

Aplicación de metabolómica en el estudio del efecto del aceite esencial *Lippia origanoides*
sobre *Staphylococcus aureus* en estado planctónico

Zaireth Lizeth García Rodríguez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Codirector

Marlon Yesid Cáceres Ortiz

Doctor en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A la paciencia y el amor que seguir en esta vida requiere, a mis hermanos Eric y Kaleth por el simple hecho de existir a mi lado.

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a todas las personas y entidades que, de una u otra forma, contribuyeron al desarrollo y culminación de esta tesis.

Agradezco profundamente al Dr. William Hidalgo por su paciencia, sabiduría, dedicación y orientación a lo largo de este proyecto. Sus comentarios y consejos fueron fundamentales. Al Dr. Marlon Cáceres por su gran ayuda en el proceso experimental.

A mis hermanos, por estar ahí para mí en los momentos más desafiantes, y por supuesto a mi papá, porque muy a su manera siempre estuvo dispuesto a ayudarme en todo este proceso.

Agradezco a mi alma mater, Universidad Industrial de Santander, por proporcionarme los recursos y el entorno adecuado para llevar mi proceso de aprendizaje a lo largo de la carrera, por las amistades y el crecimiento personal que me deja. Gracias a la escuela de Química, al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), al programa Bio Reto XXI, por el apoyo económico y académico para culminar mis estudios.

Tabla de contenido

Introducción.....	13
1. Objetivos.....	16
1.1. Objetivo General.....	16
1.2. Objetivos Específicos	16
2. Marco Teórico	17
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.2. <i>S. aureus</i> en salud pública	18
2.3. Mecanismos de supervivencia bacteriano	21
2.4. Aceites esenciales	25
2.5. Aceites esenciales como agentes antimicrobianos	26
2.6. La metabolómica: una alternativa para estudiar mecanismos de acción	29
3. Antecedentes.....	34
4. Materiales y métodos.....	38
4.1. Materiales	38
4.1.1. Cepa bacteriana y medios de cultivo	38
4.1.2. Aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i>	38
4.2. Métodos	38
4.2.1. Caracterización química del AE de <i>L. origanoides</i>	38
4.2.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial	40
4.2.3. Cultivo bacteriano de <i>S. aureus</i>	40
4.2.4. Extracción de metabolitos de células planctónicas.....	41

<i>L. ORIGANOIDES</i> SOBRE PLANCTÓNICA DE <i>S. AUREUS</i>	5
4.2.5. Análisis metabolómico de los extractos mediante UHPLC/MS.....	42
4.2.6. Procesamiento de datos	43
4.2.7. Análisis estadístico	45
5. Resultados.....	46
5.1. Determinación de la actividad antimicrobiana	46
5.2. Análisis de los perfiles químicos mediante aproximación de metabolómica no dirigida	46
5.3. Identificación presuntiva de los metabolitos de interés.....	51
5.4. Analisis de las vias metabólicas afectadas por el efecto del AE <i>L. origanoides</i> sobre <i>S.aureus</i> en estado placntónico.....	56
6. Discusión	58
7. Conclusiones.....	64
8. Recomendaciones	65
Referencias Bibliográficas.....	66
Apéndices	85

Lista de Tablas

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sobre microorganismos patógenos	28
Tabla 2. Niveles de certeza en la identificación de metabolitos propuestos por la sociedad de metabolómica. Adaptado de: (Gil-De-La-Fuente et al., 2019).....	32
Tabla 3. Metabolitos identificados de forma presuntiva como modulados diferencialmente en <i>S. aureus</i> durante el tratamiento con el aceite esencial <i>Lippia origanoides</i> en el modo de adquisición de iones positivos	52
Tabla 4. Metabolitos identificados presuntivamente como modulados diferencialmente en <i>S. aureus</i> durante el tratamiento con el aceite esencial <i>Lippia origanoides</i> en el modo de adquisición de iones negativos.	53
Tabla 5. Clasificación de las principales rutas metabólicas afectadas por el AE de <i>L. origanoides</i> sobre el microorganismo de estudio	56

Lista de Figuras

Figura 1. Panorama actual sobre resistencia de <i>S. aureus</i> a antibióticos como la oxacilina, vancomicina y rifampicina en diversos países durante el periodo comprendido entre 2013 y 2019	19
Figura 2. Porcentaje para la proporción de aislados identificados como <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina.....	20
Figura 3. Modelo de <i>biofilm</i> : a. Modelo de un <i>biofilm</i> bacteriano adherido a una superficie sólida, b. Los principales componentes de una matriz (polisacáridos, proteínas y ADN), c. Las clases de interacciones que dominan la estabilidad de la matriz	23
Figura 4. Análisis de componente principal (PCA) del conjunto de datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de las muestras de control (CTRL), las tratadas con el AE (TTO) y las de control de calidad (QC), A) modo de adquisición de iones positivos, B) modo de adquisición de iones negativos	47
Figura 5. Análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de las muestras control (CTRL) y tratamiento (TTO), A) modo de adquisición de iones positivos, B) modo de adquisición de iones negativos.	48
Figura 6. Gráfico de volcán para el conjunto de datos (tratamiento vs control) en, A) modo de adquisición de iones positivos, B) modo de adquisición de iones negativos	50
Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes para metabolitos identificados como modulados diferencialmente en <i>S. aureus</i> en el modo de adquisición de iones: (A) Vitamina A2, B) ácido α -linolénico, C) ácido 7,9-tetradecadiaminóico) positivo y (D) espermidina, E) putrescina, F) adenina) negativo.	54

Figura 8. Mapa de calor de los metabolitos más representativos afectados por el AE de *L. origanoides*. 55

Figura 9. Esquema general de algunas de las vías metabólicas afectadas por el AE de *L. origanoides* sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* en estado planctónico 57

Lista de Apéndices

Apéndice A. Metabolitos identificados presuntivamente hasta nivel 2, según el sistema propuesto por la sociedad de metabolómica. Comparación de los metabolitos obtenidos por UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS con los espectros reportados en la literatura.	85
Apéndice B. Estructura química y representación gráfica de los espectros de masas y patrones isotópicos utilizados para hacer la identificación presuntiva.	90
Figura S1.1. Estructura química del sn-glicero-3-fosfoetanolamina.....	90
Figura S1.2. Comparación de espectros de masas del sn-glicero-3-fosfoetanolamina, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental	90
Figura S1.3. Comparación de patrones isotópico del sn-glicero-3-fosfoetanolamina, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental	91
Figura S2.1. Estructura química del Ácido 7,9-Tetradecadiaminóico	92
Figura S2.2. Comparación de espectros de masas del Ácido 7,9-Tetradecadiaminóico, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental	92
Figura S2.3. Patrón isotópico del Ácido 7,9-Tetradecadiaminóico, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental	93
Figura S3.1. Estructura química del 3-metoxi- α -metil-L-tirosina.....	94
Figura S3.2. Comparación de espectros de masas del 3-metoxi- α -metil-L-tirosina, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental	94
Figura S3.3. Patrón isotópico 3-metoxi- α -metil-L-tirosina, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental	96
Figura S4.1. Estructura química N-acetil-L-glutamato	96

Figura S4.2. Comparación de espectros de masas del N-acetil-L-glutamato, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental.....	97
Figura S4.3. Patrón isotópico N-acetil-L-glutamato, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental.....	98
Figura S5.1. Estructura química de la 5-metilcitosina	99
Figura S5.2. Comparación de espectros de masas de la 5-metilcitosina, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental	99
Figura S5.3. Patrón isotópico 5-metilcitosina, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental.....	100
Figura S6.1. Estructura química de 9,10-DiHOME	101
Figura S6.2. Comparación de espectros de masas de 9,10-DiHOME, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental	102
Figura S6.3. Patrón isotópico 9,10-DiHOME, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental.....	103

Resumen

Título: Aplicación de metabolómica en el estudio del efecto del aceite esencial *Lippia origanoides* sobre *Staphylococcus aureus* en estado planctónico

Autor: Zaireth Lizeth García Rodríguez, William Fernando Hidalgo, Marlon Cáceres Ortiz **

Palabras Clave: Metabolómica no dirigida; bacterias patógenas; antimicrobianos de origen vegetal; mecanismo de acción; metabolitos

Descripción: Debido al uso extensivo de los antibióticos, muchos microorganismos han desarrollado resistencia antimicrobiana; entre estos, *Staphylococcus aureus* resistente a múltiples fármacos, se ha convertido en uno de los problemas de salud pública de gran relevancia en el mundo. Por lo tanto, el estudio y la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos se convierte en un tema de gran interés clínico. Entre las posibles alternativas, los aceites esenciales (AE) surgen como una opción natural prometedora a los antibióticos convencionales; sin embargo, el desconocimiento del mecanismo de acción por el cual ejercen su actividad biológica es, actualmente, un desafío que se puede abordar a través de las ciencias ómicas. Entre éstas, la metabolómica es una estrategia poderosa puesto que permite rastrear los cambios metabólicos que ocurren en un sistema biológico a causa del efecto de moléculas bioactivas de origen vegetal. Por tanto, a través de una aproximación quimiométrica basada en LC/MS, la presente investigación exploró el posible mecanismo de acción por el cual el AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol ejerce su efecto biológico sobre *S. aureus*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del AE se determinó a través del método microdilución en caldo. La extracción de metabolitos se llevó a cabo en el periodo de crecimiento de la bacteria en presencia del AE y en las muestras control con ayuda de una lisis mecánica. Las muestras fueron procesadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-HRMS) y los datos analizados a través de estadística uni- y multivariada. La identificación de los metabolitos diferenciales se llevó a cabo por comparación de los espectros de masas con los reportados en la literatura y en bases de datos como MassBank, HMDB, Metlin y Pubchem. Un enriquecimiento de vías se llevó a cabo para determinar las rutas metabólicas afectadas por el AE. Para el AE se determinó una CMI de 0,75 mg/mL sobre *S. aureus*. El análisis metabolómico permitió identificar que los metabolitos AMP, putrescina, adenina, fueron algunos de los identificados entre las muestras, sugiriendo que el AE ejerce su acción biológica a través de la inhibición o alteración de las rutas biosintéticas implicadas en el metabolismo de aminoácidos como lo es el metabolismo de la arginina y la prolina o rutas como el metabolismo del glutatión. Estos resultados nos proporcionan una aproximación de cómo posiblemente el aceite esencial afecta a *S. aureus* en estado planctónico y fomentan la investigación de posibles dianas terapéuticas para contrarrestar el desarrollo de bacterias resistentes a múltiples fármacos.

* Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor en Química. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortiz. Doctor en Ciencias Biomédicas.

Abstract

Title: Application of Metabolomics in the Study of the Effect of *Lippia origanoides* Essential Oil on *Staphylococcus aureus* in a Planktonic State

Author(s): Zaireth García Rodríguez, William Fernando Hidalgo, Marlon Cáceres Ortiz^{*1}

Key Words: Untargeted metabolomics, pathogenic bacteria, antimicrobials of plant origin, mechanism of action, metabolites

Description: Due to the extensive use of antibiotics, many microorganisms have developed antimicrobial resistance; among these, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* has become one of the most important public health problems in the world. Therefore, the study and search for new antimicrobial agents becomes a topic of great clinical interest. Among the possible alternatives, essential oils (EOs) emerge as a promising natural option to conventional antibiotics; however, the lack of knowledge of the mechanism of action by which they exert their biological activity is currently a challenge that can be addressed through omics sciences. Among these, metabolomics is a powerful strategy since it allows tracking the metabolic changes that occur in a biological system due to the effect of bioactive molecules of plant origin. Therefore, through a chemometric approach based on LC/MS, the present investigation explored the possible mechanism of action by which the EO of *Lippia origanoides* chemotype thymol exerts its biological effect on *S. aureus*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the EO was determined by the broth microdilution method. Metabolite extraction was carried out in the period of bacterial growth in the presence of EO and in the control samples with the aid of mechanical lysis. The samples were processed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-HRMS) and the data analyzed by uni- and multivariate statistics. Identification of differential metabolites was carried out by comparison of mass spectra with those reported in the literature and in databases such as MassBank, HMDB, Metlin and Pubchem. A pathway enrichment was carried out to determine the metabolic pathways affected by AE. A MIC of 0.75 mg/mL on *S. aureus* was determined for AE. Metabolomic analysis identified AMP, putrescine and adenine metabolites among the samples, suggesting that EO exerts its biological action through the inhibition or alteration of biosynthetic pathways involved in the metabolism of amino acids such as arginine and proline metabolism or pathways such as glutathione metabolism. These results provide us with an approximation of how the essential oil possibly affects *S. aureus* in the planktonic state and encourage the investigation of possible therapeutic targets to counteract the development of multidrug resistant bacteria.

* Degree Work

^{*1} Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Ph.D. in Chemistry. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortiz. Ph.D. in Biomedical Sciences.

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un desafío global y supone una amenaza a la medicina moderna debido a la falta de nuevos agentes antimicrobianos efectivos, lo que hace persistentes las enfermedades infecciosas (OMS, 2016). La aparición concomitante de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, vancomicina, penicilina y oxacilina, entre otras, hacen que este microorganismo sea considerado un patógeno prioritario, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017). Adicional, según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC), *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) es la bacteria más predominante aislada en hospitales de Europa, América, África del norte, oriente medio y lejano oriente (Sollid et al., 2014). También se ha reportado que la tasa de mortalidad causado por infecciones de *S. aureus* en el torrente sanguíneo, en países de altos ingresos, es hasta del 20-30%, y en países de bajos ingresos se encuentran tasas de hasta 50% (Loftus et al., 2022).

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo anaeróbico facultativo, es decir, que puede crecer tanto en atmósfera con o sin oxígeno, lo que le permite adaptarse a un entorno hostil (Li et al., 2022). Es uno de los patógenos humanos más importantes a nivel mundial, causante de una amplia gama de infecciones clínicas. Es una de las principales causas de bacteriemia, endocarditis y osteomielitis (Zhou et al., 2022), así como de infecciones cutáneas, pleuropulmonares y relacionadas con dispositivos (Tong et al., 2015). Debido al amplio uso de los antibióticos convencionales para el tratamiento en las distintas enfermedades, *S. aureus* resistente a múltiples fármacos se ha convertido en uno de los

problemas actuales que atraviesa el mundo (Hu et al., 2019). Entre los principales mecanismos por los que ha logrado mostrar resistencia a los antibióticos es a través de la formación de *biofilm*, el cual consiste en una matriz de conglomerados de diferentes tipos de biopolímeros que impiden la llegada de los antimicrobianos a su sitio de acción (Flemming & Wingender, 2010; Hall & Mah, 2017), adquiriendo la capacidad de poder colonizar objetos como dispositivos médicos importantes, entre los cuales se encuentran los marcapasos (Hall & Mah, 2017). Por lo tanto, el estudio y la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos se convierte en un tema de gran interés clínico. Este problema actualmente se está enfrentando desde diferentes perspectivas, en el diseño y síntesis de nuevas moléculas con actividad biológica hasta la investigación de productos naturales con este potencial.

Una de las opciones, diferente a los antibióticos convencionales, que han surgido desde los estudios con productos de origen natural son el uso de aceites esenciales y extractos vegetales. Los aceites esenciales provienen de las plantas, pueden ser destilados de las hojas, flores, corteza y frutos; constan de mezclas complejas de diversos compuestos orgánicos odoríferos y volátiles de bajo peso molecular que se producen como metabolitos secundarios (Tariq et al., 2019). Esta mezcla de metabolitos es necesaria para los mecanismos de supervivencia de las plantas y para las respuestas preventivas y curativas relacionadas con la fitopatología, lo que genera que tenga beneficios de origen medicinal como efectos antifúngicos, antibacterianos, antiviral e insecticida. Los efectos antimicrobianos que adquirieron las plantas aparecieron en respuesta de la selección natural a lo largo de los años para sobrevivir contra los ataques de agentes patógenos (Lin et al.,

2022). Los aceites esenciales son un tema de gran interés actualmente debido a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos por la alarma de la resistencia bacteriana a los tratamientos convencionales. Por ejemplo, el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* demostró que, al cabo de 8 horas de entrar en contacto con la bacteria *S. aureus*, el número total presente de esta disminuye en un 99,9% (Li et al., 2022). Sin embargo, en la actualidad los agentes antimicrobianos derivados de las plantas aún no son considerados fármacos, probablemente debido a los desafíos para obtener derechos de propiedad intelectual sobre ellos, las inquietudes sobre el control de calidad (Rempe et al., 2017) y principalmente el desconocimiento del mecanismo por el cual los aceites esenciales ejercen su actividad biológica.

Los avances en las tecnologías ómicas han permitido probar hipótesis en la detección de cambios de genotipo y fenotipo en organismos vivos; entre estas, la metabolómica ha permitido la identificación y cuantificación de metabolitos, proporcionando una herramienta para estudiar los cambios metabólicos que ocurren en un sistema biológico a causa del efecto de moléculas bioactivas de origen vegetal (Alarcon-Barrera et al., 2022). Estudios previos han demostrado la alta actividad potencial de aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas en Colombia para distintos patógenos de interés clínico, como por ejemplo, *S. aureus* (Cáceres et al., 2020; Gómez-Sequeda et al., 2020); sin embargo, para que se comience a adquirir credibilidad en el grado farmacéutico, se debe conocer el mecanismo de acción para comprender cómo se afecta el microorganismo cuando se expone al aceite esencial, motivo por el cual es necesario

explorar más a profundidad los targets biológicos que son alterados por los metabolitos del aceite esencial.

En el presente estudio, se utilizó el AE de *L. origanoides* para evaluar su efecto sobre *S. aureus*, el cual ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra esta bacteria. Por lo tanto, a través de una aproximación quimiométrica basada en un análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC/MS), se exploraron las posibles rutas metabólicas por las cuales ejerce actividad biológica los componentes del AE de *L. origanoides* quimiotipo timol sobre *S. aureus* en estado planctónico. Se espera que este tipo de investigaciones ayuden a fomentar el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que contribuyan a contrarrestar las multirresistencia bacteriana.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Estudiar el posible mecanismo antibacteriano por el cual el aceite esencial de *Lippia origanoides* ejerce su actividad biológica sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* en estado planctónico

1.2. Objetivos Específicos

- Estudiar los metabolitos afectados de *S. aureus* después del tratamiento con el aceite esencial
- Identificar el perfil metabólico de *S. aureus* en la etapa de crecimiento de la bacteria en presencia del aceite esencial y sin la presencia de este

- Establecer las rutas metabólicas afectadas y el probable mecanismo de acción del aceite esencial al impedir el crecimiento de *S. aureus*

2. Marco Teórico

2.1 *Staphylococcus aureus*

Las bacterias son microorganismos vitales para los ecosistemas del planeta. La mayoría que están presentes en el cuerpo humano no producen daño; sin embargo, en una pequeña cantidad existen las bacterias patógenas, las cuales pueden causar enfermedades infecciosas graves (National Human Genome Research Institute, 2022). Las bacterias oportunistas actúan invadiendo tejidos en los que normalmente no se encuentran en pacientes con sistemas inmunes comprometidos. Dentro de este conjunto tenemos a *Staphylococcus aureus*, siendo este un microorganismo muy versátil y adaptable que puede causar enfermedades en la piel, y en ocasiones, infecciones profundas a través del torrente sanguíneo (Foster, 2005).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, anaeróbica facultativa, perteneciente a la familia Staphylococcaceae de la clase Bacilli y filo Firmicutes. Bajo el microscopio, luce como grupos similares a racimos de células en forma de baya (Vermote & van Calenbergh, 2017). Es un patógeno extracelular con una alta capacidad de invadir las células de un huésped, debido a que están ampliamente distribuida en el aire, agua, polvo y heces de animales (H. Yang et al., 2021). Se encuentra presente en la cavidad nasal de aproximadamente el 30% de la población humana. Los portadores de *S. aureus* generalmente

son asintomáticos, pero, aunque esta bacteria se presente como un comensal inofensivo, puede causar enfermedades que van desde abscesos cutáneos menores hasta enfermedades graves como neumonía, mastitis y osteomielitis (Maree et al., 2022).

Este microorganismo es capaz de desarrollar resistencia a los antibióticos, principalmente se ha documentado su resistencia a la meticilina. La propagación global de este patógeno se debe esencialmente a un gran arsenal de factores de virulencia y genes de resistencia a los antibióticos ubicados en elementos genéticos móviles como los plásmidos, profagos, islas de patogenicidad y el cromosoma de cassette estafilocócico (Maree et al., 2022).

2.2. *S. aureus* en salud pública

La resistencia a los antimicrobianos surge cuando bacterias, virus, hongos o parásitos cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos, lo que hace que se vuelva más ineficaz su tratamiento e incrementa la posibilidad de contraer una enfermedad grave que puede llegar hasta la muerte (World Health Organization, 2021). La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en una amenaza para la salud pública, en parte, por el uso indiscriminado de los antibióticos convencionales, el gran contagio en los centros de salud, la imposibilidad que tienen algunas personas para acceder a agua limpia, la explotación agrícola y lo lento que avanzan las investigaciones para desarrollar nuevos antibióticos. La OMS ha considerado que más de 700.000 muertes en todo el mundo son atribuidas a la resistencia a los antimicrobianos, y se estima que en el año 2050 este número aumente a 10 millones (FakhriRavari et al., 2022).

La rápida respuesta de adaptación que ha tenido *S. aureus* frente a cambios en el medio debido a antibióticos ha hecho que esta bacteria adquiera resistencia; entre las cuales, las más prevalentes son las cepas resistentes a oxacilina, vancomicina y rifampicina, ilustrado en la figura 1.

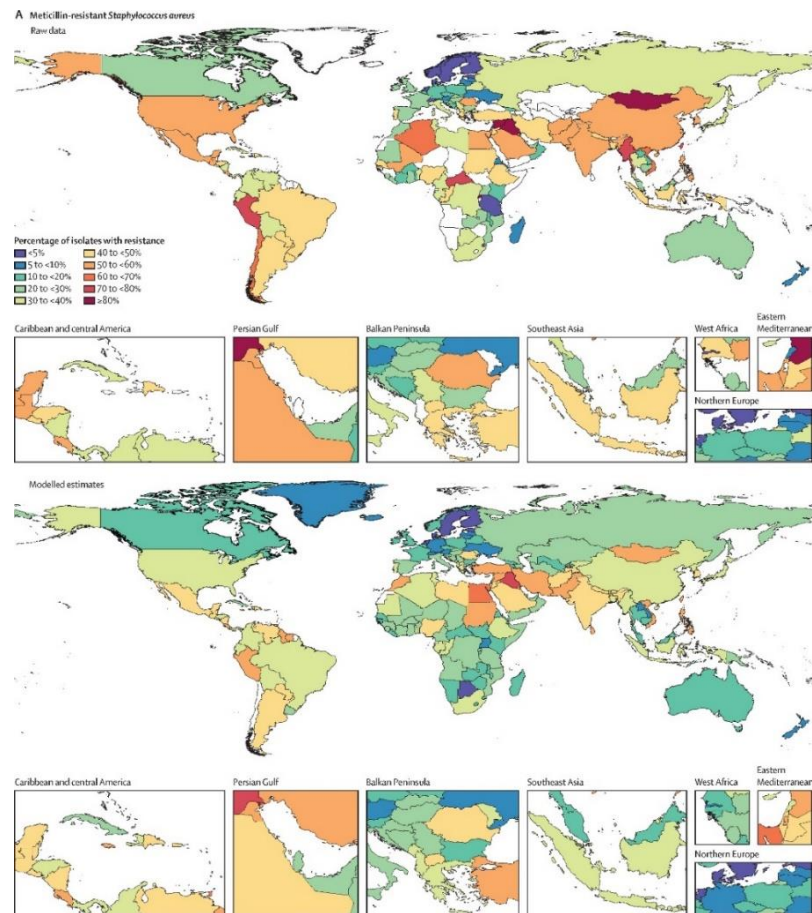
Figura 1. Panorama actual sobre resistencia de *S. aureus* a antibióticos como la oxacilina, vancomicina y rifampicina en diversos países durante el periodo comprendido entre 2013 y 2019. Tomado de (The Center for Disease Dynamics, 2022)



Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) son una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Maree et al., 2022), donde, según la OMS, los pacientes con infecciones por SARM tienen una probabilidad de muerte del 64% mayor que los pacientes con infecciones sensibles a los fármacos (World Health Organization, 2021). La matriz extracelular de esta facilita la supervivencia en ambientes hostiles o extremos, permitiendo la unión inicial y la posterior formación de biopelículas, es decir, una comunidad que crecen agregados y rodeados por una matriz extracelular que ellas mismas producen, la cual les favorece la adhesión sobre superficies (Flemming & Wingender, 2010).

