN LÍPIDOS DERIVADAS DE SEMILLAS OLEAGINOSAS Y ÁCIDOS GRASOS LIBRES PARA CONTRARRESTAR INFECCIONES BACTERIANAS

18) Fecha de divulgación previa Día Mes Año	19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI
20) Divisinal de la solicitud	21) Fecha de presentación Día Mes Año
22) Prioridad Reclamada: País Número Figura jurídica Fecha de presentación No. de serie Día Mes Año	

Lista de verificación (uso interno)			
No. Hojas	Descripción	No. Hojas	Descripción
	Comprobante de pago de la tarifa		Documento de cesión de derechos
	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
			TOTAL DE HOJAS

Observaciones:

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos presentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. Filiberto Gastélum Serna Texcoco Estado de México, a 11 de Junio del 2015
 Nombre y firma del solicitante y su apoderado Lugar y fecha

39º Congreso Nacional de
Microbiología
Querétaro 2015



Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Macrina Pérez López

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Efecto regulador de los ácidos grasos de semillas (*Amaranthus hypochondriacus* L.,
Salvia hispanica L. y *Helianthus annuus* L.) en el sistema de censado quórum de
*Chromobacterium violaceum***

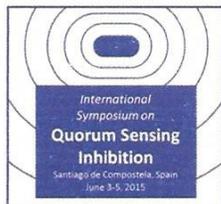
Por:

Pérez-López M, Soto-Hernández M., García-Contreras R., Martínez-Vázquez M.,
San Miguel-Chávez R., Castillo-Juárez I

En la modalidad de cartel durante el 39º Congreso Nacional del 22 al 26 de marzo de 2015 en la Ciudad de Querétaro.

Por el Comité Organizador

Dra. María Teresa Estrada García
Presidente AMM



I INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON QUORUM SENSING INHIBITION (ISQSI)

Santiago de Compostela (Spain), 3-5 June 2015

CERTIFICATE OF PRESENTATION

The contribution entitled

*“Regulatory effect of fatty acids from seeds (*Amaranthus hypochondriacus* L., *Salvia hispanica* L. and *Helianthus annuus* L.) in the quorum sensing system of *Chromobacterium violaceum*”*

authored by

M. Pérez-López, M. Soto-Hernández, R. García-Contreras, M. Martínez-Vázquez, R. San Miguel-Chávez, I. Castillo-Juárez

has been presented as a poster communication in the
I International Symposium on Quorum Sensing Inhibition (ISQSI)
Santiago de Compostela

3-5 June

Symposium Chair

Ana Otero Casal



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

CUARTO CONGRESO RAMA BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE BACTERIAS
04 DE OCTUBRE DE 2015. ATLIXCO METEPEC, PUEBLA.

COMITÉ ORGANIZADOR:
SUSANA BROM KLANNER (CTCI, UNAM)
RODRIGUEZ CASTAÑEDA LUCIO (CTCIAP, UNAM)
GABRIEL GUARNEROS PEÑA (CTCIUNIVIC, UNAM)
JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA (DIT, UNAM)
LUIS ROBERTO GONZÁLEZ JIM (UNAM)

México, D. F., a 18 de agosto de 2015

Israel Castillo Juárez
SAGARPA
Colegio de Postgraduados
Texcoco, México
Presente

Estimado (a) Congresista:

Se le informa que su trabajo:

**Protective effect of seeds oils in the infection of *Chromobacterium violaceum*:
antibiotic and anti-quorum activity**

Por:

Castillo Juárez Israel, Pérez-López Macrina., García-Contreras Rodolfo.,
Rodríguez-Zavala José Salud., Martínez-Vázquez Mariano., San Miguel-Chávez Ruben.,
Soto-Hernández Marcos

ha sido aceptado para su presentación durante la IV Congreso de la Rama de Bioquímica
y Biología Molecular de Bacterias del 04 al 08 de octubre de 2015 en Atlixco Metepec,
Puebla.

Atentamente
Por El Comité Organizador

Dra. Susana Brom Klanner

Dr. José Luis Puente García

Dr. Gabriel Guarneros Peña