En el año 2019, SARM causo más de 100.000 muertes. Se generó mayor resistencia en países del norte de África y oriente medio (entre 60% y un 80%) y una resistencia más baja en países de Europa y África subsahariana (menos del 5%). En Latinoamérica, *S. aureus* fue responsable de 15.300 muertes, principalmente ocasionadas por infecciones nosocomiales (Murray et al., 2022), donde la cepa resistente a la meticilina se ha reportado en países como Brasil, Uruguay, Argentina y Colombia (Figura 2). En Colombia, un estudio realizado en 5 hospitales de Bogotá, en el periodo de 2006-2007, encontró una tasa de mortalidad de 27% en pacientes con esta cepa (Alvarez et al., 2010), así mismo, un estudio en el hospital de la Orinoquia encontró pacientes infectados con la cepa observando un alto grado de mortalidad (Pérez et al., 2010), por lo que se concluye que en Colombia es muy recurrente encontrar esta cepa.

Figura 2. Porcentaje para la proporción de aislados identificados como *S. aureus* resistente a la meticilina. Tomado de (Murray et al., 2022).

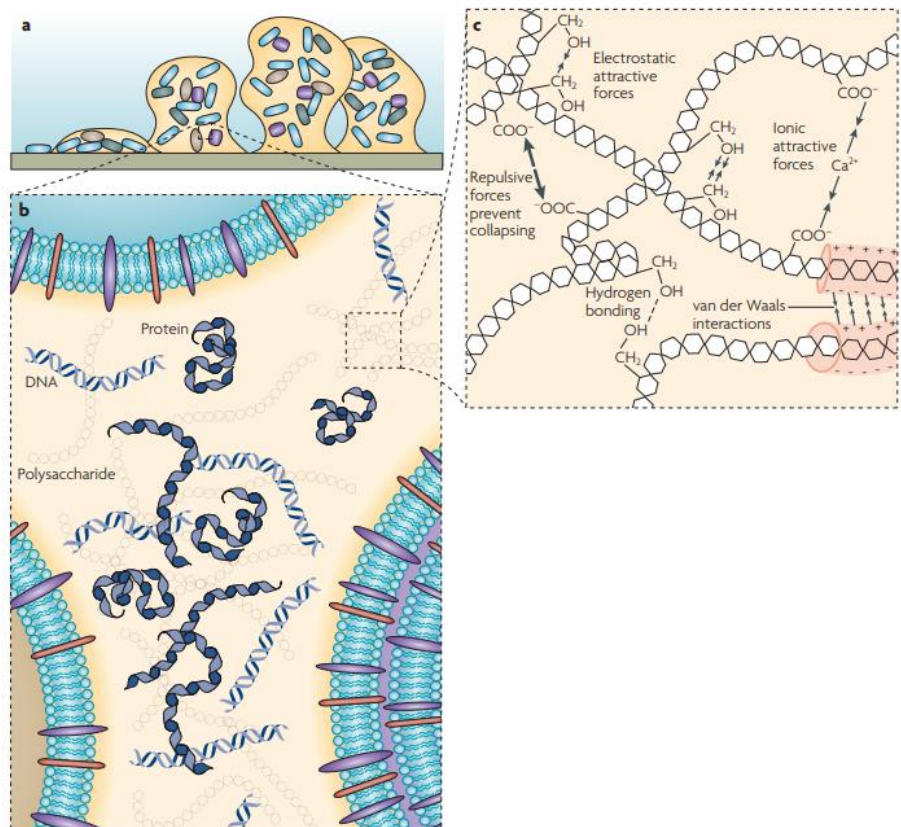


2.3. Mecanismos de supervivencia bacteriano

Cuando el microorganismo *S. aureus* ha logrado invadir las barreras físicas externas del cuerpo, que comprometen a la piel y las superficies mucosas, el sistema inmunológico se activa para combatirlo mediante respuestas innatas y adquiridas. En la piel, *S. aureus* inicia provocando una reacción inflamatoria, implicando la migración de neutrófilos y macrófagos al sitio de infección. Con ayuda de los anticuerpos, estas células intentan desaparecer al microorganismo invasor (Foster, 2005). Sin embargo, los distintos mecanismos de supervivencia hacen esta tarea más difícil.

Uno de los principales mecanismos de supervivencia es la formación de *biofilm*, el cual es un agregado de microorganismos que residen dentro de una matriz polimérica extracelular hidratada que ellos mismos producen, siendo entonces la matriz el material en el que se incrustan las células del *biofilm* (Jamal et al., 2018). Las sustancias poliméricas extracelulares hidratadas (EPS) son principalmente proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos (Gómez-Sequeda et al., 2020). En la mayoría de *biofilms*, los microorganismos representan menos del 10% de la masa seca, mientras la matriz puede representar más del 90%; esto hace que las sustancias poliméricas extracelulares formen el andamio para la arquitectura 3D del *biofilm*, sean responsables de la adhesión a la superficie y de la cohesión en la comunidad microbiana (Flemming & Wingender, 2010). Los EPS inmovilizan las células del *biofilm* y las mantiene cerca, lo que permiten interacciones intensas como la comunicación célula-célula, la transferencia horizontal de genes y la formación de microconsorcios sinérgicos (Flemming & Wingender, 2010). Debido a estas interacciones, la matriz adquiere propiedades físicas y químicas que generan protección a los microorganismos contra la desecación, la perturbación química, la invasión de otros agentes externos, la radiación ultravioleta, la muerte por uso de algunos antibióticos y cationes metálicos (Yan & Bassler, 2019). Además de esto, el *biofilm* protege a las bacterias invasores del sistema inmunitario del huésped al enmascarar los patrones del patógeno a través de la activación alterada de los fagocitos y el sistema del complemento; esto los hace capaces de causar una amplia gama de enfermedades crónicas (Roy et al., 2018). En la figura 3 se representa un modelo del *biofilm*.

Figura 3. Modelo de *biofilm*: a. Modelo de un *biofilm* bacteriano adherido a una superficie sólida, b. Los principales componentes de una matriz (polisacáridos, proteínas y ADN), c. Las clases de interacciones que dominan la estabilidad de la matriz. Tomado de (Flemming & Wingender, 2010).



Se demostró que las células estafilocócicas se adhieren a los catéteres venosos centrales, donde están incrustados en la matriz del *biofilm*. *S. aureus* y *S. epidermidis*, son patógenos oportunistas que producen *biofilm* robustos en superficies abióticas y bióticas. A diferencia de *S. epidermidis*, cuya infección depende principalmente de la formación de *biofilm*, *S. aureus* tiene muchos mecanismos y factores de virulencia para evadir el sistema inmune. Esto quiere decir que

en *S.aureus* el cambio entre células individuales o estado planctónico y un *biofilm* multicelular es un paso fundamental para los diferentes tipos de infecciones (Schilcher & Horswill, 2020).

Según Resch y colaboradores, los genes que codifican toxinas y otros factores de virulencia, como las proteasas, están regulados al alza en las células planctónicas. La expresión de toxinas apunta a que estas células planctónicas son mucho más virulentas y capaces de causar infecciones agudas, como por ejemplo la sepsis, que en comparación con las células sésiles. Las proteasas secretadas también pueden considerarse como factores de virulencia durante el proceso de infección, ya que pueden digerir las proteínas del huésped (Resch et al., 2005). *S. aureus* también expresa una amplia gama de factores de virulencia asociados a la superficie celular, incluidas, proteínas de superficie que promueven la adhesión al tejido dañado y a la superficie de las células del huésped (Foster, 2005), uniéndose a las proteínas de la sangre para evadir las respuestas inmunitarias (Foster, 2005; Skaar & Schneewind, 2004). Estudiando la virulencia de *S. aureus*, Kristian y colaboradores utilizaron un mutante isogénico de delección *ica*, deficiente en la producción de adhesina intercelular polisacárida, que es crucial para la formación de *biofilm*, demostrando que la falta de formación de *biofilm* no influye en la capacidad de *S. aureus* para inducir infecciones persistentes (Kristian et al., 2004).

Además, el microorganismo puede sobrevivir en las células huésped en una forma semi-inactiva, conocida como variantes de colonias pequeñas (SCV) mediante un mecanismo que implica la formación de un puente de fibronectina entre las proteínas bacterianas de unión a la fibronectina y las moléculas integrina $\alpha 5\beta 1$ del huésped (Foster, 2005; Keren et al., 2004). Sin

embargo, en algunos estudios se reveló que después de la formación de SCV, el microorganismo adquiere una capacidad de formación de *biofilm* (Singh et al., 2009).

Los cultivos en estado estacionario o planctónico de *S. aureus* muestran una tolerancia a los antimicrobianos comparable a la encontrada con los *biofilms*, ya que producen poblaciones persistentes (Keren et al., 2004). Sin embargo, se ha demostrado en varias ocasiones que los *biofilms* son considerablemente más resistentes a los antibióticos que las células en estado planctónico (Singh et al., 2009), debido a las barreras química y físicas, el estado metabólico heterogéneo y la comunicación intercelular que facilita la resistencia (Singh et al., 2009).

2.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son líquidos aceitosos aromáticos que provienen de materiales vegetales, tales como hojas, frutos, brotes, semillas, flores, corteza, madera, ramitas y raíces. Son comúnmente obtenidos por el método de hidrodestilación, liberando una mezcla odorífera en forma muy concentrada de su olor. Al tener menos densidad que el agua, los aceites esenciales son volátiles, líquidos, solubles en lípidos, raramente coloreados y solubles en solventes orgánicos (Chouhan et al., 2017; Stashenko, 2009). Los AE son combinaciones de varios compuestos químicos volátiles de bajo peso molecular y de naturaleza química muy diversa. Dentro de las familias químicas que los componen se encuentran los compuestos terpénicos (mono, sesqui y diterpenos), alcoholes, epóxidos, aldehídos, ésteres, aminas, cetonas y sulfuro (Meenu et al., 2023).

Los aceites esenciales son producidos por las plantas como metabolitos secundarios (Tariq et al., 2019), ya sea por situaciones de estrés para la supervivencia ante un posible patógeno o

adaptación al medio en el que crecen. A pesar de esto, cada especie de planta posee diferentes metabolitos secundarios, ya que en muchos casos la respuesta depende de la especie o el estado fenológico de la planta (Usano-Aleman et al., 2014). Los AE en las plantas aromáticas se produce en cantidades de 0,5 al 6% con respecto a su peso total (Stashenko, 2009).

Esta colección de metabolitos secundarios ayuda a la planta a interactuar con otras especies o plantas (Liang et al., 2023), incidiendo sobre la velocidad de crecimiento, resistencia a enfermedades, su propagación, entre otras condiciones (Stashenko, 2009). La presencia de terpenos, compuestos fenólicos y aldehídos (Tariq et al., 2019), correlacionado con su perfil volátil, que dependerá de la especie, la ubicación, el entorno de crecimiento y hasta de la forma de extraerlo (Meenu et al., 2023) nos dará a conocer el quimiotipo del AE, debido a que este es nombrado por el compuesto que se encuentre en mayor proporción. Con esto, se han determinado diferentes quimiotipos de cada AE; por ejemplo, Vicuña y colaboradores encontraron que las muestras de *L. origanoides* tienen un alto porcentaje de monoterpenos, seguido de monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos, destacando dos muestras de AE donde el compuesto principal de una muestra es timol (60%) y en la otra muestra destacan dos compuestos: timol (34%) y carvacrol (26%), por lo que el primer aceite es quimiotipo timol, mientras que el segundo es quimiotipo timol- carvacrol (Vicuña et al., 2010).

2.5. Aceites esenciales como agentes antimicrobianos

S. aureus es considerado uno de los patógenos más infecciosos, por lo que ya se encuentran distintos antibióticos para tratarlo; sin embargo, al estar en constante evolución a través de la mutación y la absorción de elementos genéticos, le confieren una mayor resistencia y virulencia (Maree et al., 2022). Esta multirresistencia de *S. aureus* se ha vuelto un gran problema para la

humanidad, por lo que se empiezan a investigar distintas formas de combatirla, como por ejemplo, a través del uso de los aceites esenciales. A lo largo de los años se han estudiado a los aceites esenciales encontrando sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y antivirales, inhibiendo el crecimiento bacteriano y la formación de *biofilm* (Artini et al., 2012; Bajpai et al., 2012; Gómez-Sequeda et al., 2020; Hao et al., 2022; Hou et al., 2022; Lin et al., 2022; H. Yang et al., 2021). Debido a esto, los AE se han convertido en productos naturales de gran interés para combatir microorganismos multirresistentes; además, la compleja combinación de compuestos químicos presentes en los AE hace de estos un arsenal químico multitarget que evitaría el posible desarrollo de resistencia microbiana (Agrimonti et al., 2019). En tabla 1 se reportan algunos ejemplos de aceites esenciales que han funcionado contra distintos patógenos de interés clínico.

La adición de aceites esenciales a los antibióticos también se cuenta como una posibilidad, ya que la sinergia puede inducir una reducción en la concentración mínima inhibitoria (CMI) antimicrobiana (Chouhan et al., 2017). Una de las más importantes características de los aceites esenciales y sus componentes es la hidrofobicidad, que les permite unirse a los lípidos presentes en la membrana celular de las bacterias y las mitocondrias, haciéndolas más permeables y perturbando las estructuras celulares. Esto nos lleva a que eventualmente ocurra la muerte de la célula bacteriana debido a la gran fuga de macromoléculas e iones de la célula bacteriana (Chouhan et al., 2017; Schilcher & Horswill, 2020). Debido a que las bacterias gram-positivas tienen la presencia de una capa de peptidoglicano fuera de su membrana externa con el que se unen el ácido teicoico y las proteínas, los AE actúan de manera más activa (Meenu et al., 2023); sin embargo, aún existe un gran desconocimiento del mecanismo por el cual los aceites esenciales afectan el

metabolismo de las bacterias; para comprender mejor estos mecanismos, se pueden utilizar las ciencias ómicas, entre ellas, la metabolómica (Alarcon-Barrera et al., 2022).

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales sobre microorganismos patógenos

Aceite esencial	Componente del aceite esencial asociado a la actividad biológica	Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (mg/ml)	Referencia
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	1,8-cineol, alcanfor, isopulegol, borneol, β -cariofileno, chavicol y mirtenol	<i>E. coli</i>	0,04	(Munda et al., 2019)
<i>Baccharis coridifolia</i> DC	germacreno D, biciclogermacreno, (E)-cariofileno	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5	(Freitas et al., 2020)
<i>Litsea cubeba</i>	Citral	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (MRSA)	0,5	(Hu et al., 2019)
<i>Lippia origanoides</i>	Timol-Carvacrol	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	0,75	(Guillín et al., 2021)
<i>Lippia origanoides</i>	Carvacrol	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	0,25	(Hao et al., 2022)
<i>Plectranthus scutellarioides</i>	Espatulenol, germacreno D, biciclogermacreno,	<i>S. aureus</i> resistente a la	2,5	(Aziz et al., 2020)

	nonacosano y morillo	meticilina (MRSA)		
--	-------------------------	----------------------	--	--

2.6. La metabolómica: una alternativa para estudiar mecanismos de acción

El proceso de desarrollo de fármacos se puede dividir en cinco etapas principales: descubrimiento del fármaco; estudios preclínicos; desarrollo clínico; revisión regulatoria y seguimiento posterior a la comercialización (Alarcon-Barrera et al., 2022). Al iniciar con el desarrollo temprano de fármacos, se vuelve muy importante encontrar un medicamento que cause el mínimo daño en el huésped. Por esto, durante las primeras etapas se ha hecho necesario el uso de tecnologías bioquímicas y estrategias bioanalíticas, junto con las tecnologías tradicionales, para conocer el mecanismo de acción (Alarcon-Barrera et al., 2022).

En el desarrollo de tecnologías basadas en el progreso de la biología molecular, se desarrollan las ahora conocidas como ciencias ómicas. Estas se basan en el estudio de moléculas biológicas de distintos elementos que componen un sistema, como células, tejidos e individuos. Esto permite el estudio integral de las interacciones y las relaciones que existen entre los componentes internos de un organismo y los factores externos con los que interactúa (Jaumot & Bedia, 2021). La difusión de estas disciplinas ha sido posible gracias al desarrollo de tecnologías de investigación de alto rendimiento capaces de generar grandes datos relacionados con los múltiples niveles jerárquicos de complejidad biológica (ADN, proteínas, ARNm, metabolitos, entre otros) (Cannataro et al., 2022). Debido a esto, las ciencias ómicas incluyen el estudio de genes (genómica), procesos epigenéticos (epigenómica), transcripciones (transcriptómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica) (Gentile et al., 2021). En general, estas

técnicas nos proporcionan un método factible para obtener perfiles fisicoquímicos globales de microorganismos (L. Chen et al., 2022).

La metabolómica es una de las últimas ciencias agregadas a las ómicas, considerada un campo emergente de la bioquímica analítica y como el punto final de la “cascada ómica”. La metabolómica es un enfoque cuantitativo y cualitativo particularmente útil para estudiar la composición de moléculas pequeñas de un sistema biológico (Tang et al., 2021). Esta permite la caracterización integral del conjunto de compuestos de bajo peso molecular (<1500 Dalton) como productos iniciales, intermedios o finales de transformaciones metabólicas en los organismos vivos (Sieniawska & Georgiev, 2022). En comparación con la proteómica, la metabolómica tiene ciertas ventajas, como lo es estar estrechamente relacionada con el fenotipo, como la tolerancia, por lo que es una herramienta poderosa para estudiar los mecanismos moleculares en respuesta al estrés (L. Chen et al., 2022).

Los metabolitos son compuestos que participan en el metabolismo celular, desempeñando un papel fundamental en procesos vitales como la generación y reserva de energía, la transmisión de señales y el control de la muerte celular programada. (Johnson et al., 2016). Dado que los metabolitos están relacionados directamente con procesos bioquímicos, fisiológicos y fisiopatológicos, reflejan la actividad de los genes en un momento determinado y en un entorno determinado (Sieniawska & Georgiev, 2022). Como se ha estado mencionando, la metabolómica es el estudio de los metabolitos y debido a esto, en los últimos años, este método se ha utilizado para dilucidar los mecanismos de resistencia bacteriana (Tang et al., 2021), en la investigación de enfermedades, en el descubrimiento de marcadores (Segers et al., 2019), reflejando el perfil

metabólico global de sistemas biológicos complejos después del tratamiento con un agente con actividad antibacteriana (Huang et al., 2023).

La metabolómica tiene como objetivo mapear todas las reacciones bioquímicas en un sistema biológico. Sin embargo, existen dos maneras de aproximar ese estado (Alarcon-Barrera et al., 2022). La primera consiste en medir la gama más amplia de metabolitos presentes en la muestra extraída sin conocimiento del metaboloma, lo que hace necesario el uso de herramientas computacionales para identificar y correlacionar los metabolitos entre muestras. Como ventaja, ofrece un medio imparcial para examinar la relación entre metabolitos interconectados de múltiples vías. No obstante, debido a que hay una amplia gama de metabolitos sin identificar, esta tarea se vuelve más tediosa. Esta técnica se denomina metabolómica “no dirigida”. Por el contrario, la segunda consiste en conocer *a priori* un conjunto predeterminado de metabolitos, ya que esta se basa en la concentración de este conjunto. Mediante ello, se desarrollan y optimizan métodos para el análisis de metabolitos específicos y vías metabólicas de interés. Esto proporciona una mayor sensibilidad y selectividad; esta estrategia se conoce como metabolómica dirigida (Johnson et al., 2016).

Analizando los estudios realizados anteriormente para conocer el mecanismo de acción de moléculas con actividad biológica, se ha encontrado que la metabolómica *no dirigida* es la más utilizada. Esto se debe a la gran generación de datos que proporciona una mayor cantidad de analitos que pueden ser cuantificados, evitando la necesidad de una hipótesis específica previa sobre un conjunto particular de metabolitos y, en su lugar, analiza el perfil metabolómico global (Alonso et al., 2015; Sieniawska et al., 2020; Vincent et al., 2016). Sin embargo, se cree necesario

el posterior uso de la metabolómica dirigida para obtener las concentraciones exactas de metabolitos identificados por la metabolómica no dirigida (Johnson et al., 2016).

Al igual que en la mayoría de los trabajos en los estudios metabolómicos, la identificación de los metabolitos también depende del objetivo y tipo de estudio. Según la sociedad internacional de metabolómica, establece niveles de confianza, recomendando que los estudios de metabolómica no dirigida lleguen hasta un nivel de identificación presuntiva, donde se establezca la estructura probable del metabolito. Mientras, para el estudio de metabolómica dirigida, se recomienda llegar a la estructura química inequívoca (Tabla 2) (Gil-De-La-Fuente et al., 2019).

Tabla 2. Niveles de certeza en la identificación de metabolitos propuestos por la sociedad de metabolómica. Adaptado de: (Gil-De-La-Fuente et al., 2019)

	Nivel de certeza	Descripción
Estudios dirigidos	0	Estructura 3D inequívoca, incluida la estereoquímica completa
	1	Estructura 2D segura, utilizando el estándar de referencia
Estudios no dirigidos	2	Estructura probable utilizando datos de la literatura y espectros de fragmentación
	3	Fórmula molecular del grupo de isómeros o clase
	4	Metabolito desconocido

Las técnicas analíticas más usadas en la metabolómica son la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN). El análisis metabolómico basado en espectrometría de masas de alta resolución es una herramienta avanzada para la visualización del patrón y el efecto que tiene un agente antimicrobiano sobre un microorganismo (Pamplona Pagnossa et al., 2022).

La MS es una técnica analítica que proporciona una alta sensibilidad, reproducibilidad y versatilidad. Esta técnica adquiere los datos espectrales en forma de relación masa-carga (m/z) y una intensidad relativa de los compuestos medidos. Se hace necesario que se ionice la muestra biológica para que cada metabolito genere una señal. Cada compuesto ionizado resultante de cada molécula generará diferentes patrones de señales que definen la huella química de la molécula original (Alonso et al., 2015). En casos en los que se encuentra una mezcla compleja de metabolitos, se hace necesario una técnica de separación, como la cromatografía líquida. Esta separación minimiza la supresión de la señal y permite una mayor sensibilidad, lo que ayuda a una mejor identificación de los metabolitos (Johnson et al., 2016). Sin embargo, aparte de esto, se deben realizar análisis estadísticos. En el campo de la metabolómica “no dirigida”, tanto los análisis multivariados como los univariados son herramientas esenciales para extraer información significativa de los datos. Los análisis multivariados consideran múltiples variables simultáneamente, esto significa analizar todo el perfil de metabolitos para identificar patrones y relaciones entre datos (Elhaik, 2022; Ruiz-Perez et al., 2020). El análisis de componentes principales (PCA) nos proporciona información sobre la distribución de las muestras en función de los componentes principales, lo que posibilita la evaluación de la contribución de la variable experimental en la definición de los componentes principales. Adicionalmente, existen otros métodos derivados como el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), el cual conserva en su primer componente principal la mayor covarianza posible entre los datos de control y tratamiento (Ruiz-Perez et al., 2020), las proyecciones ortogonales al análisis discriminante de estructuras latentes (OPLS-DA) o la regresión de componentes principales (PCR), que tienen como objetivo realizar una predicción de un conjunto de variables de respuesta mediante el análisis de la relación entre una matriz descriptora X y una matriz de respuesta Y

(Sieniawska et al., 2020; Theodoridis et al., 2013). Así mismo, existen análisis univariados, estos proporcionan una visión general preliminar de las características de los datos que pueden ser importantes para identificar las condiciones de estudio. Para datos de dos grupos (control y tratamiento) generalmente se usan análisis como la prueba t de Student, el análisis de las veces de cambio (fold-change) y graficas de volcán (Y. Chen et al., 2022), estos análisis permiten encontrar características (m/z , que posiblemente representan un compuesto químico) que muestran diferencias significativas en una variable específica entre dos o más grupos a través de pruebas estadísticas. Un gráfico de volcán combina la evaluación de la magnitud de cambio y la significancia estadística en una representación clara y concisa, facilitando la identificación de metabolitos de interés, la prueba t de Student compara los niveles entre dos grupos para determinar si hay una diferencia significativa y el análisis de las veces de cambio representa la proporción del cambio entre dos condiciones, razón de medida entre la condición de tratamiento y control (J. Wang et al., 2024). El análisis mediante mapas de calor también es un análisis univariado, estos proporcionan una visualización de los parámetros de la marcha dentro de un solo gráfico, destacando grupos de diferencias (Timotius et al., 2019).

La metabolómica permite estudiar las perturbaciones metabólicas que tienen lugar en las células bacterianas bajo la influencia de un tratamiento, como la exposición a metabolitos secundarios de plantas, relevando los cambios en las vías metabólicas que reflejan la reprogramación de las redes bioquímicas dentro de las bacterias (Sieniawska & Georgiev, 2022).

3. Antecedentes

Desde el descubrimiento de la resistencia a múltiples fármacos, que han adquirido algunos microorganismos y por su amplia gama de enfermedades, se hizo necesario el estudio de alternativas diferentes a los antibióticos. En esta búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, se destaca el alto potencial de las plantas (Sieniawska & Georgiev, 2022), ya que las plantas producen naturalmente una amplia gama de metabolitos secundarios que actúan en defensa contra el microorganismo, siendo capaz de inhibir su crecimiento (Silva et al., 2016).

Dentro de los productos naturales más estudiados como agentes antimicrobianos provenientes de las plantas, los aceites esenciales y extractos vegetales son los más relevantes. Existe un gran número de artículos en los que se destacan la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral de los aceites esenciales (Tariq et al., 2019). Por ejemplo, Bachir demostró que el aceite esencial de las hojas de *Eucalyptus globulus* tiene capacidad antibacteriana contra bacterias Gram-positiva como *S. aureus* y bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* (Bachir & Benali, 2012), y Lin, estudiando el aceite esencial de palo de rosa, descubrió que este podía inhibir el crecimiento de micelio de los hongos responsables del deterioro del melocotón (Lin et al., 2022). Dentro del estudio de los aceites esenciales, también se ha destacado su capacidad *antibiofilm* y *anti-quórum sensing*, características biológicas que les permiten a las bacterias rasgos de supervivencia. Entre ellos el estudio realizado por Cáceres y colaboradores muestra los resultados de la actividad biológica del aceite esencial de *L. origanoides* contra cepas bacterianas de *E. coli* y *S. epidermis* (Cáceres et al., 2020).

A pesar de que existen múltiples estudios en los que se demuestra que los aceites esenciales funcionan como agentes antibacterianos, aún no son considerados una fuente importante de

antibióticos. Esto puede ser principalmente al desconocimiento del mecanismo de acción del aceite esencial sobre la bacteria (Alarcon-Barrera et al., 2022; Rempe et al., 2017). Para tratar de resolver esta problemática, algunos investigadores han empezado a utilizar las ciencias ómicas como posible solución, ya que estas se encargan de la comprensión de la biología de sistemas con el estudio de los distintos conjuntos de moléculas que componen un organismo (Cannataro et al., 2022).

En comparación con la genómica, la transcriptómica y la proteómica, la metabolómica brinda una perspectiva más exhaustiva de las respuestas directas, indirectas y secundarias que las bacterias tienen frente a los distintos desafíos que les planteen los factores de estrés, cuyos efectos están mediados por cambios en el metabolismo (Sieniawska & Georgiev, 2022). Por esto, más específicamente se ha usado la metabolómica para estudiar estos casos en particular. Adicionalmente, esta ciencia también ha sido utilizada a lo largo de los años para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Por ejemplo, Sieniawska y colaboradores utilizaron la metabolómica “no dirigida” para evaluar la influencia del aceite esencial de *Cinnamomum verum* quimiotipo cinameldehído, en el conjunto de metabolitos producidos por *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de cromatografía líquida y espectrometría de masas, encontrando alteraciones en la composición de los lípidos de membrana que se manifiestan por una reducción en el número de compuestos en subclases particulares, cambios en el metabolismo de glicerofosfolípidos debido a un aumento en el número de monoglicéridos; se observó desregulación para la vía de biosíntesis de tetrahidrofolato, con una regulación positiva de 7,8-dihidropteroato (DHP) y 7,8-dihidrofolato (DHF), ambos compuestos implicados en la síntesis de *novo* de tetrahidrofolato. En conclusión, la bacteria tiene la capacidad de formar una barrera física contra los factores de estrés reorganizando

su membrana externa, probablemente reduciendo la permeabilidad de la pared celular y la fluidez de la membrana interna (Sieniawska et al., 2020). Así mismo, Tang utilizó la metabolómica no dirigida para investigar el mecanismo antibacteriano y la variación del metaboloma causada por el AE de *A. villosum* Lour en *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), revelando que 72 metabolitos y 10 vías se vieron afectadas; entre esas, el metabolismo de los aminoácidos, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), inhibió la síntesis de trifosfato de adenosina y especies reactivas de oxígeno (Tang et al., 2021).

La combinación de distintas ciencias ómicas también ha sido tema de estudio. Por ejemplo, Ma y colaboradores estudiaron el mecanismo antibacteriano de la monocaprina contra SARM usando análisis de transcriptómica y metabolómica, mostrando que 45 metabolitos en modo iónico positivo y 50 en modo iónico negativo, se modificaron significativamente después del tratamiento. En general, los resultados indicaron una inhibición en el metabolismo de los aminoácidos, una mayor glucólisis, la activación de la respiración anaeróbica mediante el bloqueo del ciclo del TCA y la cadena de transporte de electrones, y restringió el crecimiento de la bacteria (Ma et al., 2023)

Si bien la aplicación de la metabolómica para identificar la respuesta de las bacterias bajo la influencia de productos naturales de las plantas aún necesita más investigación detallada (Sieniawska & Georgiev, 2022) los estudios son constantes, como los realizados en esta investigación. Hasta la fecha de escribir este documento, el autor no encontró estudios publicados sobre un posible mecanismo de acción que tenga el aceite esencial de *L. origanoides* sobre la bacteria *S. aureus* (Buscado en las bases de datos SCOPUS y PubMed usando la ecuación de

buscada con las frases “Untargeted Metabolomics” AND “*S. aureus*” y “Untargeted Metabolomics” AND “*L. origanoides*”).

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Ceba bacteriana y medios de cultivo

El microorganismo usado en este estudio fue *S. aureus* ATCC 43300, el cual se obtuvo del banco celular American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). Los medios de cultivo Mueller Hinton (MH) fueron adquiridos de OXOID. El Dimetil Sulfoxido (DMSO) utilizado como disolvente del aceite esencial fue de grado microbiológico y adquirido en Merck (Darmstadt, Alemania). Las microplacas de 96 pozos de polipropileno de fondo redondo con tapa fueron marca Biologix. Todos los ensayos se realizaron empleando agua MilliQ de resistividad 18.2 Ω , extraída del equipo de laboratorio Smart 2 Pure de Thermo Scientific (Helsinki, Finlandia)

4.1.2. Aceite esencial de *Lippia origanoides*.

El aceite esencial empleado en este estudio fue químicamente caracterizado y suministrado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales (CENIVAM).

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterización química del AE de *L. origanoides*

El aceite esencial fue suministrado y caracterizado por el CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia), su destilación y caracterización fue realizada de acuerdo con la metodología de (E. E. Stashenko et al., 2010).

El AE fue obtenido mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas en un equipo tipo Clevenger, a continuación, el AE obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro, se pesó y se almacenó a una temperatura de 4°C, todas las extracciones se realizaron por triplicado. Las muestras se analizaron en un equipo Agilent Technologies 6890N Series Network System (Palo Alto, California, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (AT, MSD 5975 Inert XL). Se utilizaron dos columnas capilares con medidas de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor, una columna es apolar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli-(dimetilsiloxano) y la otra polar DB-WAX con fase estacionaria de poli (etilenglicol), se usó helio como gas de arrastre (99.995% gas AP, Linde, Bucaramanga, Colombia), con un flujo volumétrico constante de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó de 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min) a 3 °C/min, luego, hasta alcanzar 220 °C (5 min) a 4 °C/min (E. E. Stashenko et al., 2010).

Los espectros de masas, las corrientes iónicas totales (TIC) y de iones extraídos (EIC) se obtuvieron con un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de radiofrecuencia (full scan) en el rango de masas de 40-350 m/z con tasa de adquisición de 5.5 espectro/s. La identificación de los componentes del AE se realizó mediante la comparación de sus espectros de masas obtenidos por GC-MS y por medio de sus índices de retención lineal (LRI) en las dos columnas, calculados con base en la serie homologa de n-alcanos C9-C25 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.) y se confrontaron con espectros de masas de diferentes bases de datos (NIST, 2014 y Wiley, 2008), así como con información de literatura científica. Para la identificación confirmatoria de los componentes de aceite esencial se usaron los patrones obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

4.2.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) causada por el aceite esencial *L. origanoides* en la bacteria *S. aureus*. Para determinar este efecto antimicrobiano del AE se empleó el método de microdilución en caldo estandarizado en el laboratorio, y la determinación de los valores de CMI se realizaron utilizando placas de 96 pozos de polipropileno y fondo plano.

Para evaluar la actividad antimicrobiana inicialmente se preparó un cultivo bacteriano en estado planctónico de la bacteria durante 24 h. Seguidamente, se verificó la viabilidad del cultivo y se procedió a realizar un pre-inóculo de la bacteria en caldo MH, dejándolo en reposo durante 10 h a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana adecuada (entre 10^5 y 10^6 UFC/mL). Se realizó la cinética de crecimiento empleando microplacas que contenían 100 μ L del inóculo bacteriano junto con 100 μ L de diferentes concentraciones de aceite esencial disuelto en DMSO, en un rango de 0,18mg/ ml - 3 mg/ml, y tres pozos con 100 μ L de agua peptonada que fueron los controles. Durante 8 horas se dejó crecer el microorganismo a 37°C y con una agitación de 200 rpm, midiendo la absorbancia cada hora mediante un espectrofotómetro con lector de microplaca ELISA en una longitud de onda de 595 nm.

4.2.3. Cultivo bacteriano de *S. aureus*

Los cultivos bacterianos de *S. aureus* corresponden a la cepa ATCC 43300, la cual es adquirida comercialmente del banco celular American Type Culture Collection. La preparación de la bacteria en estado planctónico se llevó a cabo por medio de un pre-inóculo, es decir tomando una pequeña colonia de una placa de agar e incubándola en viales que contenían 3 mL del medio

de cultivo (Mueller Hinton) a 37°C, el crecimiento se llevó a cabo por 12 horas con centrifugación constante a 200 rpm. Al siguiente día, se realizó una dilución en un factor 1/10 utilizando de solvente el medio de cultivo MH hasta alcanzar una concentración bacteriana adecuada, la cual estuvo entre 10^5 y 10^6 UFC/mL, valor obtenido al verificar la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm (rango de 0,08 a 0,1) (CLSI, 2018). Para realizar los controles (ocho repeticiones) se agregó 500 μ L de la dilución y 500 μ L de agua peptonada por cada vial, por otro lado, en el tratamiento se agregó 500 μ L de la dilución y 500 μ L del correspondiente aceite esencial disuelto en DMSO ajustado a la concentración de 1,50 mg/mL para una posterior concentración de 0,75 mg/mL que corresponde a la concentración mínima inhibitoria del 50% de la población, igualmente con ocho repeticiones. Al tener ya los viales bien sellados se llevarán a centrifugación por 4 horas (fase exponencial del crecimiento) a 200 rpm y una temperatura de 37 °C para la posterior extracción.

4.2.4. Extracción de metabolitos de células planctónicas

Para extraer los metabolitos se siguió el método de Wu (Wu et al., 2022) con ligeras modificaciones. Primero se llevó a centrifugación los viales preparados en la sección 4.2.3 (8 viales de control y 8 de tratamiento) durante 10 minutos a 6000 rpm y temperatura de 4 °C, se retiró el medio de cultivo sin afectar el pellet que se forma, seguidamente se adiciono 500 μ L de agua peptona. Se realizó este procedimiento 2 veces más con el fin de lavar la biomasa obtenida (pellet). A continuación, se adiciono 500 μ L de acetonitrilo acuoso (ACN) al 50 % (v/v) y 500 μ L de metanol acuoso (MeOH) al 50 % (v/v). Después de esto la muestra se sometió a sonicación en un sonicador de punto con 3 pulsos (10 ON, 45 OFF) en un baño de hielo en un homogeneizador ultrasónico. Posteriormente, se llevó a centrifugación durante 15 minutos a 12000 rpm y

temperatura de 4 °C. El sobrenadante obtenido fue depositado en viales de Eppendorf nuevos para ser sometidos al proceso de concentración al vacío en el equipo Savant Speed Vac SPD120 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC 28804, EE.UU) y almacenados en un refrigerador a -20 °C. Finalmente, el residuo fue reconstituido en 300 µL de una mezcla de metanol (ac) frío al 50 % (v/v), y almacenado a -80 °C hasta su análisis por (UHPLC/MS). Por último, las muestras de control de calidad fueron preparadas agrupando 20 µL de cada una de las muestras de trabajo, esto para monitorear y asegurar la precisión y reproducibilidad de los análisis instrumentales.

4.2.5. Análisis metabolómico de los extractos mediante UHPLC/MS

Los metabolitos extraídos fueron analizados mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador Orbitrap en el equipo Orbitrap™ Exactive Plus (Thermo Fischer Scientific). El pH fue ajustado para llevar a cabo las corridas cromatográficas por separado para los modos de adquisición de iones positivos y negativos, con el fin de evitar fenómenos de ionización competitiva y supresión de iones. Los cromatogramas fueron escaneados, para conocer los valores de masa exacta de los metabolitos. Se empleó un UHPLC Dionex™ Ultimate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.), equipado con un desgasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300 TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC 3000). Columna Hypersil GOLD™ TM aQ (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9 µm de tamaño de partícula) se usó a 30 °C. Se utilizó como fase móvil ácido fórmico al 0.2 % en agua (A) y ácido fórmico al 0.2 % en acetonitrilo (B). La condición inicial de gradiente fue la siguiente: 100 % de A cambiando linealmente a 100 % de B en 8 min, se mantuvo constante 4 min, se regresó a 100% A en 1 min y se mantuvo en equilibrio

durante 3 min. El flujo de la fase móvil fue de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el volumen de inyección, 1 μL . El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones tipo Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunny, CA, EE. UU), a través de una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), operada en modo de iones positivos, a 350 °C, voltaje capilar +3500V, temperatura del capilar 320 °C. El analizador Orbitrap operó en modo de barrido completo (Full MS Scan) con resolución 70000. Los iones fueron fragmentados en una celda de disociación por colisiones activada de alta energía (HCD, HighEnergy Collisional Dissociation), a diferentes energías (10 y 20 eV) en el modo de barrido por pasos (Stepped Scan). Para cada energía de colisión, se utilizó una resolución RFWHM de 35000, usando AGC de 3×10^6 y un tiempo de inyección en la cámara C-trap de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de m/z 50-750. Una metodología similar fue utilizada para el modo de iones negativo.

4.2.6. Procesamiento de datos

Para la identificación de metabolitos entre las muestras de control y tratamiento, se llevó a cabo un análisis metabolómico no dirigido (para los modos de adquisición de iones negativos y positivos), que permitió identificar las rutas biosintéticas afectadas por la acción del aceite esencial. Para esto, los datos crudos fueron sometidos a un preprocesamiento que implicó convertir los archivos a formato mzXML mediante el software ProteoWizard 3.0x (T. Yang et al., 2022) y posteriormente cargados en la plataforma interactiva en línea XCMS (Gowda et al., 2014; Schrimpe-Rutledge et al., 2016) con los siguientes parámetros: se ejecutó un análisis multigrupo en el modo centWave para la detección de características ($\Delta = 5$ ppm y Error de 5 ppm); la corrección del tiempo de retención se realizó con un método obiwrap (profStep= 1) y la alineación

del cromatograma ($mz_{wid}= 0.025$ y $bw=5$). Obteniendo de salida una matriz de datos con las intensidades de las características detectadas.

La matriz de datos fue filtrada de acuerdo con el coeficiente de variación (CV) de las muestras de control de calidad donde todas las características de relación m/z que estuvieron por encima del 30% de CV, fueron eliminados. Seguidamente, para determinar los cambios entre los perfiles metabólicos de las muestras control y tratadas con el AE, se analizó la matriz de datos en el software MetaboAnalyst 5.0 (Chong & Xia, 2020; Schrimpe-Rutledge et al., 2016) mediante análisis multivariados como lo fue el análisis por componente principal (PCA) y el análisis de mínimos cuadrados discriminantes (PLS-DA). Las características (m/z) más significativas se identificaron mediante el score de la importancia de la variable en la proyección (VIP) del modelo PLS-DA generado, seleccionando las características con un $VIP>1.0$. Adicionalmente se realizaron análisis univariados, como el mapa de calor con el fin de determinar patrones o clúster y el gráfico de volcán el cual permite relacionar la significancia estadística (Valor P) frente a la magnitud del cambio (FC).

Para la identificación presuntiva de los metabolitos de interés en el estudio, se utilizó la herramienta de anotación y búsqueda en línea CEU-Mass mediator (versión 3.0, consultado el 13 de junio del 2023) (Mamani-Huanca et al., 2021), se llevó a cabo una búsqueda teniendo en cuenta los posibles aductos que se formaron y el error en masa (ppm). Gracias a esto, se obtuvo un listado de posibles candidatos de metabolitos, que posteriormente fueron comparados con los encontrados en la literatura por medio de las bases de datos: Human Metabolome Database (HMDB, consultado el 13 de junio del 2023) (Wishart et al., 2018), PubChem (consultado el 13 de junio del 2023) (Barupal & Fiehn, 2019), Mass Bank (consultado el 3 de julio) (Bejder et al., 2021) y CFM-ID (Versión 3.0 y 4.0, consultado el 3 de julio) (Djombou-Feunang et al., 2019) y algunos espectros

de masas reportados en artículos científicos (de Jonge et al., 2023; Liu et al., 2020), teniendo en cuenta algunos criterios como, metabolitos que anteriormente ya han sido identificados en el microorganismo (X. Wang et al., 2020), metabolitos relacionados con vías de comunicación celular en las bacterias o las vías del metabolismo bacteriano que permiten una colonización exitosa. Seguidamente a la identificación de los metabolitos, se realizó un análisis y enriquecimiento de las vías biosintéticas en el microorganismo que posiblemente fueron afectadas por el AE con ayuda del software MetaboAnalyst (Versión 5.0, consultado el 25 de septiembre) y Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, consultado el 25 de septiembre) (Fiehn, 2016; Kanehisa & Goto, 2000). Adicional a esto se realizó la comparación del patrón isotópico de los metabolitos ya presuntivamente identificados para una mayor aproximación en la identificación, para esto con ayuda del software Scientific Instrument Services (SIS) (consultado el 5 de enero), el software Isotope Patterns Colby College Chemistry (consultados el 5 de enero) y Mass Bank (consultado el 6 de enero) (Bejder et al., 2021) se buscaron los patrones isotópicos reportados en la literatura (o simulados), los cuales fueron comparados con los experimentales usando el programa *Xcalibur 3.0* (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).

4.2.7. Análisis estadístico

Se llevaron a cabo todos los experimentos con un mínimo de tres réplicas biológicas, y sus resultados se presentaron como la media \pm desviación estándar. En el análisis metabolómico, se emplearon ocho réplicas biológicas. En todos los casos su nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Determinación de la actividad antimicrobiana

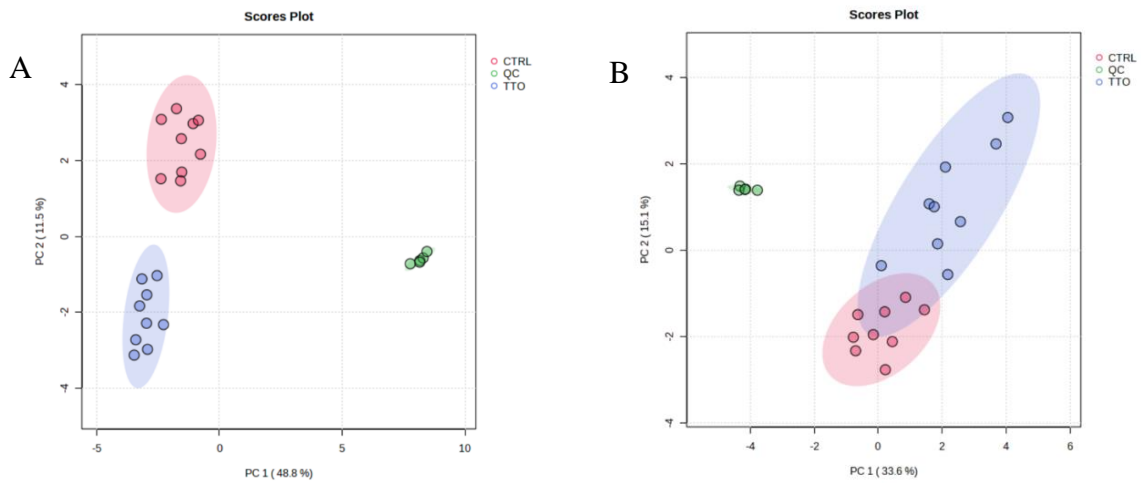
La concentración mínima inhibitoria del 50% de la población (CMI_{50}) del AE *L. origanoides* en la cual se basó este trabajo de investigación fue la determinada por la estudiante de maestría en biología Stefania Correa, que hace parte del Programa Ecosistema Científico-Colombia Científica, convocatoria Francisco José de Caldas, código RC-FP44842-212-2018. Por lo tanto, se determinó una CMI_{50} de 0,75 mg/mL, demostrando una actividad antimicrobiana contra la bacteria *S. aureus* y cuya concentración fue seleccionada para explorar el posible mecanismo de acción.

5.2. Análisis de los perfiles químicos mediante aproximación de metabolómica no dirigida

El análisis se realizó mediante metabolómica no dirigida usando UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS con análisis tanto por el modo de adquisición de iones positivos y negativos. Los cambios que se presentan en las vías metabólicas en la presencia del AE son determinados mediante análisis univariados y multivariados, proporcionando una imagen del metabolismo celular (sección 4.2.6). Para esto, la matriz obtenida al procesar los datos mediante el software online XCMS contenía 2528 características (m/z o *features*, que corresponde a la detección y extracción de posibles variables metabólicas) para el modo de adquisición de iones positivo y 2038 características para el modo de adquisición de iones negativo, a la cual posteriormente se le realizó un filtrado con el coeficiente de variación (CV) para confirmar que las alteraciones entre los perfiles metabólicos de las muestras de control y tratamiento se debe a cambios en el metabolismo celular y no a interferencias de tipo instrumental. Las características donde el CV fue igual o mayor a 30% se eliminaron, reduciendo así la matriz de datos a 1405 características en modo de adquisición de iones positivos y 1054 características en modo de adquisición de iones negativos.

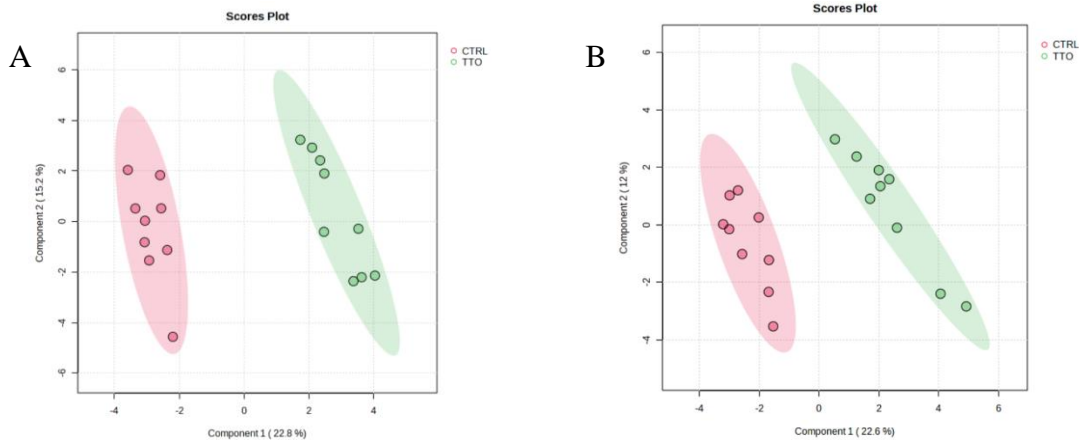
Los métodos estadísticos multivariados, desempeñan un papel importante en la comprensión de conjuntos de datos complejos que requieren el examen simultáneo de todas las variables. Proporciona medios para describir e indagar los datos debido a que rompen el aparente desorden de la información (Ruiz-Perez et al., 2020). El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) técnicas poderosas para el análisis de datos multivariantes, cada una con sus aplicaciones específicas. El análisis no supervisado PCA realizado para disminuir la dimensionalidad del conjunto de datos (Figura 4) permitió observar un patrón químico similar entre cada conjunto de muestras (QC, CTRL y TTO); así mismo, el análisis de PCA mostró una estrecha relación química entre las réplicas de control de calidad (QC) y, además, no se encontraron superpuestas con las muestras de estudio, por cuanto esto refleja una buena precisión, exactitud y consistencia del método analítico (Rivera-Pérez et al., 2021). En la figura 4A se observa el análisis de los datos para el modo de iones positivo con una varianza explicada para el componente 1 de 48.8% y para el componente 2 de 11.5%; en la figura 4B se observa el análisis de los datos para el modo de iones negativo con una varianza explicada para el componente 1 de 33.6% y para el componente 2 de 15.1% indicando que existen diferencias en la abundancia relativa de componentes químicos entre las muestras de control y tratamiento.

Figura 4. Análisis de componente principal (PCA) del conjunto de datos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS de las muestras de control (CTRL), las tratadas con el AE (TTO) y las de control de calidad (QC), A) modo de adquisición de iones positivos, B) modo de adquisición de iones negativos



Los métodos supervisados pueden revelar los factores de variabilidad más importante que caracterizan el conjunto de datos (M. Wang et al., 2017), por lo que análisis como el PLS-DA se hace necesario aplicar para este caso, con el objetivo de maximizar la covarianza. En la figura 5 se visualiza la separación del grupo de muestras control y las tratadas con el AE, mostrando que se logró un claro agrupamiento entre muestras que comparten una misma condición química y biológica, siendo la varianza de 38% y 34.6% para el modo de iones positivo y negativo, respectivamente.

Figura 5. Análisis discriminantes de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de las muestras control (CTRL) y tratamiento (TTO), A) modo de adquisición de iones positivos, B) modo de adquisición de iones negativos.

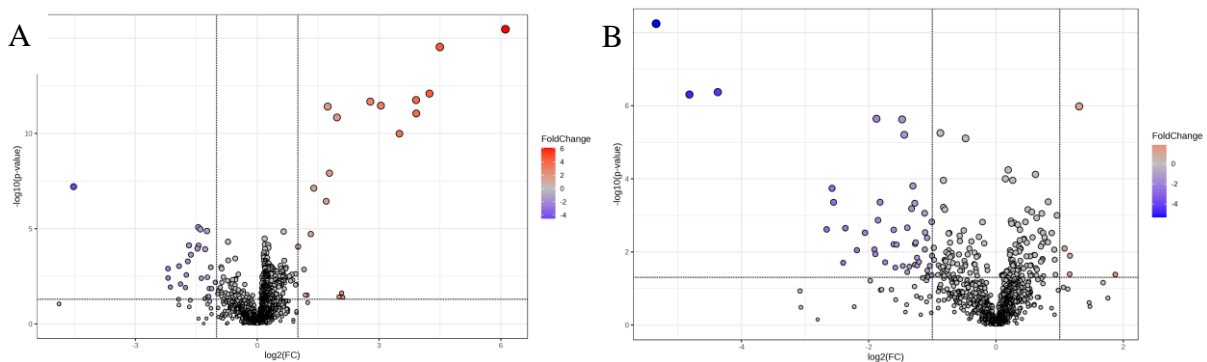


Adicionalmente, para el modelo de PLS-DA, las variables Q^2 y R^2 , para el modo de iones positivos fueron de 0.90 y 0.98 y, para el modo de iones negativos 0.76 y 0.97, respectivamente. El coeficiente Q^2 , nos proporciona información respecto a la eficacia del modelo matemático aplicado; para que el modelo pueda ser validado, el límite se debe encontrar en $Q^2 > 0.5$. El coeficiente de determinación R^2 es una medida de calidad del ajuste del modelo a los datos observados, entre más cercano esté al valor de la unidad, explica mejor la variabilidad en los datos de respuesta; por lo que se concluye que el modelo matemático generado por PLS-DA generó predicciones satisfactorias (Szymańska et al., 2012).

Los análisis univariados permiten entender mejor la distribución y ayudan a verificar que las características de relación m/z (correlacionadas con posibles variables metabólicas) identificadas como importantes en los análisis multivariados también muestran diferencias significativas cuando se analizan de forma individual. En la figura 6 se representa el gráfico de volcán (volcano plot), el cual permite relacionar la significancia estadística (*valor p*) frente a la magnitud de las veces de cambio (FC). Así, se determinó las características (m/z) que más contribuyeron a explicar las variaciones en el modelo estadístico. Con base en el PLS-DA las características para tener en cuenta fueron las que tenían un valor de coeficiente VIP mayor a 1.0

y un valor p igual o menor a 0,05, valores determinados por la prueba t de Student como estadísticamente significativos, considerando estas características (m/z) con una modulación diferenciada entre las muestras tratadas versus el control (J. Wang et al., 2024).

Figura 6. Gráfico de volcán para el conjunto de datos (tratamiento vs control) en, A) modo de adquisición de iones positivos, B) modo de adquisición de iones negativos



Nota. En cada modo de adquisición los puntos rojos representan las características (m/z) modulados positivamente, mientras en azul se encuentran los modulados negativamente en el tratamiento y en color gris aquellos cuya modulación no alcanzan los niveles de importancia estadística predefinidos.

Se observan que, para el modo de adquisición de iones positivos se encontraron 21 características (m/z) diferenciales con mayor intensidad de las señales, lo que refleja la abundancia relativa de un ion (moduladas positivamente con respecto al tratamiento), algunas de estas características corresponde a los valores de m/z 220.1695, 283.2053, 285.2209, 169.1586, y 27 características diferenciales con menor abundancia relativa (moduladas negativamente con respecto al tratamiento), entre las cuales se encuentra valores de m/z como 144.0631, 136.0618, 146.1641, 112.0508; mientras que, para el modo de adquisición de iones negativos se encontraron 5 con mayor abundancia relativa, una de las características corresponde al valor 313.2378, y 30

con menor abundancia relativa, entre los cuales están valores de m/z como 203.0197, 134.0461, 225.0984, 346.0550. El análisis de volcán nos facilita la visualización de grandes conjuntos de datos al resaltar los metabolitos de interés.

5.3. Identificación presuntiva de los metabolitos de interés

La identificación presuntiva se realizó de acuerdo con los análisis PLS-DA de las variables de importancia en la proyección (VIP), los valores m/z más significativos con valor de $VIP > 1.0$ y que alcanzaran los niveles de importancia estadística predefinidos (sección 5.2). Mediante el software CEU mass mediator se realizó la identificación de posibles candidatos a metabolitos afectados por el AE, siguiendo los pasos descritos en la sección 4.2.6. Conjuntamente, con base en la literatura se filtraron aquellos metabolitos que están reportados en microorganismos bacterianos. Posteriormente, para realizar la identificación presuntiva a nivel 2 según lo establecido por la sociedad de metabolómica, se realizó la comparación de los espectros de masas usando el programa *Xcalibur 3.0* (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) y los reportados en la literatura (Apéndices A y B). Se identificaron en total 33 metabolitos, 27 de ellos por el modo de adquisición de iones positivo (Tabla 3) y 6 metabolitos por el modo de adquisición de iones negativo (Tabla 4). Encontramos las similitudes en los metabolitos encontrados mediante PLS-DA al compararlos con los encontrados en el análisis de volcán, los valores que representan la mayor abundancia relativa con respecto al tratamiento en el modo de adquisición de iones positivos son los correspondientes a los metabolitos presuntivamente identificados como ácido 7,9-tetradecadiaminóico, 3-dehidroretinal, vitamina A2 y 2-metilisoborneol. También para los valores que representan la menor abundancia relativa con respecto al tratamiento son los correspondientes a los metabolitos presuntivamente identificados como 1,3-propanodiol, adenina, espermidina y citosina. Así mismo, para el valor que representan la mayor abundancia relativa con respecto al

tratamiento en el modo de adquisición de iones negativo corresponde al metabolito identificado como 9,10-DiHOME, y los valores que representan la menor abundancia relativa con respecto al tratamiento corresponderían a los metabolitos presuntivamente identificados como oxaloglutarato, 4-hidroxi-*L*-treonina, carnosina y adenosina 5'-monofosfato.

Tabla 3. Metabolitos identificados de forma presuntiva como modulados diferencialmente en *S. aureus* durante el tratamiento con el aceite esencial *Lippia origanoides* en el modo de adquisición de iones positivos

Metabolito identificado	Fórmula molecular	Molécula ionizada	<i>m/z</i>	Δ ppm	tr (min)	M
Ácido 7,9-Tetradecadiaminóico	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	220.1695	0.00	5.87	↑
1,3-propanodiol	C ₄ H ₁₁ NO ₃	(M+Na) ⁺	144.0631	3.47	0.85	↓
3-Dehidroretinal	C ₂₀ H ₂₆ O	(M+H) ⁺	283.2053	3.53	9.82	↑
2-Isobutoxinaftaleno	C ₁₄ H ₁₆ O	(M+H) ⁺	201.1273	3.48	8.98	↑
Glicerofosfocolina	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	(M+H) ⁺	258.1098	3.48	1.02	↓
13-Metil-4,4-bisnor-8,11,13-podocarpatrien-3-ona	C ₁₆ H ₂₀ O	(M+H) ⁺	229.1586	3.05	8.96	↑
Vitamina A2	C ₂₀ H ₂₈ O	(M+H) ⁺	285.2209	3.51	8.96	↑
2-Metilisoborneol	C ₁₁ H ₂₀ O	(M+H) ⁺	169.1586	4.13	7.50	↑
Espermidina	C ₇ H ₁₉ N ₃	(M+H) ⁺	146.1651	4.79	1.23	↓
Putrescina	C ₄ H ₁₂ N ₂	(M+H) ⁺	89.1077	2.24	1.00	↓
Glutamil-gamma-glutamato	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	274.1257	5.10	0.96	↓
2,4-dimetil-4-feniltetrahidrofurano	C ₁₂ H ₁₆ O	(M+H) ⁺	177.1274	3.39	5.67	↑
<i>N</i> -hidroxi- <i>L</i> -valina	C ₅ H ₁₁ NO ₃	(M+Na) ⁺	156.0629	4.48	1.13	↑
Ácido 12,13-epoxi-9-octadecenoico	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	(M+H) ⁺	297.2421	3.02	7.98	↑
Adenina	C ₅ H ₅ N ₅	(M+H) ⁺	136.0618	4.41	1.40	↓
sn-Glicero-3-fosfoetanolamina	C ₅ H ₁₄ NO ₆ P	(M+H) ⁺	216.0630	3.70	0.89	↓
2-Formilaminobenzaldehído	C ₈ H ₇ NO ₂	(M+H) ⁺	150.0549	4.66	2.66	↓

Ácido 10-ceto tridecanoico	C ₁₃ H ₂₄ O ₃	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	228.1956	0.44	8.70	↑
3-Metoxi- α -metil-L-tirosina	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	225.1233	0.00	3.53	↓
N-acetil-L-glutamato	C ₇ H ₁₁ NO ₅	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	189.0869	0.00	3.86	↓
5-metilcitosina	C ₅ H ₇ N ₃ O	(M+H) ⁺	126.0663	3.97	2.28	↓
L-Fenilglicina	C ₈ H ₉ NO ₂	(M+H) ⁺	152.0706	3.94	2.78	↓
Ala Glu Asn	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₇	(M+H) ⁺	333.1400	3.30	1.12	↓
Ácido α -linolénico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	(M+H) ⁺	279.2315	3.58	8.19	↑
Glicilprolilhidroxiprolina	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₅	(M+H) ⁺	286.1394	3.49	3.06	↓
Citosina	C ₄ H ₅ N ₃ O	(M+H) ⁺	112.0508	3.57	1.45	↓
N-carbamoil putrescina	C ₅ H ₁₃ N ₃ O	(M+H) ⁺	132.1131	5.29	1.17	↓

t_R: Tiempo de retención, M: modulación del metabolito en el tratamiento

Tabla 4. Metabolitos identificados presuntivamente como modulados diferencialmente en *S. aureus* durante el tratamiento con el aceite esencial *Lippia origanoides* en el modo de adquisición de iones negativos.

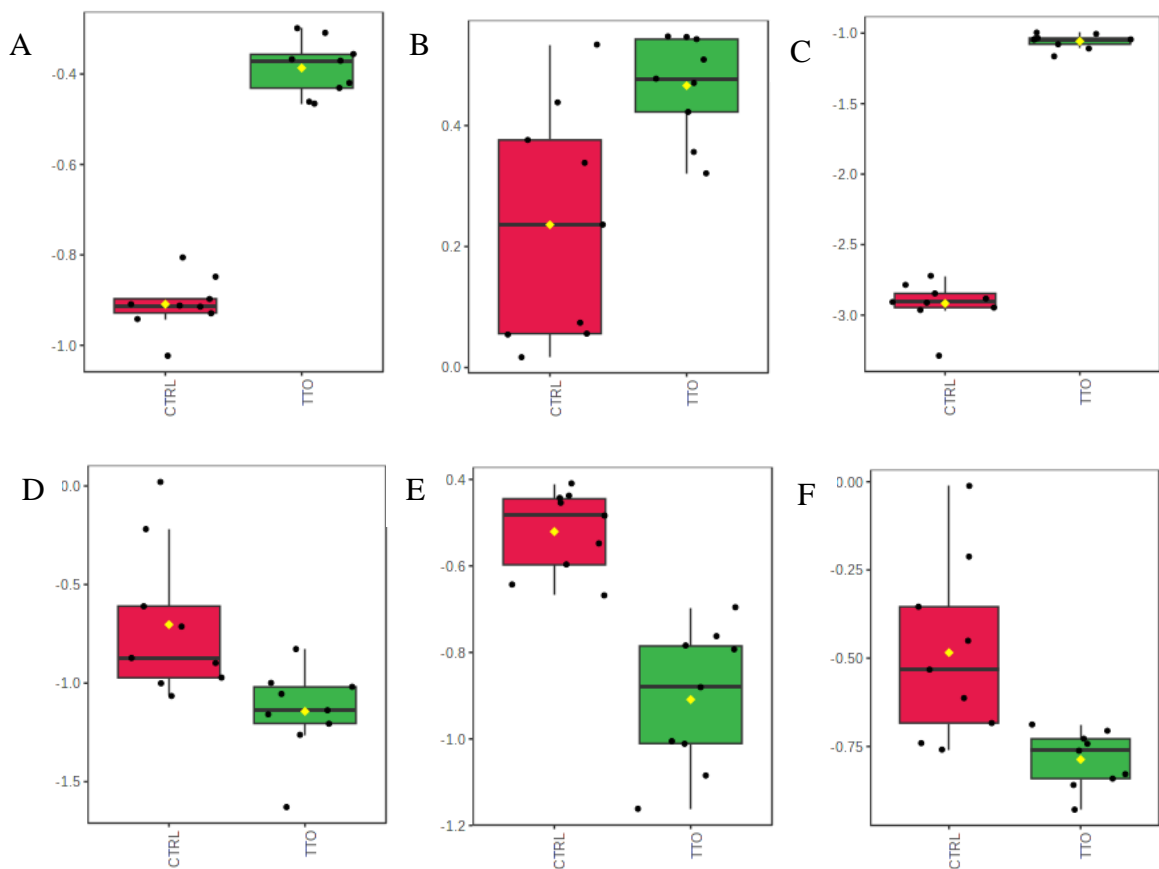
Metabolito identificado	Formula molecular	Molécula ionizada	m/z	Δ ppm	t _R (min)	M
Oxaloglutarato	C ₇ H ₈ O ₇	(M-H) ⁻	203.0197	2.95	0.87	↓
4-Hidroxi-L-treonina	C ₄ H ₉ NO ₄	(M-H) ⁻	134.0461	5.96	2.68	↓
Gly Asp Pro	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₆	(M-H) ⁻	286.1038	0.00	1.69	↓
Adenosina 5'-monofosfato (AMP)	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	(M-H) ⁻	346.0550	0.58	1.41	↓
9,10-DiHOME	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	(M-H) ⁻	313.2378	0.00	7.97	↑
Carnosina	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	(M-H) ⁻	225.0984	1.33	0.94	↓

t_R: Tiempo de retención, M: modulación del metabolito en el tratamiento

Entre el conjunto de metabolitos se identificaron 12 modulados positivamente y 21 modulados negativamente. En los diagramas de cajas y bigotes se observa la relación de la abundancia relativa de los metabolitos entre el tratamiento versus el control (Figura 7); el tratamiento con el AE permitió identificar varios metabolitos que fueron modulados de forma diferencial en el microorganismo de estudio, entre los que se encuentran la vitamina A2 (Figura 7A), el ácido α -linolénico (Figura 7B) y el ácido 7,9-tetradecadiaminóico (Figura 7C) modulados

de forma positiva (mayor abundancia relativa) mientras que, la espermidina (Figura 7D), la putrescina (Figura 7E) y la adenina (Figura 7F) fueron modulados a la baja (menor abundancia relativa).

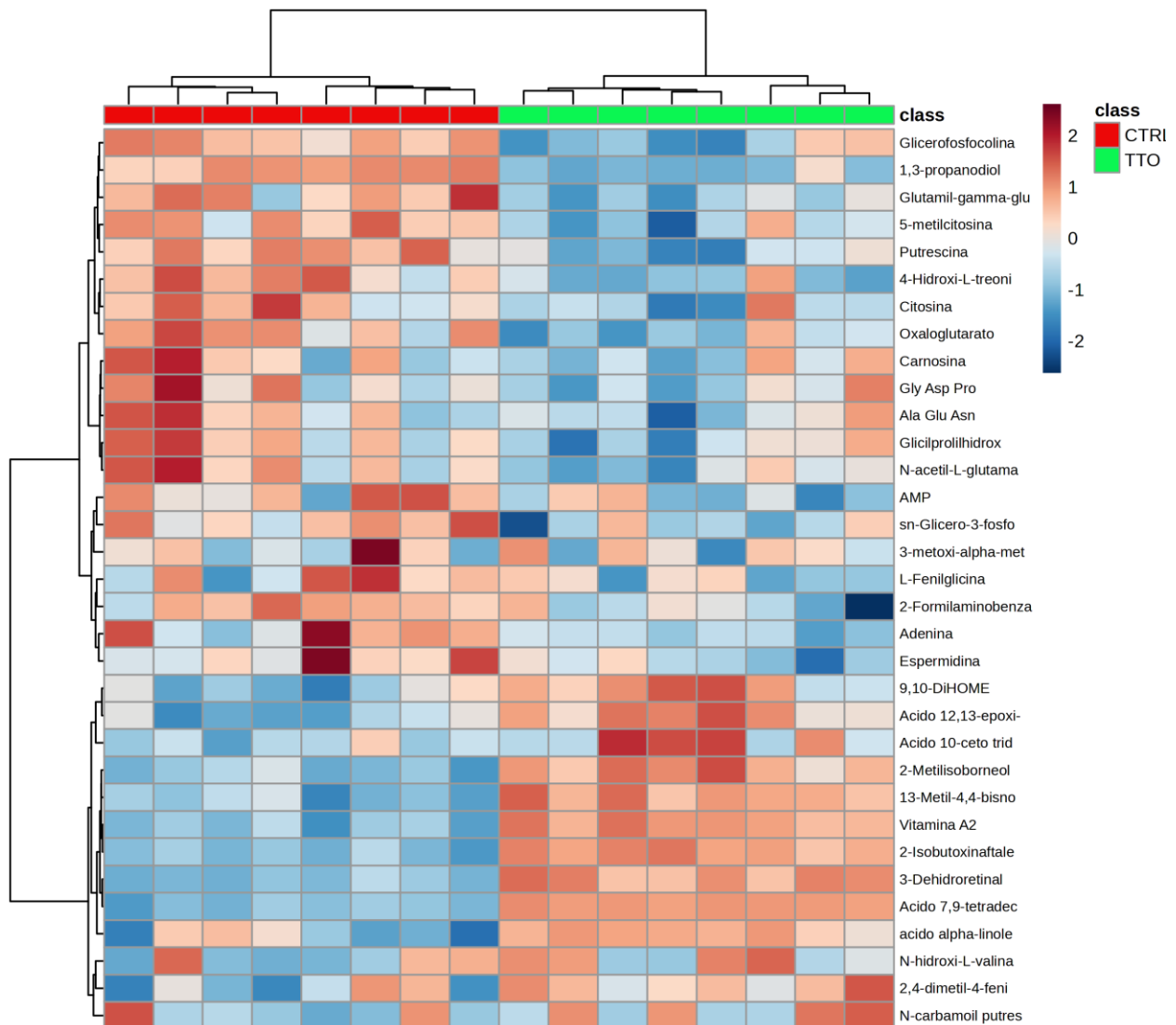
Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes para metabolitos identificados como modulados diferencialmente en *S. aureus* en el modo de adquisición de iones: (A) Vitamina A2, B) ácido α -linolénico, C) ácido 7,9-tetradecadiaminóico) positivo y (D) espermidina, E) putrescina, F) adenina) negativo.



Asi mismo, el mapa de calor es una representación visual de los metabolitos relacionados con el metabolismo de la bacteria, donde se destacan las intensidades relativas o proporción de ellos en las réplicas de dos o más conjunto de datos (Figura 8). Para realizar el mapa de calor se

combinaron en un solo listado los perfiles metabolómicos que fueron adquiridos mediante los dos modos de adquisición de iones, lo cual permitió mostrar de manera clara como fueron modulados los metabolitos al estar expuestos al AE.

Figura 8. Mapa de calor de los metabolitos más representativos afectados por el AE de *L. origanoides*.



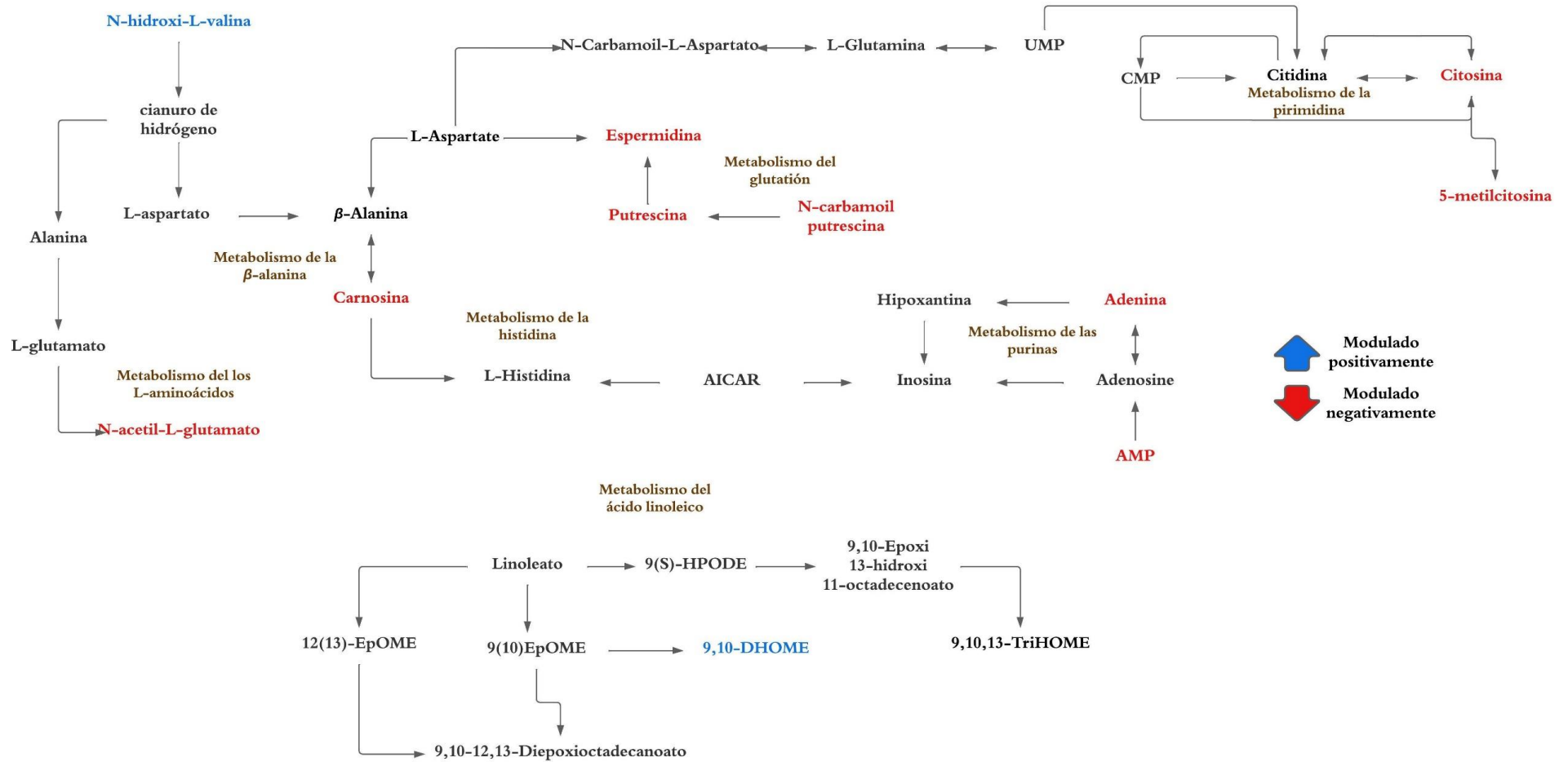
5.4. Analisis de las vias metabólicas afectadas por el efecto del AE *L. origanoides* sobre *S.aureus* en estado placntónico

A partir de los metabolitos identificados, se realizó el enriquecimiento de vías a través de la base de datos KEGG. Las vías metabólicas principalmente afectadas fueron, el metabolismo del glutatión, el metabolismo de la arginina y la prolina y el metabolismo de la β -alanina (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de las principales rutas metabólicas afectadas por el AE de *L. origanoides* sobre el microorganismo de estudio

Rutas metabólicas	Hits	Metabolitos identificados
Metabolismo de la β -alanina	2	Carnosina, espermidina
Metabolismo del glutatión	2	Putrescina, espermidina
Metabolismo de la arginina y prolina	3	Putrescina, espermidina, N-carbamoil putrescina
Metabolismo del ácido α -linoléico	1	Ácido α -linoléico
Metabolismo de la pirimidina	2	Citosina, 5-metilcitosina
Metabolismo de la histidina	1	Carnosina
Metabolismo de nucleótidos	1	Citosina
Metabolismo del retinol	1	Vitamina A2
Metabolismo de los L-aminoácidos	2	Putrescina, N-acetil-L-glutamato
Metabolismo de las purinas	2	Adenina, Adenosina 5'-monofosfato
Metabolismo del triptófano	1	2-Formilamino benzaldehído
Biosíntesis de la arginina	1	N-acetil-L-glutamato

Figura 9. Esquema general de algunas de las vías metabólicas afectadas por el AE de *L. origanoides* sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* en estado planctónico



Con la finalidad de complementar la identificación se realizó comparación de los patrones isotópicos para cada compuesto identificado de forma presuntiva, encontrando coincidencia con algunos de ellos al observar la relación con el ion molecular y su abundancia isotópica (Apéndice B). Esto nos permite tener una mayor aproximación en la identificación química.

6. Discusión

En el presente estudio, el aceite esencial de *Lippia origanoides* probado presentó actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, con base lo reportado por la estudiante de maestría en biología Stefania Correa, miembro del grupo de investigación GIBIM, como parte del proyecto Programa Ecosistema Científico-Colombia Científica, convocatoria Francisco José de Caldas, código RC-FP44842-212-2018, resultado que está en concordancia con lo reportado por otros autores respecto a la actividad biológica de este AE (Barreto et al., 2014; Gómez-Sequeda et al., 2020). La actividad antimicrobiana de los AE se encuentra determinada, en gran medida, por su composición química y esta puede verse afectada por el método de destilación, factores ambientales a los que estuvo expuesta la planta o la etapa fenológica de la planta (Usano-Alemanly et al., 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que los compuestos como el timol y el carvacrol sobresalen por sus propiedades antibacterianas (Borugă et al., 2014); sin embargo, el *p*-cimeno, presente en altas concentraciones en algunos aceites, no exhibe eficacia antibacteriana por sí solo. Por lo que, se observa una actividad más potente gracias a los efectos sinérgicos que puede generarse con los componentes químicos adicionales de la mezcla en el AE, en lugar de sus principales constituyentes (Borugă et al., 2014). Esto puede verse reflejado en distintos quimiotipos de ciertos AE, donde la actividad antimicrobiana depende de la composición, los grupos funcionales presentes en los componentes activos y sus interacciones sinérgicas (Chouhan et al., 2017).

Gracias a los estudios previos realizados en el grupo de investigación GIBIM se determinó, que la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI₅₀) del AE sobre *S. aureus* fue de 0,75 mg/ml. Con base en la caracterización química del aceite esencial (el cual fue realizado por el CENIVAM), el AE está compuesto por: timol (71,7%), *p*-cimeno (19,1%), carvacrol (4,4%), β -mirceno (2.1%), γ -terpineno (2.0%), óxido de cariofileno (1.6%), éter metílico de timol (0.9%), trans- β - cariofileno (0.9%), epóxido de humuleno II (0.7%), y terpinen-4-ol (0.7%). Esto permite catalogar al AE de *L. origanoides* como quimiotipo timol.

Se ha demostrado que los componentes principales, como el timol y el carvacrol, son potentes agentes antibacterianos contra una amplia gama de bacterias, entre las cuales se encuentra *S. aureus* (Rúa et al., 2019). Uno de los mecanismos más frecuentes reportados en el que reducen el crecimiento estos compuestos isoméricos se atribuye a la ruptura de la membrana celular bacteriana que conduce a la fuga del contenido intracelular resultando en la muerte (Kachur & Suntres, 2020). Debido a la naturaleza hidrofóbica, estos compuestos tienen la capacidad de integrarse en las membranas, causando interrupciones y perturbaciones en el normal funcionamiento de la membrana, lo que conduce a un aumento de la permeabilidad de la moneda energética ATP y a una mayor liberación de otros componentes celulares (Walsh et al., 2003). Sin embargo, la sinergia de los distintos componentes de un AE ha demostrado mayor impacto en la bioactividad, dándole importancia a los compuestos que se encuentran en una menor proporción, dependiendo de cada AE. La mayoría de los estudios coinciden en que los AE son ligeramente más activos contra bacterias grampositivas que contra gramnegativas (Burt, 2004), esto debido a que las bacterias gramnegativas presentan una membrana externa rígida, rica en lipopolisacáridos y más compleja lo que limita la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de ella. Sin embargo, en las bacterias gram positivas, esta membrana compleja no está presente, en cambio, están

rodeadas por una gruesa pared de peptidoglicano, pero no lo suficientemente densa para resistir pequeñas moléculas antimicrobianas, además, posee extremos lipofílicos del ácido lipoteicoico. Este ácido es un componente importante en la pared celular de las bacterias gram positivas, consisten en una estructura anfipática, es decir que tienen una parte hidrofílica y otra lipofílica, los extremos lipofílicos se incrustan en la membrana plasmática de la bacteria. Así, los componentes lipofílicos de los AE, como el timol y el carvacrol, son atraídos por los extremos lipofílicos del ácido lipoteicoico facilitando la asociación inicial con la superficie de la bacteria, una vez anclados estos componentes interactúan con la bicapa lipídica de la membrana celular. Dado que la membrana es rica en lípidos, los componentes lipofílicos pueden insertarse fácilmente en ella (Chouhan et al., 2017).

La membrana celular de las bacterias organiza los intercambios entre el medio intracelular y extracelular, produciendo un entorno intracelular adecuado para los procesos necesarios en la supervivencia, convirtiéndose en una barrera de permeabilidad selectiva (Bouyahya et al., 2019). El AE cambia la permeabilidad de la membrana, lo que lleva a la pérdida de contenido intracelular vital como los azúcares reductores, proteínas, ATP y ADN, al tiempo que inhibe la generación de energía y de enzimas, conduciendo a la fuga de iones y la posterior destrucción de la célula (Chouhan et al., 2017). Por lo general, la mayoría de AE contienen un alto porcentaje de compuesto fenólicos como el timol y el carvacrol, por lo que se esperaría que su mecanismo de acción sea similar al de otros fenólicos, como la alteración de la membrana citoplasmática, lo que altera la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación celular (Burt, 2004).

Aunque las propiedades antimicrobianas del AE ya han sido bastante estudiadas, el mecanismo de acción no se ha estudiado con gran detalle. La metabolómica ha permitido la

identificación y cuantificación de metabolitos, proporcionando una herramienta para estudiar los cambios metabólicos que ocurren en un sistema biológico a causa del efecto de moléculas bioactivas de origen vegetal (J. Chen et al., 2020). Gracias a la metabolómica, este estudio ha podido encontrar variaciones en las rutas implicadas principalmente con el metabolismo de aminoácidos como: El metabolismo de la β -alanina, metabolismo de la arginina y prolina, metabolismo de los D-aminoácidos, entre otros.

El metabolismo de los aminoácidos es fundamental para la supervivencia de la bacteria, ya que proporciona la base de construcción necesaria para la síntesis de proteínas, fuentes de energía y moléculas precursoras para diversas vías metabólicas. Adicionalmente, se ha demostrado que la regulación dependiente de aminoácidos es requerida para la resistencia a los antibióticos (Somerville & Proctor, 2009). El metabolismo de la prolina tiene funciones complejas en una amplia gama de procesos biológicos, incluida la señalización celular, la protección contra el estrés, la producción de energía y también tiene funciones en la osmorregulación en bacterias como *S. aureus*. Los principales mecanismos por los que la prolina proporciona beneficios protectores son a través de la acumulación de prolina y su metabolismo oxidativo. Los resultados muestran esta ruta modulada negativamente en el tratamiento lo que demuestra que no hubo una acumulación de prolina para ayudar a tolerar los periodos de estrés osmótico y brindar beneficios protectores al microorganismo (Christgen & Becker, 2019). Rutas como la biosíntesis de la arginina, donde se encuentra modulado negativamente en el tratamiento, muestran poco crecimiento del microorganismo ya que estudios anteriores han concluido que *S.aureus* necesita entre 3 y 12 aminoácidos, siendo la prolina, la arginina, la valina y la cisteína los aminoácidos más frecuentes (Somerville & Proctor, 2009).

Además, el metabolismo del glutatión, modulado negativamente durante el tratamiento con el AE, muestra que su aporte frente al estrés oxidativo bacteriano está deficiente (Guillín et al., 2023), ya que es esencial para la supervivencia y adaptación de *S. aureus*. Uno de los papeles del glutatión es actuar como protector de los organismos de la toxicidad oxidativa al funcionar como reserva de cisteína (Sochor et al., 2011). El metabolismo de la β -alanina en *S. aureus* está estrechamente relacionado con la modificación de los ácidos teicoicos, los cuales desempeñan un papel importante en la protección de la pared celular bacteriana. Así mismo, se ha demostrado que el recambio de los sustituyentes D-alanilo del ácido lipoteicoico y el ácido teicoico, que implican el metabolismo de la β -alanina, afecta a la colonización de dispositivos o directamente a la formación de *biopelículas*, por ende, afecta su patogenicidad (Gross et al., 2001). Metabolitos como la carnosina y la espermidina fueron modulados negativamente, los cuales están relacionados en las biosíntesis de pantotenato, precursor metabólico de la coenzima A, un cofactor indispensable para muchos procesos celulares, como la biosíntesis de ácidos grasos (Khanppnavar et al., 2019). Además, el pantotenato regula la síntesis de glutatión, metabolito que reduce la apoptosis y evita la destrucción celular (He et al., 2022). El aminoácido histidina se encuentra entre los más costosos energéticamente para que las bacterias lo sinteticen (Lonergan et al., 2020). La histidina se deriva del 5'-fosforribosil-1-pirofosfato, que también sirve como precursor de otras vías, como lo es el metabolismo de las purinas. Por lo tanto, al estar la carnosina modulada negativamente en el tratamiento, se interrumpe el metabolismo de la histidina, el cual se trata de un aminoácido vinculado a funciones catalíticas (Cervantes de la Cruz et al., 2017).

La mayoría de los organismos requieren las síntesis o adquisición de purinas y pirimidinas, que forman la base de los nucleótidos para sobrevivir. En las bacterias, los nucleótidos se utilizan en muchas funciones celulares, como el almacenamiento de energía, la replicación del ADN y

como moléculas de señalización (Goncheva et al., 2022). Las purinas desempeñan un papel integral en los procesos celulares, como la señalización celular, el metabolismo energético y la codificación de la composición genética (Chua & Fraser, 2020). Se identificaron metabolitos alterados como la adenina y AMP modulados negativamente, evidenciando cambios en la síntesis de *novoo* de adenina a partir del precursor AMP; esta disminución podría afectar la producción de ATP, una molécula fundamental para llevar a cabo la mayoría de los procesos energéticos celulares, entre los que se encuentra la adhesión inicial del *biofilm* (Guillín et al., 2023). La biosíntesis de *novoo* de pirimidina produce nucleótidos de timina, uracilo y citosina, que se modifican y utilizan para la replicación del ADN y ARN (Goncheva et al., 2022), donde se encontró al metabolito citosina en bajas proporciones comparado con las muestras control.

La putresina es esencial para la motilidad celular bacteriana a través de la regulación de la quimiotaxis bacteriana y la biogénesis flagelar, ya que el movimiento bacteriano es guiado e impulsado por estas (Shi et al., 2019). Sin embargo, en el estudio, este metabolito se encuentra modulado negativamente, por cuanto se infiere que el proceso de movilidad bacteriano se encuentra afectado. El metabolismo del glutatión se encarga de la protección contra el estrés abiótico, como alta salinidad, radiación, desecación o presencia de metales pesados (Matthews et al., 2023), protege a las células al reducir el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y estabilizar las proteínas y las membranas (Smirnova & Oktyabrsky, 2005), puesto que los metabolitos putrescina y espermidina se determinaron influenciados a la baja durante el tratamiento, impiden que este metabolismo actúe adecuadamente, lo que puede ocasionar que la bacteria no reaccione contra el estrés que causan la entrada de los compuestos del AE.

Los productos de origen vegetal aún se encuentran en estudio, sin embargo, el futuro de estos es muy prometedor (Barreto et al., 2014; Bouyahya et al., 2019; Guillín et al., 2021; Hou et

al., 2022). Gracias a estudios como estos por medio de la metabolómica podemos mejorar en la comprensión del posible mecanismo antibacteriano por el cual un aceite esencial ejerce su actividad biológica sobre un microorganismo para que los aceites sean una opción natural prometedora a los antibióticos convencionales. El presente estudio permitió identificar posibles rutas metabólicas afectadas por el aceite esencial como lo son, el metabolismo del glutatión, el metabolismo de la prolina y la arginina, rutas necesarias para la supervivencia del patógeno. Sin embargo, es necesario confirmar los resultados aquí mostrados a través de análisis confirmatorios de las moléculas identificadas, así como también, una correlación directa con los análisis enzimáticos de interés para complementar en el estudio. No obstante, lo aquí expuesto nos permite resaltar el potencial de las ciencias ómicas como herramientas muy útiles para este tipo de investigaciones.

7. Conclusiones

El AE de *L. origanoides* quimiotipo timol mostró actividad antimicrobiana contra la cepa de *S. aureus* ATCC 43300. Los análisis por metabolómica no dirigida permitieron identificar alteraciones en el metabolismo de la bacteria principalmente en los asociados con el metabolismo de los aminoácidos, los cuales son los principales encargados de la supervivencia de la bacteria, así como de las síntesis de proteínas necesarias para la mayoría del trabajo en una célula, y como fuentes de energía. Adicionalmente, se encontraron alteraciones en el metabolismo de las purinas y pirimidinas con los metabolitos correspondiente modulados negativamente. Estos resultados nos proporcionan una aproximación de las posibles dianas celulares por los cuales ejerce actividad biológica los componentes del AE de *L. origanoides* sobre *S. aureus* en estado planctónico y

promueven la investigación de posibles agentes antimicrobianos para contrarrestar el desarrollo de bacterias resistentes a múltiples fármacos.

8. Recomendaciones

Debido a que en la presente investigación la identificación química de los metabolitos es presuntiva, a nivel 2 según lo establecido por la sociedad de metabolómica, es recomendable que en futuras investigaciones se busque llegar a una identificación confirmatoria. Para ello, sería recomendable realizar análisis MS/MS o utilizar patrones de referencia para confirmar los metabolitos identificados en la presente tesis, así mismo, nanoemulsiones del AE para evaluar si esta nanotecnología funciona como mecanismo para estabilidad del AE y además evaluar si existe algún efecto diferente en el metabolismo.

También, para confirmar las vías metabólicas afectadas en el tratamiento con el aceite esencial se podrían realizar ensayos enzimáticos con las bacterias (Tomoda, 2016), por ejemplo, se pueden identificar las enzimas claves en la biosíntesis de aminoácidos que se sospechan podrían estar afectadas por el AE (como glutamato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa) y el comparar la actividad enzimática entre el grupo tratado con el AE y el grupo control, determinando si efectivamente esta ruta muestra una alteración significativa en la actividad enzimática (Judge & Dodd, 2020).

Referencias Bibliográficas

- Agrimonti, C., White, J. C., Tonetti, S., & Marmiroli, N. (2019). Antimicrobial activity of cellulosic pads amended with emulsions of essential oils of oregano, thyme and cinnamon against microorganisms in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108246. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108246>
- Alarcon-Barrera, J. C., Kostidis, S., Ondo-Mendez, A., & Giera, M. (2022). Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. *Drug Discovery Today*, 27(6), 1763–1773. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2022.02.018>
- Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(MAR). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2015.00023>
- Alvarez, C. A., Yomayusa, N., Leal, A. L., Moreno, J., Mendez-Alvarez, S., Ibañez, M., & Vanegas, N. (2010). Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *American Journal of Infection Control*, 38(4), 315–318. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2009.05.013>
- Artini, M., Papa, R., Barbato, G., Scoarughi, G. L., Cellini, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., & Selan, L. (2012). Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(2), 920–926. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2011.11.052>
- Aziz, P., Muhammad, N., Intisar, A., Abid, M. A., Din, M. I., Yaseen, M., Kousar, R., Aamir, A., Quratulain, & Ejaz, R. (2020). Constituents and antibacterial activity of leaf essential oil of *Plectranthus scutellarioides*. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1837279>, 155(6), 1247–1252. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1837279>

- Bachir, R. G., & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 739. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60220-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60220-2)
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722–734. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.04.052>
- Barreto, H. M., de Lima, I. S., Coelho, K. M. R. N., Osório, L. R., de Almeida Mourão, R., Santos, B. H. C. dos, Coutinho, H. D. M., de Abreu, A. P. L., de Medeiros, M. das G. F., Citó, A. M. das G. L., & Lopes, J. A. D. (2014). Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Integrative Medicine*, 6(5), 560–564. <https://doi.org/10.1016/J.EUJIM.2014.03.011>
- Barupal, D. K., & Fiehn, O. (2019). Generating the Blood Exposome Database Using a Comprehensive Text Mining and Database Fusion Approach. *Environmental Health Perspectives*, 127(9). <https://doi.org/10.1289/EHP4713>
- Bejder, J., Gürdeniz, G., Cuparencu, C., Hall, F., Gybel-Brask, M., Breenfeldt Andersen, A., Dragsted, L. O., Secher, N. H., Johansson, P. I., & Nordsborg, N. B. (2021). An Untargeted Urine Metabolomics Approach for Autologous Blood Transfusion Detection. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 53(1), 236–243. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002442>
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Golet, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7(Spec Iss 3), 56. [/pmc/articles/PMC4391421/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24391421/)

- Bouyahya, A., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5), 301. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2019.03.001>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9040147>
- Cannataro, M., Guzzi, P. H., Agapito, G., Zucco, C., & Milano, M. (2022). Omics sciences. *Artificial Intelligence in Bioinformatics*, 105–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822952-1.00020-6>
- Cervantes de la Cruz, K., Mejía-Luna, I., Villanueva Pineda, D. O., Colín-García, M., Heredia, A., Cervantes de la Cruz, K., Mejía-Luna, I., Villanueva Pineda, D. O., Colín-García, M., & Heredia, A. (2017). LA HISTIDINA COMO UN POSIBLE PRECURSOR EN EL ORIGEN DE LA VIDA. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de La Vida*, 26(2), 6–14. <https://doi.org/10.17163/LGR.N26.2017.01>
- Chen, J., Tang, C., Zhang, R., Ye, S., Zhao, Z., Huang, Y., Xu, X., Lan, W., & Yang, D. (2020). Metabolomics analysis to evaluate the antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112652. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112652>

- Chen, L., Zhao, X., Li, R., & Yang, H. (2022). Integrated metabolomics and transcriptomics reveal the adaptive responses of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to thyme and cinnamon oils. *Food Research International*, *157*, 111241. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111241>
- Chen, Y., Li, E. M., & Xu, L. Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/METABO12040357>
- Chong, J., & Xia, J. (2020). Using MetaboAnalyst 4.0 for Metabolomics Data Analysis, Interpretation, and Integration with Other Omics Data. *Methods in Molecular Biology*, *2104*, 337–360. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_17
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils— Present Status and Future Perspectives. *Medicines 2017*, Vol. 4, Page 58, *4*(3), 58. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES4030058>
- Christgen, S. L., & Becker, D. F. (2019). Role of Proline in Pathogen and Host Interactions. *Antioxidants & Redox Signaling*, *30*(4), 683. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7335>
- Chua, S. M. H., & Fraser, J. A. (2020). Surveying purine biosynthesis across the domains of life unveils promising drug targets in pathogens. *Immunology and Cell Biology*, *98*(10), 819–831. <https://doi.org/10.1111/IMCB.12389>
- CLSI. (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. www.clsi.org.
- de Jonge, N. F., Louwen, J. J. R., Chekmeneva, E., Camuzeaux, S., Vermeir, F. J., Jansen, R. S., Huber, F., & van der Hooft, J. J. J. (2023). MS2Query: reliable and scalable MS2 mass spectra-based analogue search. *Nature Communications*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-023-37446-4>

- Djombou-Feunang, Y., Pon, A., Karu, N., Zheng, J., Li, C., Arndt, D., Gautam, M., Allen, F., & Wishart, D. S. (2019). CFM-ID 3.0: Significantly Improved ESI-MS/MS Prediction and Compound Identification. *Metabolites*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/METABO9040072>
- Elhaik, E. (2022). Principal Component Analyses (PCA)-based findings in population genetic studies are highly biased and must be reevaluated. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14395-4>
- FakhriRavari, A., Simiyu, B., Morrisette, T., Dayo, Y., & Abdul-Mutakabbir, J. C. (2022). Infectious disease: how to manage Gram-positive and Gram-negative pathogen conundrums with dual beta-lactam therapy. *Drugs in Context*, 11. <https://doi.org/10.7573/DIC.2021-8-9>
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel ... [et Al.]*, 114, 30.4.1. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB3004S114>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:9, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foster, T. J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:12, 3(12), 948–958. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1289>
- Freitas, P. R., de Araújo, A. C. J., dos Santos Barbosa, C. R., Muniz, D. F., Rocha, J. E., de Araújo Neto, J. B., da Silva, M. M. C., Silva Pereira, R. L., da Silva, L. E., do Amaral, W., Deschamps, C., Relison Tintino, S., Ribeiro-Filho, J., & Coutinho, H. D. M. (2020). Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. *Microbial Pathogenesis*, 145, 104223. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104223>

- Gentile, M., Centonza, A., Lovero, D., Palmirotta, R., Porta, C., Silvestris, F., & D'Oronzo, S. (2021). Application of “omics” sciences to the prediction of bone metastases from breast cancer: State of the art. *Journal of Bone Oncology*, 26, 100337. <https://doi.org/10.1016/J.JBO.2020.100337>
- Gil-De-La-Fuente, A., Godzien, J., Saugar, S., Garcia-Carmona, R., Badran, H., Wishart, D. S., Barbas, C., & Otero, A. (2019). CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 797–802. https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.8B00720/ASSET/IMAGES/LARGE/PR-2018-00720X_0002.JPEG
- Gómez-Sequeda, N., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against Escherichia coli O157:H7 and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Antibiotics*, 9(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9110730>
- Goncheva, M. I., Chin, D., & Heinrichs, D. E. (2022). Nucleotide biosynthesis: the base of bacterial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 30(8), 793–804. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.12.007>
- Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C. H., Kurczy, M. E., Benton, H. P., Rinehart, D., Nguyen, T., Ray, J., Kuehl, J., Arevalo, B., Westenskow, P. D., Wang, J., Arkin, A. P., Deutschbauer, A. M., Patti, G. J., & Siuzdak, G. (2014). Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses. *Analytical Chemistry*, 86(14), 6931. <https://doi.org/10.1021/AC500734C>
- Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F., & Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in Staphylococcus aureus colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity*, 69(5),

3423–3426. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001/ASSET/10109E69-6057-47B9-BBED-64B40E03CF10/ASSETS/GRAPHIC/II0511570004.JPEG>

Guillín, Y., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2023). Untargeted Metabolomics for Unraveling the Metabolic Changes in Planktonic and Sessile Cells of *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 after Treatment with *Lippia organoides* Essential Oil. *Antibiotics*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12050899/S1>

Guillín, Y., Cáceres, M., Torres, R., Stashenko, E., & Ortiz, C. (2021). Effect of Essential Oils on the Inhibition of Biofilm and Quorum Sensing in *Salmonella enteritidis* 13076 and *Salmonella typhimurium* 14028. *Antibiotics*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10101191>

Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX010>

Hao, Y., Kang, J., Yang, R., Li, H., Cui, H., Bai, H., Tsitsilin, A., Li, J., & Shi, L. (2022). Multidimensional exploration of essential oils generated via eight oregano cultivars: Compositions, chemodiversities, and antibacterial capacities. *Food Chemistry*, *374*, 131629. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131629>

He, R., Chen, W., Chen, H., Zhong, Q., Zhang, H., Zhang, M., & Chen, W. (2022). Antibacterial mechanism of linalool against *L. monocytogenes*, a metabolomic study. *Food Control*, *132*, 108533. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108533>

Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*, *47*, 101716. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101716>

- Hu, W., Li, C., Dai, J., Cui, H., & Lin, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of Litsea cubeba essential oil against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Industrial Crops and Products*, *130*, 34–41. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.12.078>
- Huang, Z., Yuan, Y., Tan, Z., Zheng, J., Zhang, W., Huang, S., Wang, Y., Chen, M., Zhang, L., & Li, H. (2023). Metabolomics in combination with network pharmacology reveals the potential anti-neuroinflammatory mechanism of essential oils from four Curcuma species. *Industrial Crops and Products*, *195*, 116411. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2023.116411>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, *81*(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/J.JCMA.2017.07.012>
- Jaumot, J., & Bedia, C. (2021). Introduction to Data Analysis in Omics Sciences. *Comprehensive Foodomics*, 226–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22901-6>
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2016* *17*:7, *17*(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays in Biochemistry*, *64*(4), 607. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(18), 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 27. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.27>

- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., & Lewis, K. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00856-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00856-5)
- Khanppnavar, B., Chatterjee, R., Choudhury, G. B., & Datta, S. (2019). Genome-wide survey and crystallographic analysis suggests a role for both horizontal gene transfer and duplication in pantothenate biosynthesis pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(10), 1547–1559. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2019.05.017>
- Kristian, S. A., Golda, T., Ferracin, F., Cramton, S. E., Neumeister, B., Peschel, A., Götz, F., & Landmann, R. (2004). The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. *Microbial Pathogenesis*, 36(5), 237–245. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2003.12.004>
- Li, J., Li, C., Shi, C., Aliakbarlu, J., Cui, H., & Lin, L. (2022). Antibacterial mechanisms of clove essential oil against *Staphylococcus aureus* and its application in pork. *International Journal of Food Microbiology*, 380, 109864. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109864>
- Liang, J., Zhang, Y., Chi, P., Liu, H., Jing, Z., Cao, H., Du, Y., Zhao, Y., Qin, X., Zhang, W., & Kong, D. (2023). Essential oils: Chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy - A review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 6, 100210. <https://doi.org/10.1016/J.PRMCM.2022.100210>
- Lin, H. J., Lin, Y. L., Huang, B. Bin, Lin, Y. T., Li, H. K., Lu, W. J., Lin, T. C., Tsui, Y. C., & Lin, H. T. V. (2022). Solid- and vapour-phase antifungal activities of six essential oils and their applications in postharvest fungal control of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *LWT*, 156, 113031. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.113031>

- Liu, Y., Mrzic, A., Meysman, P., de Vijlder, T., Romijn, E. P., Valkenburg, D., Bittremieux, W., & Laukens, K. (2020). MESSAR: Automated recommendation of metabolite substructures from tandem mass spectra. *PLoS ONE*, *15*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0226770>
- Loftus, M. J., Young-Sharma, T. E. M. W., Wati, S., Badoordeen, G. Z., Blakeway, L. v., Byers, S. M. H., Cheng, A. C., Jenney, A. W. J., Naidu, R., Prasad, A., Prasad, V., Tudravu, L., Vakatawa, T., van Gorp, E., Wisniewski, J. A., Rafai, E., Stewardson, A. J., & Peleg, A. Y. (2022). Epidemiology, antimicrobial resistance and outcomes of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a tertiary hospital in Fiji: A prospective cohort study. *The Lancet Regional Health - Western Pacific*, *22*, 100438. <https://doi.org/10.1016/J.LANWPC.2022.100438>
- Lonergan, Z. R., Palmer, L. D., & Skaar, E. P. (2020). Histidine Utilization Is a Critical Determinant of *Acinetobacter* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, *88*(7). <https://doi.org/10.1128/IAI.00118-20>
- Ma, M., Zhao, J., Zeng, Z., Yu, P., Xia, J., Wan, D., Yan, X., & Gong, D. (2023). Deciphering the antibacterial mechanism of monocaprin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by integrated transcriptomic and metabolomic analyses and its application in pork preservation. *LWT*, *177*, 114569. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114569>
- Mamani-Huanca, M., de la Fuente, A. G., Otero, A., Gradillas, A., Godzien, J., Barbas, C., & López-González, Á. (2021). Enhancing confidence of metabolite annotation in Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry untargeted metabolomics with relative migration time and in-source fragmentation. *Journal of Chromatography A*, *1635*, 461758. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461758>

- Maree, M., Thi Nguyen, L. T., Ohniwa, R. L., Higashide, M., Msadek, T., & Morikawa, K. (2022). Natural transformation allows transfer of SCCmec-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/S41467-022-29877-2>
- Matthews, J. L., Khalil, A., Siboni, N., Bougoure, J., Guagliardo, P., Kuzhiumparambil, U., DeMaere, M., Le Reun, N. M., Seymour, J. R., Suggett, D. J., & Raina, J. B. (2023). Coral endosymbiont growth is enhanced by metabolic interactions with bacteria. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/S41467-023-42663-Y>
- Meenu, M., Padhan, B., Patel, M., Patel, R., & Xu, B. (2023). Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against *Salmonella* and *Listeria* spp. *Food Chemistry*, 404, 134723. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134723>
- Munda, S., Pandey, S. K., Dutta, S., Baruah, J., & Lal, M. (2019). Antioxidant Activity, Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oil of *Artemisia vulgaris* L. Leaves from Northeast India. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1602083>, 22(2), 368–379. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1602083>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- National Human Genome Research Institute. (2022). *Bacteria*. NIH. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Bacteria>

- OMS. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antibióticos. *Organización Mundial de La Salud*, 30. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763>
- OMS. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Pamplona Pagnossa, J., Rocchetti, G., Bezerra, J. D. P., Batiha, G. E. S., El-Masry, E. A., Mahmoud, M. H., Alsayegh, A. A., Mashraqi, A., Cocconcelli, P. S., Santos, C., Lucini, L., & Hilsdorf Piccoli, R. (2022). Untargeted Metabolomics Approach of Cross-Adaptation in Salmonella Enterica Induced by Major Compounds of Essential Oils. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1314. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.769110/BIBTEX>
- Pérez, N., Pavas, N., & Isabel Rodríguez, E. (2010). Resistencia de Staphylococcus aureus a los antibióticos en un hospital de la orinoquia colombiana. *Infectio*, 14(3), 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70108-9](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70108-9)
- Rempe, C. S., Lenaghan, S. C., Burris, K. P., & Stewart, C. N. (2017). Metabolomic analysis of the mechanism of action of yerba mate aqueous extract on Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Metabolomics*, 13(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11306-016-1159-6/FIGURES/5>
- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., & Götz, F. (2005). Differential Gene Expression Profiling of Staphylococcus aureus Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2663. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005>
- Rivera-Pérez, A., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2021). Application of an innovative metabolomics approach to discriminate geographical origin and processing of

- black pepper by untargeted UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS analysis and mid-level data fusion. *Food Research International*, 150, 110722. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110722>
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- Rúa, J., Del Valle, P., De Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., & García-Armesto, M. R. (2019). Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Https://Home.Liebertpub.Com/Fpd*, 16(9), 622–629. <https://doi.org/10.1089/FPD.2018.2594>
- Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12859-019-3310-7/FIGURES/6>
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 84(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>
- Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., & McLean, J. A. (2016). Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(12), 1897. <https://doi.org/10.1007/S13361-016-1469-Y>
- Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. Vander, & Eeckhaut, A. Van. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Https://Doi.Org/10.4155/Bio-2019-0014*, 11(24), 2297–2318. <https://doi.org/10.4155/BIO-2019-0014>

- Shi, Z., Wang, Q., Li, Y., Liang, Z., Xu, L., Zhou, J., Cui, Z., & Zhang, L. H. (2019). Putrescine is an intraspecies and interkingdom cell-cell communication signal modulating the virulence of *Dickeya zeae*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG), 1950. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01950/FULL>
- Sieniawska, E., & Georgiev, M. I. (2022). Metabolomics: towards acceleration of antibacterial plant-based leads discovery. *Phytochemistry Reviews*, *21*(3), 765–781. <https://doi.org/10.1007/S11101-021-09762-4/FIGURES/3>
- Sieniawska, E., Sawicki, R., Golus, J., & Georgiev, M. I. (2020). Untargetted Metabolomic Exploration of the Mycobacterium tuberculosis Stress Response to Cinnamon Essential Oil. *Biomolecules*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/BIOM10030357>
- Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., & Trentin, D. S. (2016). Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chemical Reviews*, *116*(16), 9162–9236. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.6B00184/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2016-001847_0013.JPEG
- Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2009). Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. *Journal of Medical Microbiology*, *58*(8), 1067–1073. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.009720-0/CITE/REFWORKS>
- Skaar, E. P., & Schneewind, O. (2004). Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes and Infection*, *6*(4), 390–397. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2003.12.008>
- Smirnova, G. V., & Oktyabrsky, O. N. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochemistry. Biokhimiia*, *70*(11), 1199–1211. <https://doi.org/10.1007/S10541-005-0248-3>

- Sochor, J., Zitka, O., Hynek, D., Jilkova, E., Krejcová, L., Trnkova, L., Adam, V., Hubalek, J., Kynicky, J., Vrba, R., & Kizek, R. (2011). Bio-Sensing of Cadmium(II) Ions Using *Staphylococcus aureus*. *Sensors 2011, Vol. 11, Pages 10638-10663*, 11(11), 10638–10663. <https://doi.org/10.3390/S111110638>
- Sollid, J. U. E., Furberg, A. S., Hanssen, A. M., & Johannessen, M. (2014). *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 531–541. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2013.03.020>
- Somerville, G. A., & Proctor, R. A. (2009). At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in *Staphylococci*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 73(2), 233. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-09>
- Stashenko, E. (2009). Aceites esenciales. *Universidad de Antioquia*, 180. <https://docplayer.es/17085233-Aceites-esenciales-primera-edicion-octubre-2009-isbn-978-958-44-5944-2-autor-elena-e-stashenko.html>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103. <https://doi.org/10.1002/JSSC.200900452>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/S11306-011-0330-3/FIGURES/6>
- Tang, C., Chen, J., Zhou, Y., Ding, P., He, G., Zhang, L., Zhao, Z., & Yang, D. (2021). Exploring antimicrobial mechanism of essential oil of *Amomum villosum* Lour through metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry in methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus. *Microbiological Research*, 242, 126608.
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2020.126608>

Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103580. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.103580>

The Center for Disease Dynamics. (2022). *ResistanceMap - Antibiotic Resistance*.
<https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>

Theodoridis, G. A., Gika, H. G., & Wilson, I. D. (2013). LC-MS-Based Nontargeted Metabolomics. *Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data*, 93–115. <https://doi.org/10.1002/9783527655861.CH5>

Timotius, I. K., Canneva, F., Minakaki, G., Mocerri, S., Plank, A. C., Casadei, N., Riess, O., Winkler, J., Klucken, J., Eskofier, B., & von Hörsten, S. (2019). Systematic data analysis and data mining in CatWalk gait analysis by heat mapping exemplified in rodent models for neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 326, 108367.
<https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2019.108367>

Tomoda, H. (2016). New Approaches to Drug Discovery for Combating MRSA. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64(2), 104–111. <https://doi.org/10.1248/CPB.C15-00743>

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

- Usano-Aleman, J., Paúl, J. P., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *REDUCA (Biología)*, 7(2), 60–70. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553>
- Vermote, A., & van Calenbergh, S. (2017). Small-Molecule Potentiators for Conventional Antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *ACS Infectious Diseases*, 3(11), 780–796. https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.7B00084/ASSET/IMAGES/LARGE/ID-2017-00084J_0011.JPEG
- Vicuña, G. C., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2010). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), 343–349. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2009.10.008>
- Vincent, I. M., Ehmann, D. E., Mills, S. D., Perros, M., & Barrett, M. P. (2016). Untargeted Metabolomics To Ascertain Antibiotic Modes of Action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), 2281. <https://doi.org/10.1128/AAC.02109-15>
- Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., & Bartolo, R. G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 240–247. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2003.01825.X>
- Wang, J., Cui, J., Liu, Z., Yang, Y., Li, Z., & Liu, H. (2024). Untargeted Metabolomics Based on Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry for Differential Metabolite Analysis of *Pinelliae Rhizoma* and Its Adulterants. *Molecules*, 29(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29092155/S1>
- Wang, M., Chen, L., Liu, D., Chen, H., Tang, D. D., & Zhao, Y. Y. (2017). Metabolomics highlights pharmacological bioactivity and biochemical mechanism of traditional Chinese

- medicine. *Chemico-Biological Interactions*, 273, 133–141.
<https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.06.011>
- Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2020). Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25173955>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(Database issue), D608. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1089>
- World Health Organization. (2021). Antimicrobial resistance. *WHO*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Wu, S., Yang, K., Hong, Y., Gong, Y., Ni, J., Yang, N., & Ding, W. (2022). A New Perspective on the Antimicrobial Mechanism of Berberine Hydrochloride Against *Staphylococcus aureus* Revealed by Untargeted Metabolomic Studies. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.917414/FULL>
- Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host and Microbe*, 26(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>
- Yang, H., Gao, Y., Long, L., Cai, Y., Liao, J., Peng, J., & Wang, L. (2021). Antibacterial effect of *Blumea balsamifera* (L.) DC. essential oil against *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, 203(7), 3981–3988. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02384-6/FIGURES/5>

- Yang, T., Hui, R., Nouws, J., Sauler, M., Zeng, T., & Wu, Q. (2022). Untargeted metabolomics analysis of esophageal squamous cell cancer progression. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 127. <https://doi.org/10.1186/S12967-022-03311-Z>
- Zhou, S., Rao, Y., Li, J., Huang, Q., & Rao, X. (2022). Staphylococcus aureus small-colony variants: Formation, infection, and treatment. *Microbiological Research*, 260, 127040. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127040>

Apéndices

Apéndice A. Metabolitos identificados presuntivamente hasta nivel 2, según el sistema propuesto por la sociedad de metabolómica.

Comparación de los metabolitos obtenidos por UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS con los espectros reportados en la literatura.

Metabolito identificado	Fórmula molecular	Molécula ionizada	Masa		Δ ppm	Iones característicos	
			Calculada	Experimental		Encontrados	Reportados
Ácido 7,9-Tetradecadiamínico	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	220.1695	220.1695	0.00	147.1168 131.0856 119.0857 79.0547	147.1168 131.0855 119.0855 79.0542
1,3-propanodiol	C ₄ H ₁₁ NO ₃	(M+Na) ⁺	144.0636	144.0631	3.47	144.0630 87.0445 86.0605 74.0606	144.0631 87.0446 86.0600 74.0600
3-Dehidroretinal	C ₂₀ H ₂₆ O	(M+H) ⁺	283.2063	283.2053	3.53	283.2055 147.1169 145.1012 135.1169	283.2056 147.1168 145.1011 135.1168
2-Isobutoxinaftaleno	C ₁₄ H ₁₆ O	(M+H) ⁺	201.1280	201.1273	3.48	201.1273 145.0648 115.0543 103.0545	201.1273 145.0647 115.0542 103.0542
Glicerofosfolina	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	(M+H) ⁺	258.1107	258.1098	3.48	125.0000 104.1073 98.9845 86.0968	124.9998 104.1069 98.9841 86.0964
13-Metil-4,4-bisnor-8,11,13-podocarpatrien-3-ona	C ₁₆ H ₂₀ O	(M+H) ⁺	229.1593	229.1586	3.05	229.1581 227.1430 183.1168 171.0807	229.1586 227.1430 183.1168 171.0804

Vitamina A2	C ₂₀ H ₂₈ O	(M+H) ⁺	285.2219	285.2209	3.51	185.1323 173.1324 147.1168 145.1011	185.1324 173.1324 147.1168 145.1011
2-Metilisoborneol	C ₁₁ H ₂₀ O	(M+H) ⁺	169.1593	169.1586	4.13	123.1170 121.1014 107.0858 95.0860	123.1168 121.1011 107.0855 95.0855
Espermidina	C ₇ H ₁₉ N ₃	(M+H) ⁺	146.1658	146.1651	4.79	84.0812 70.0657 58.0657 55.0549	84.0807 70.0651 58.0651 55.0542
Putrescina	C ₄ H ₁₂ N ₂	(M+H) ⁺	89.1079	89.1077	2.24	89.1076 72.0813 56.0501 55.0549	89.1073 72.0807 56.0494 55.0542
Glutamil-gamma-glutamato	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	274.1271	274.1257	5.10	145.0602 130.0500 129.0659 127.0502	145.0607 130.0498 129.0658 127.0502
2,4-dimetil-4-feniltetrahidrofuranol	C ₁₂ H ₁₆ O	(M+H) ⁺	177.1280	177.1274	3.39	177.1276 157.1018 133.1010 119.0856	177.1273 157.1011 133.1011 119.0855
N-hidroxi-L-valina	C ₅ H ₁₁ NO ₃	(M+Na) ⁺	156.0636	156.0629	4.48	156.0654 116.0708 100.0395 98.0604	156.0631 116.0706 100.0393 98.0600
Ácido 12,13-epoxi-9-octadecenoico	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	(M+H) ⁺	297.2430	297.2421	3.02	297.2421 279.2316 261.2211 251.2369	297.2424 279.2318 261.2212 251.2369

Adenina	$C_5H_5N_5$	$(M+H)^+$	136.0624	136.0618	4.41	136.0618 119.0354 109.0512 94.0403	136.0617 119.0352 109.0509 94.0400
sn-Glicero-3-fosfoetanolamina	$C_5H_{14}NO_6P$	$(M+H)^+$	216.0638	216.0630	3.70	216.0633 198.0529 142.0496 62.0606	216.0631 198.0526 142.0493 62.0600
2-Formilaminobenzaldehído	$C_8H_7NO_2$	$(M+H)^+$	150.0556	150.0549	4.66	150.0546 124.0393 120.0446 108.0447	150.0549 124.0398 120.0449 108.0449
Ácido 10-ceto tridecanoico	$C_{13}H_{24}O_3$	$(M+NH_4-H_2O)^+$	228.1957	228.1956	0.44	153.1272 141.1274 139.1116 127.1118	153.1273 141.1273 139.1117 127.1117
3-Metoxi- α -metil-L-tirosina	$C_{11}H_{15}NO_4$	$(M+NH_4-H_2O)^+$	225.1233	225.1233	0.00	209.0919 194.0819 180.1018 137.0595	209.0908 194.0812 180.1019 137.0597
N-acetil-L-glutamato	$C_7H_{11}NO_5$	$(M+NH_4-H_2O)^+$	189.0869	189.0869	0.00	148.0604 146.0600 128.0706 100.0396	148.0604 146.0604 128.0708 100.0393
5-metilcitosina	$C_5H_7N_3O$	$(M+H)^+$	126.0668	126.0663	3.97	108.0559 81.0451 66.0343 56.0500	108.0561 81.0447 66.0338 56.0495
L-Fenilglicina	$C_8H_9NO_2$	$(M+H)^+$	152.0712	152.0706	3.94	152.0706 135.0440 108.0808 106.0653	152.0706 135.0440 108.0807 106.0651

Ala Glu Asn	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₇	(M+H) ⁺	333.1411	333.1400	3.30	173.0919 131.0448 127.0866 113.0347	173.0920 131.0451 127.0865 113.0345
Ácido α-linolénico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	(M+H) ⁺	279.2325	279.2315	3.58	279.2316 261.2212 233.2263 219.2107	279.2318 261.2212 233.2263 219.2107
Glicilprolilhidroxiprolina	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₅	(M+H) ⁺	286.1404	286.1394	3.49	226.1180 183.1125 132.0652 129.1021	226.1186 183.1128 132.0655 129.1022
Citosina	C ₄ H ₅ N ₃ O	(M+H) ⁺	112.0512	112.0508	3.57	112.0507 95.0243 69.0453 52.0188	112.0511 95.0245 69.0453 52.0187
N-carbamoilputrescina	C ₅ H ₁₃ N ₃ O	(M+H) ⁺	132.1138	132.1131	5.29	132.1131 115.0867 97.0763 89.1077	132.1131 115.0866 97.0760 89.1073
Oxaloglutarato	C ₇ H ₈ O ₇	(M-H) ⁻	203.0191	203.0197	2.95	113.0231 85.0282 83.0125 71.0126	113.0244 85.0295 83.0138 71.0138
4-Hidroxi-L-treonina	C ₄ H ₉ NO ₄	(M-H) ⁻	134.0453	134.0461	5.96	134.0461 88.0392 74.0235 70.0286	134.0458 88.0404 74.0247 70.0298
Gly Asp Pro	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₆	(M-H) ⁻	286.1038	286.1038	0.00	286.1050 229.0826 227.0666 114.0551	286.1044 229.0830 227.0673 114.0560

AMP	$C_{10}H_{14}N_5O_7$ P	(M-H) ⁻	346.0552	346.0550	0.58	346.0550 134.0460 96.9684 78.9578	346.0553 134.0467 96.9691 78.9585
9,10-DiHOME	$C_{18}H_{34}O_4$	(M-H) ⁻	313.2378	313.2378	0.00	295.2272 125.0961 69.0334 59.0127	295.2278 125.0971 69.0345 59.0138
Carnosina	$C_9H_{14}N_4O_3$	(M-H) ⁻	225.0987	225.0984	1.33	225.0986 136.0502 111.0550 108.0554	225.0993 136.0516 111.0563 108.0567

Nota: Los espectros reportados fueron obtenidos por las bases de datos Mass Bank, PubChem, HMDB y CFM-ID (versión 3.0 y 4.0) y artículos científicos relacionados.

Apéndice B. Estructura química y representación gráfica de los espectros de masas y patrones isotópicos utilizados para hacer la identificación presuntiva.

Figura S1.1. Estructura química del sn-glicero-3-fosfoetanolamina

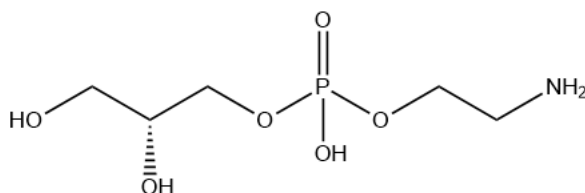
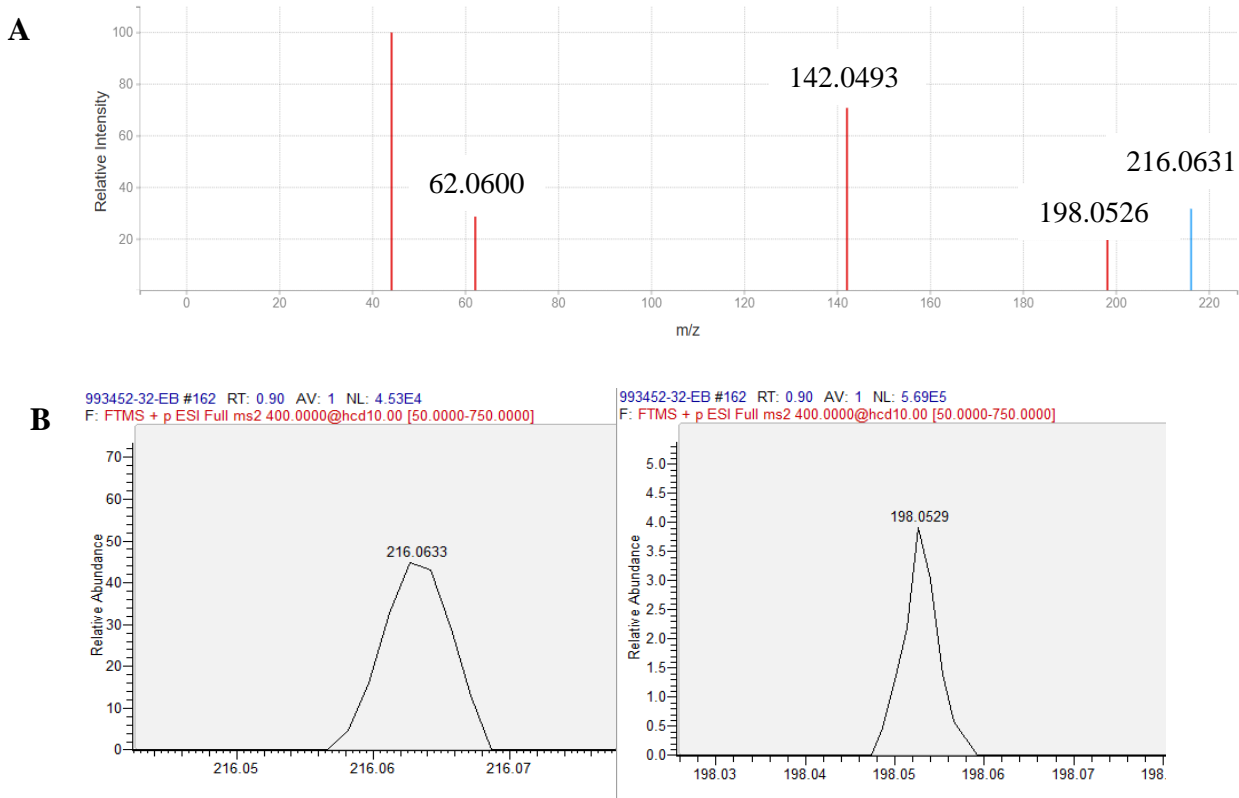


Figura S1.2. Comparación de espectros de masas del sn-glicero-3-fosfoetanolamina, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental



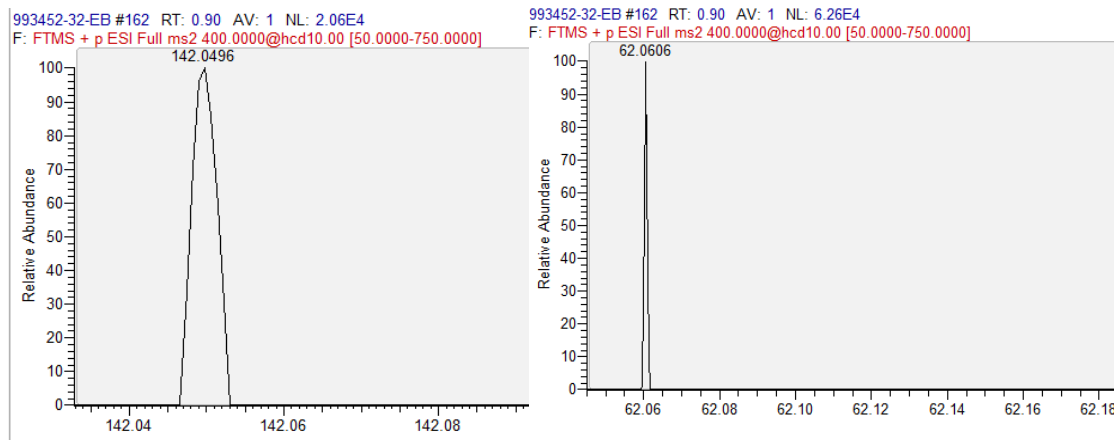
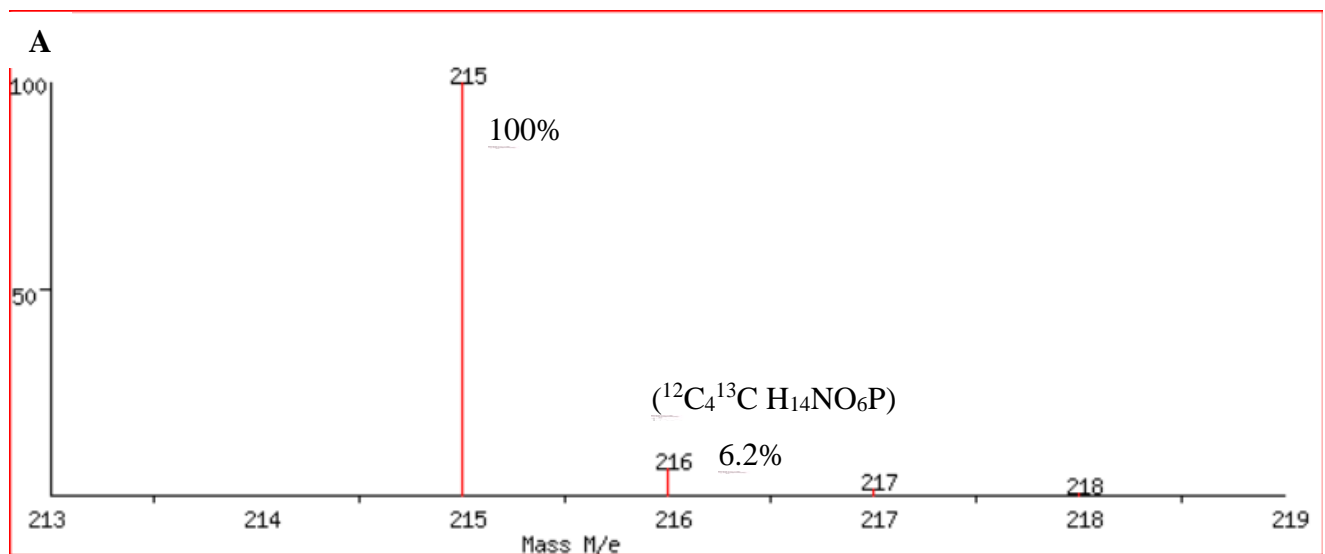


Figura S1.3. Comparación de patrones isotópico del sn-glicero-3-fosfoetanolamina, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental



B

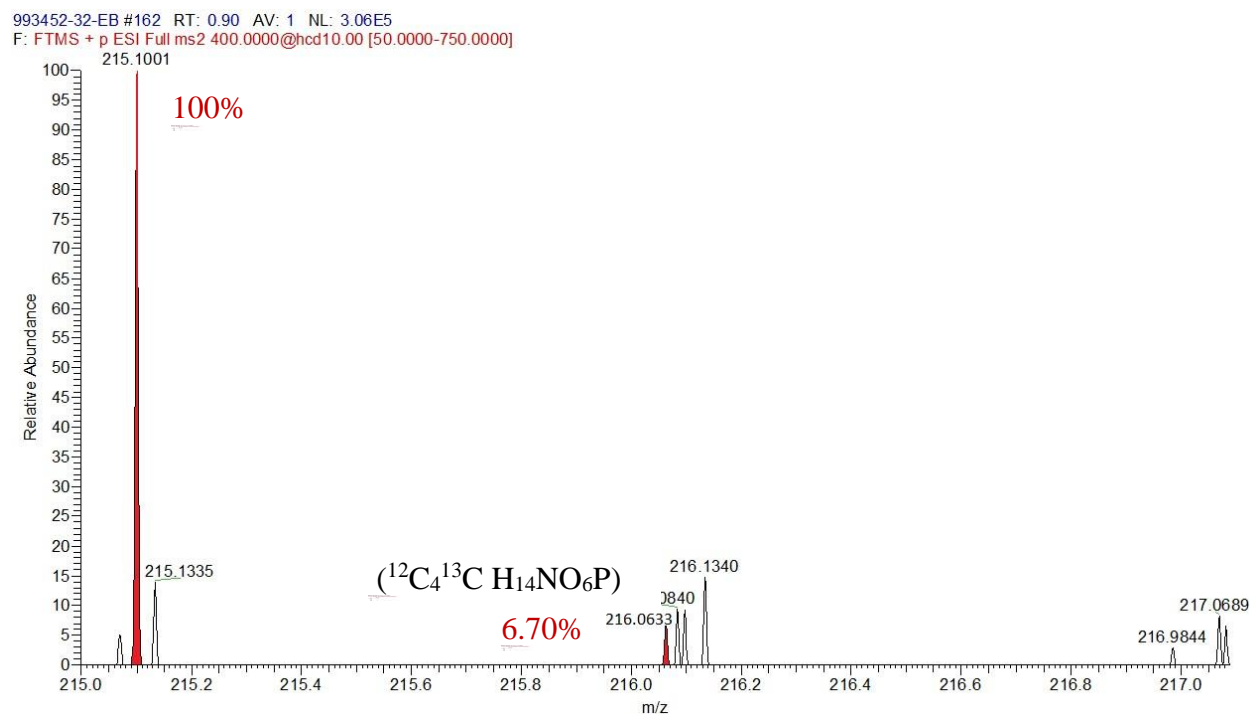


Figura S2.1. Estructura química del Ácido 7,9-Tetradecadiaminóico

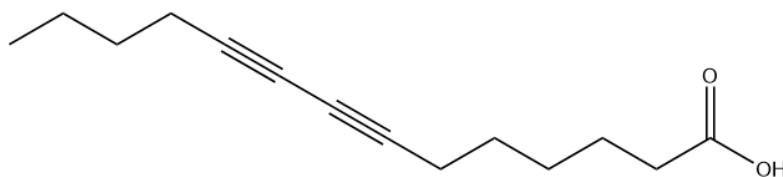
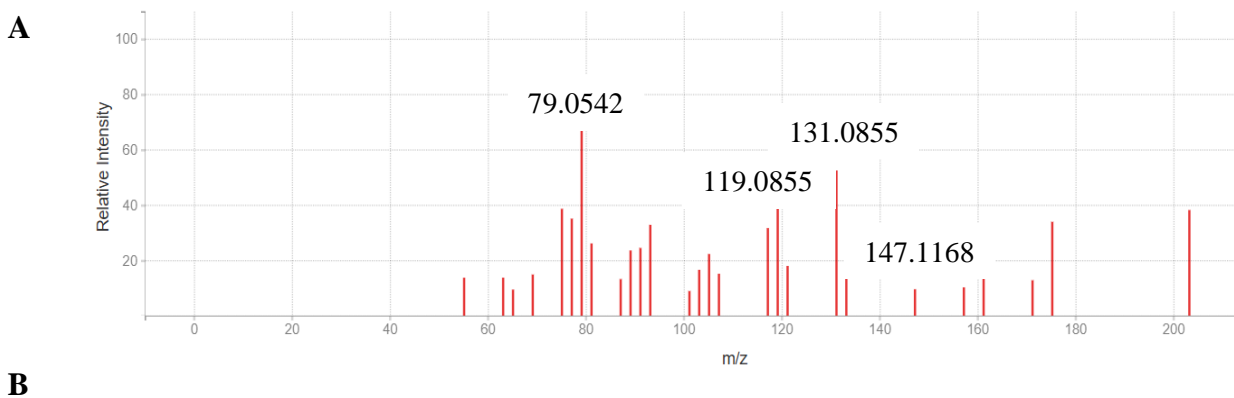


Figura S2.2. Comparación de espectros de masas del Ácido 7,9-Tetradecadiaminóico, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental



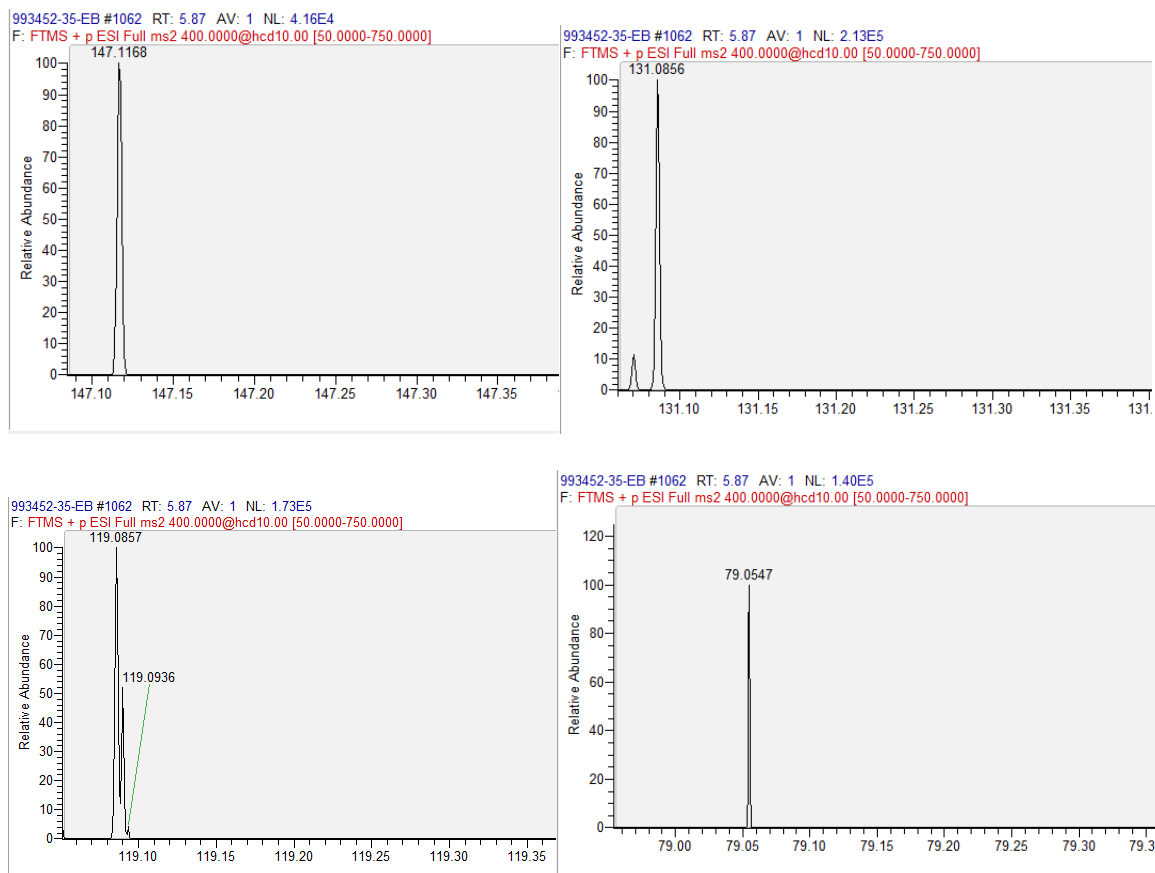
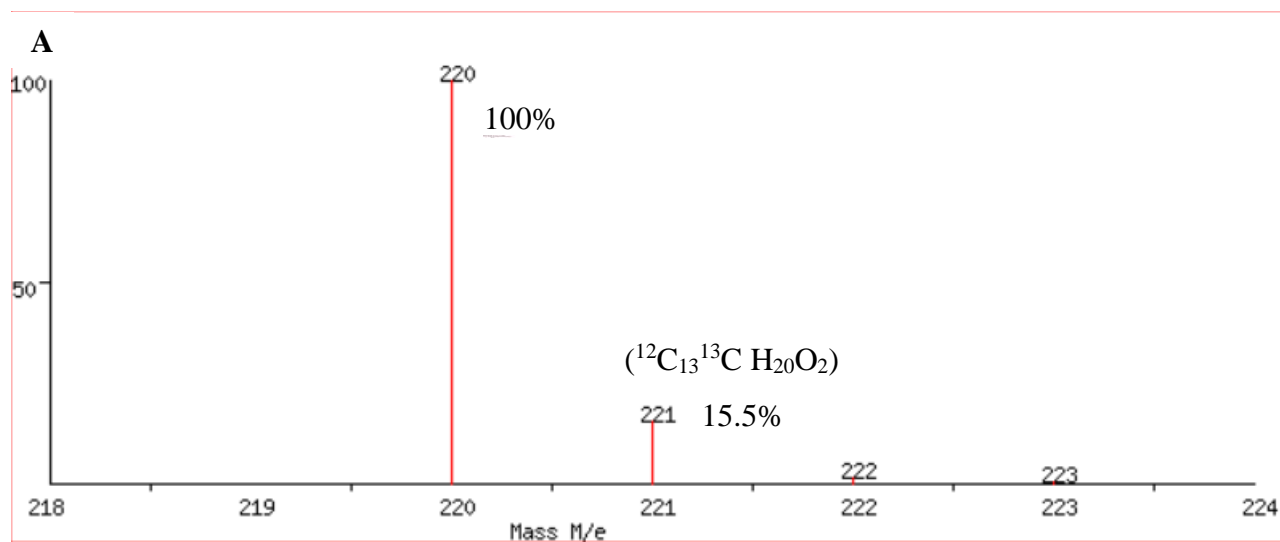


Figura S2.3. Patrón isotópico del Ácido 7,9-Tetradecadiaminóico, A) patrón isotópico teórico,

B) patrón isotópico experimental



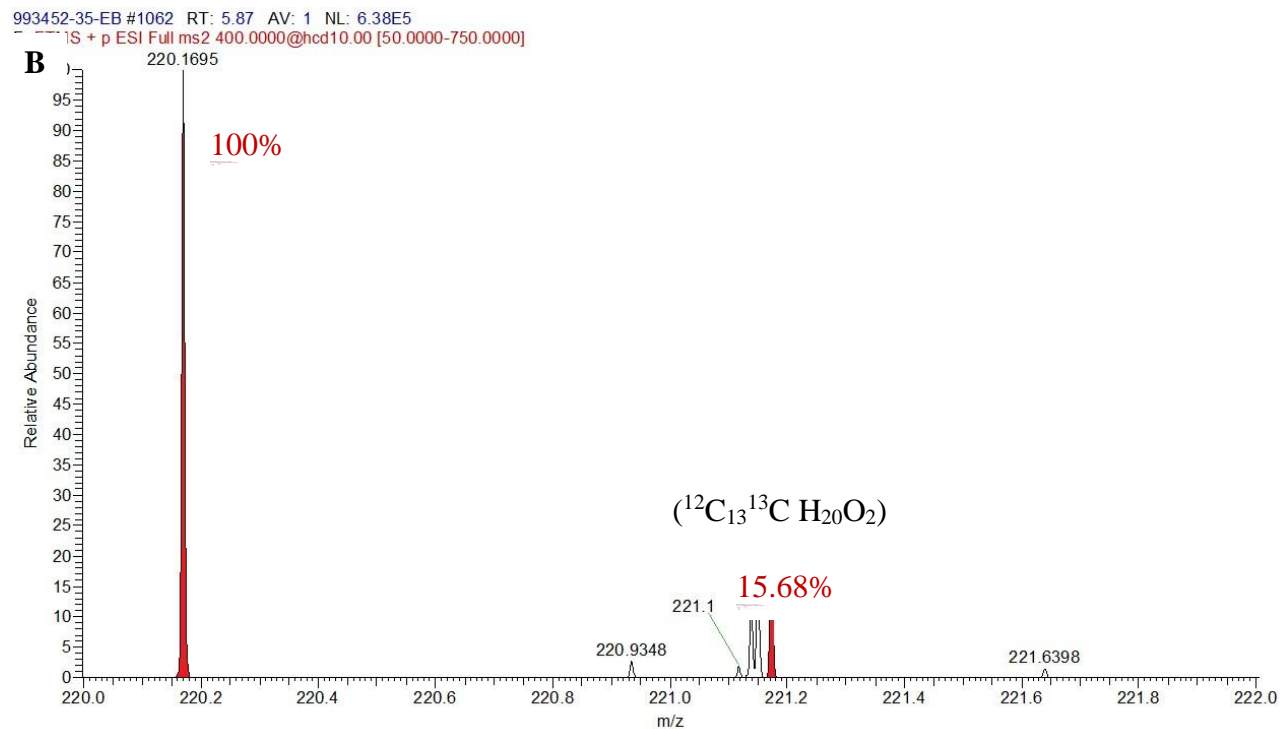


Figura S3.1. Estructura química del 3-metoxi- α -metil-L-tirosina

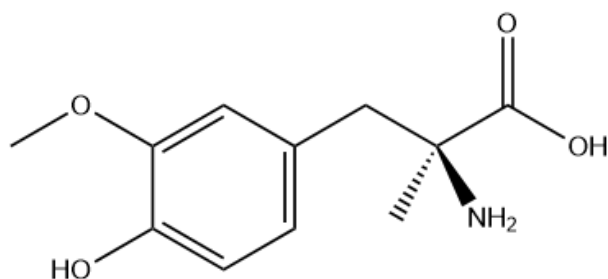
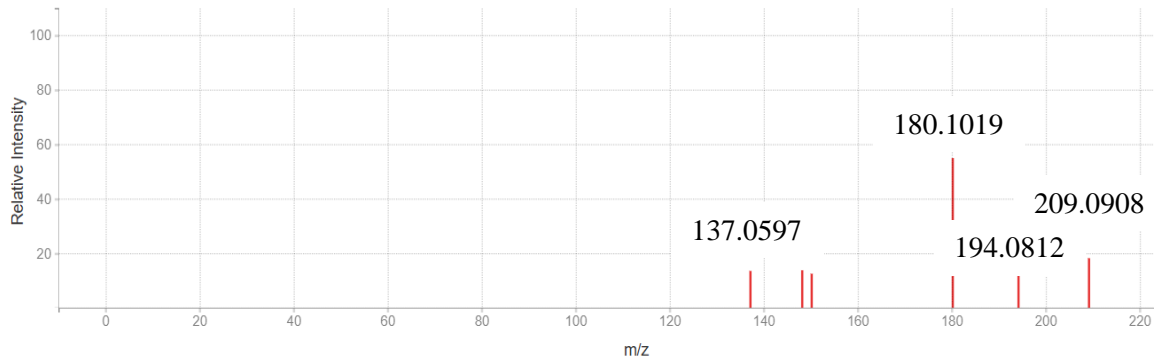


Figura S3.2. Comparación de espectros de masas del 3-metoxi- α -metil-L-tirosina, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental

A



B

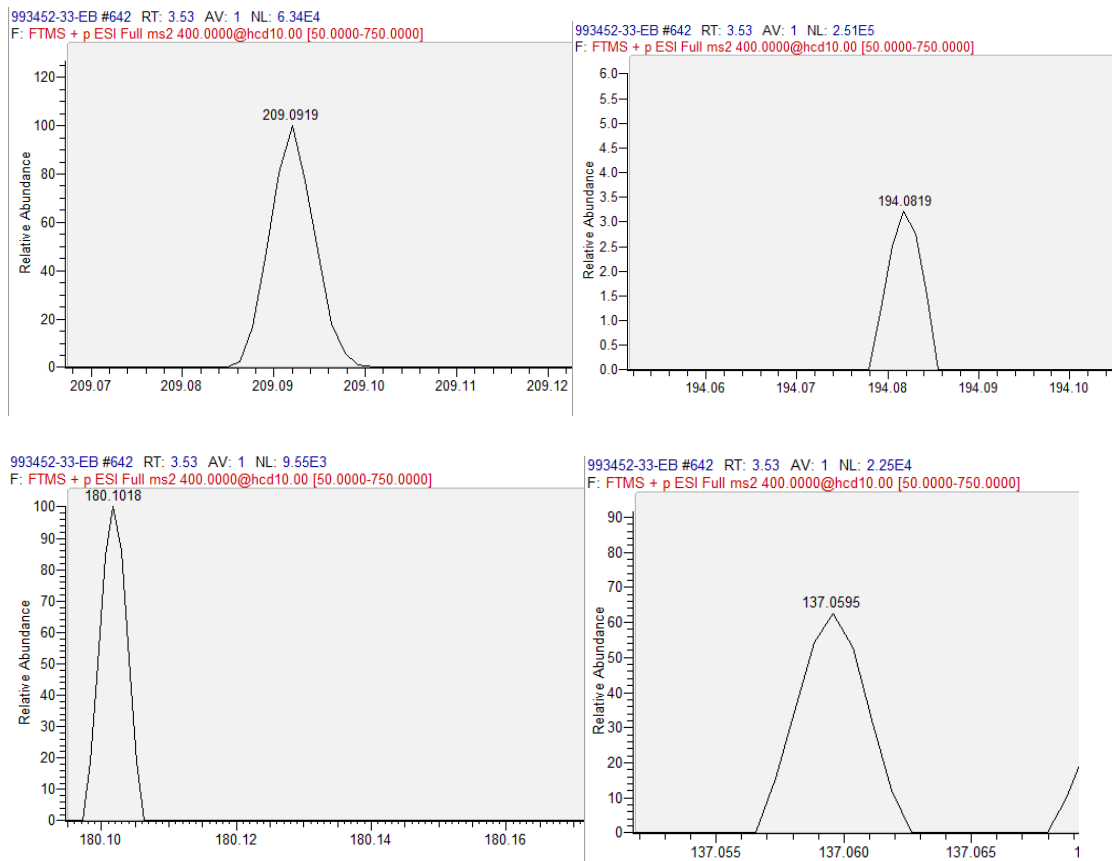


Figura S3.3. Patrón isotópico 3-metoxi- α -metil-L-tirosina, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental

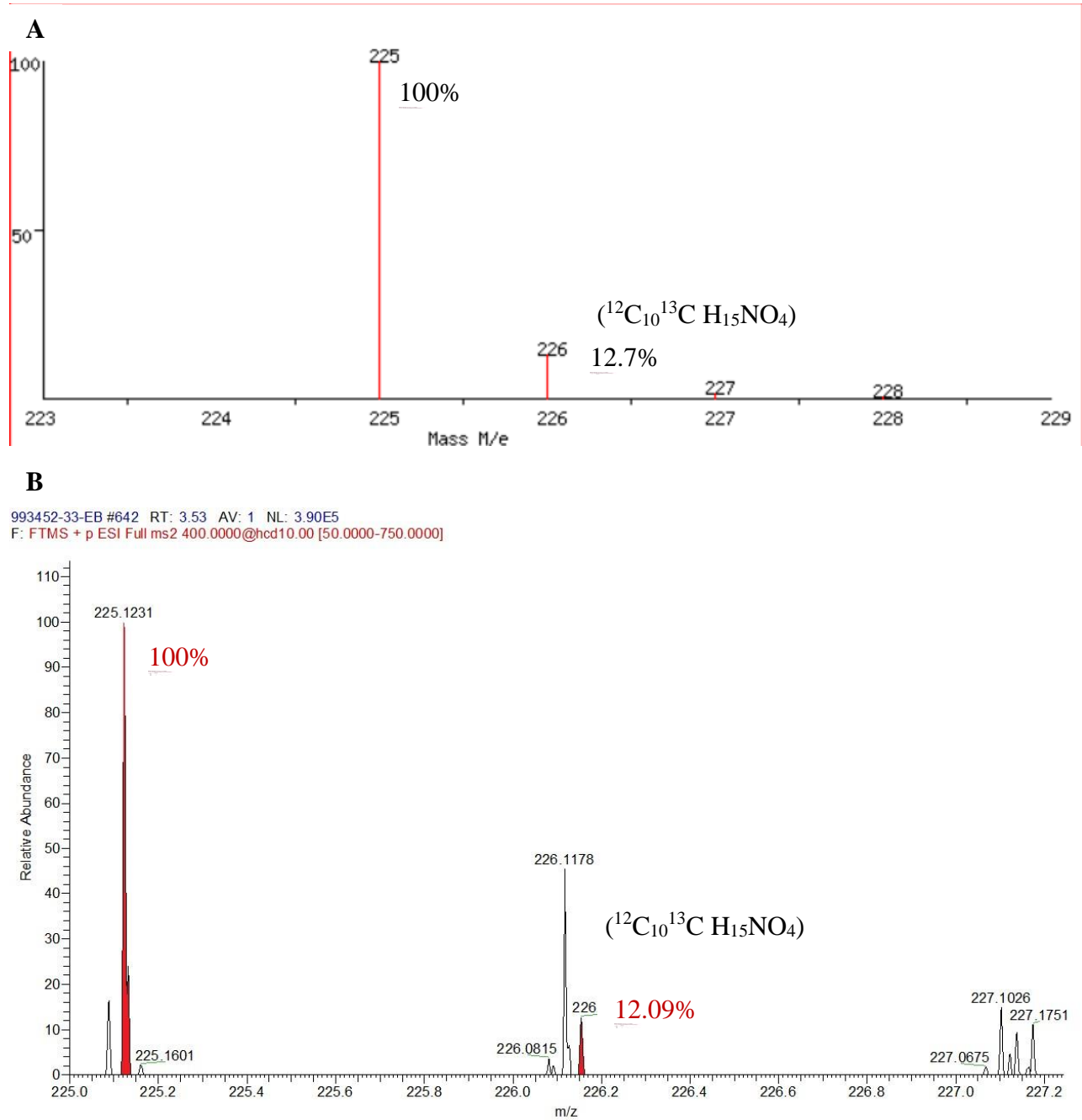


Figura S4.1. Estructura química N-acetil-L-glutamato

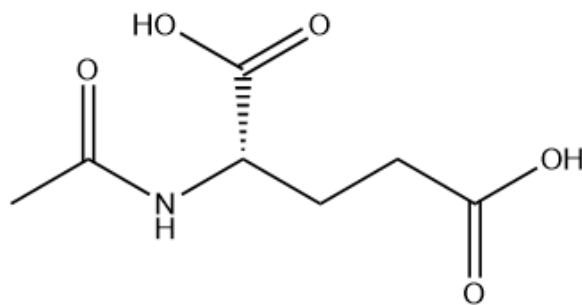
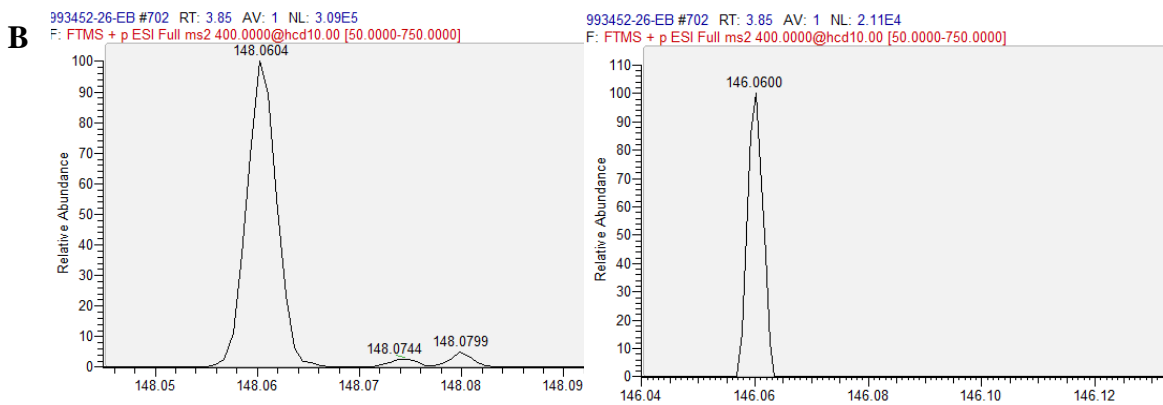
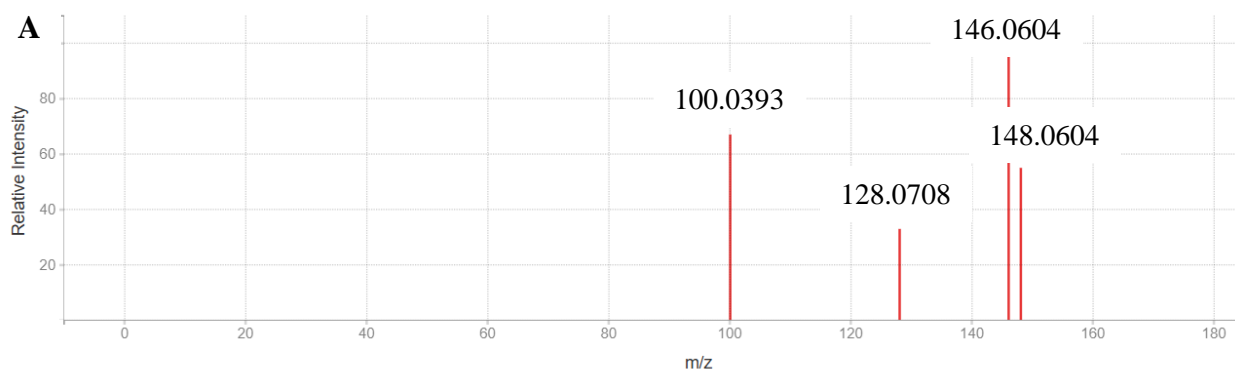


Figura S4.2. Comparación de espectros de masas del N-acetil-L-glutamato, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental



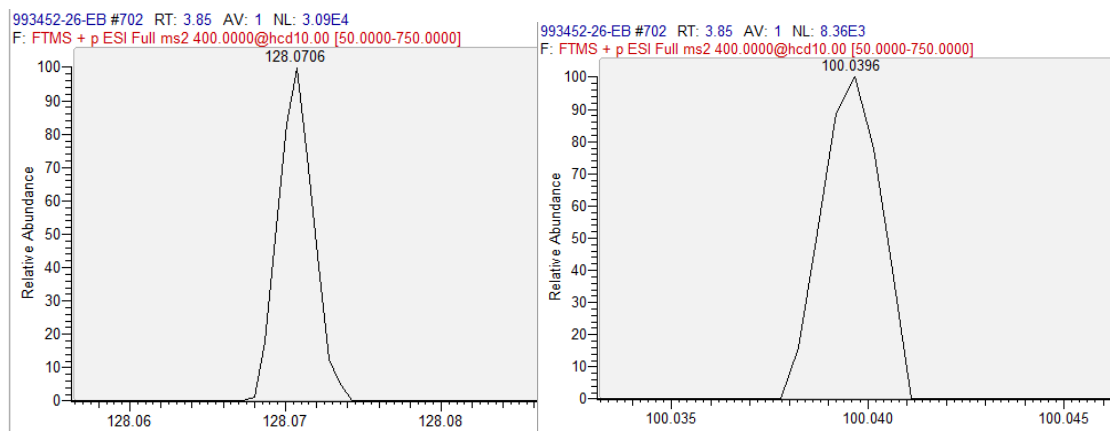
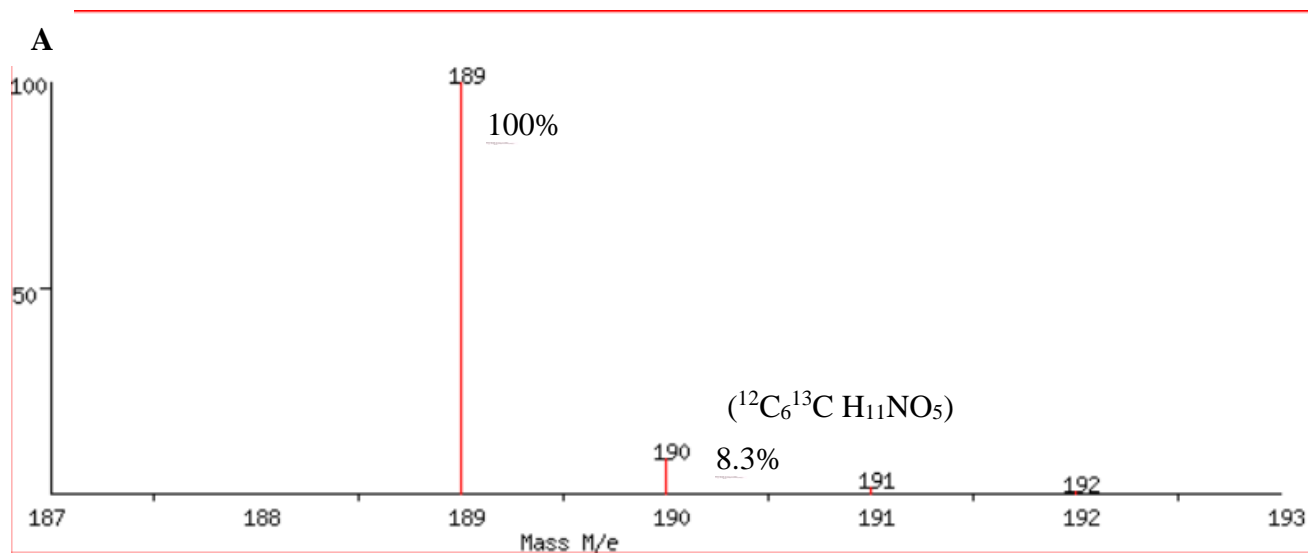


Figura S4.3. Patrón isotópico N-acetil-L-glutamato, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental



B

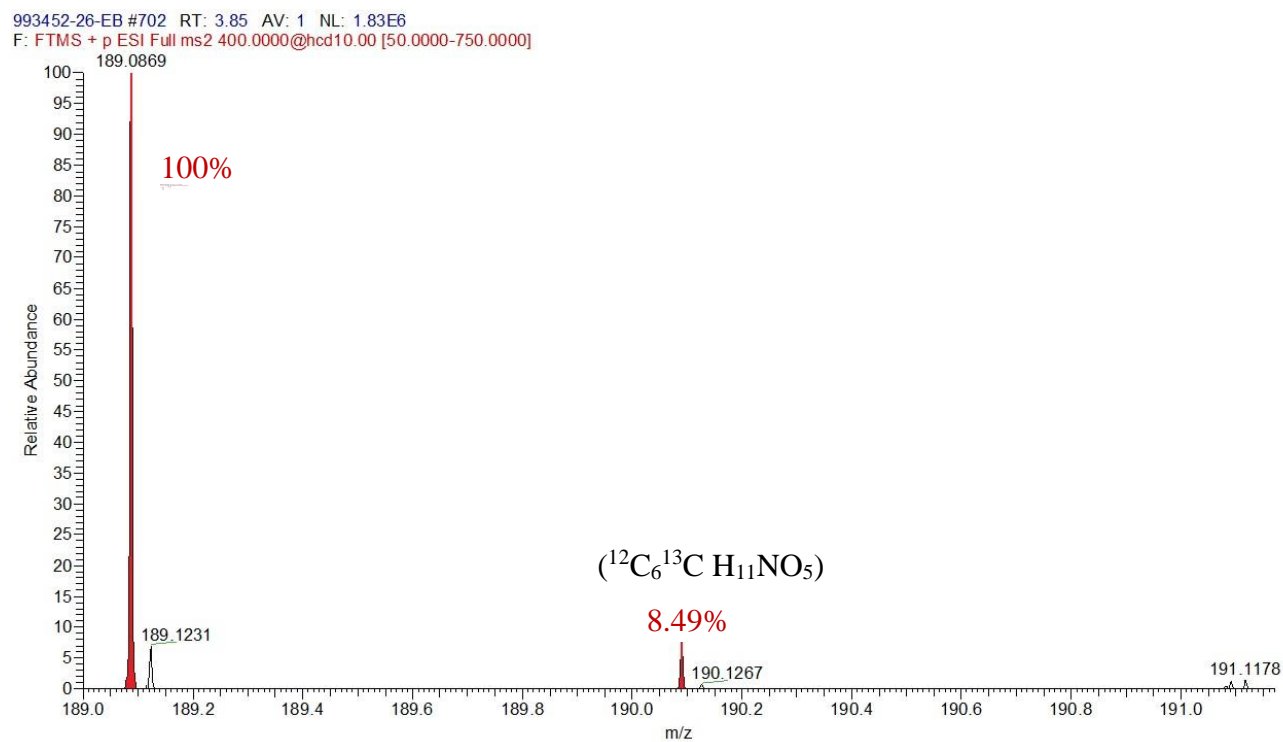


Figura S5.1. Estructura química de la 5-metilcitosina

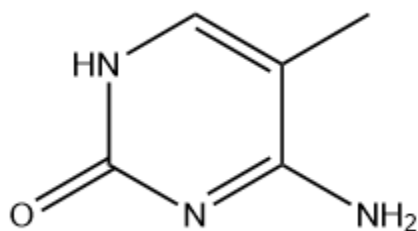


Figura S5.2. Comparación de espectros de masas de la 5-metilcitosina, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental

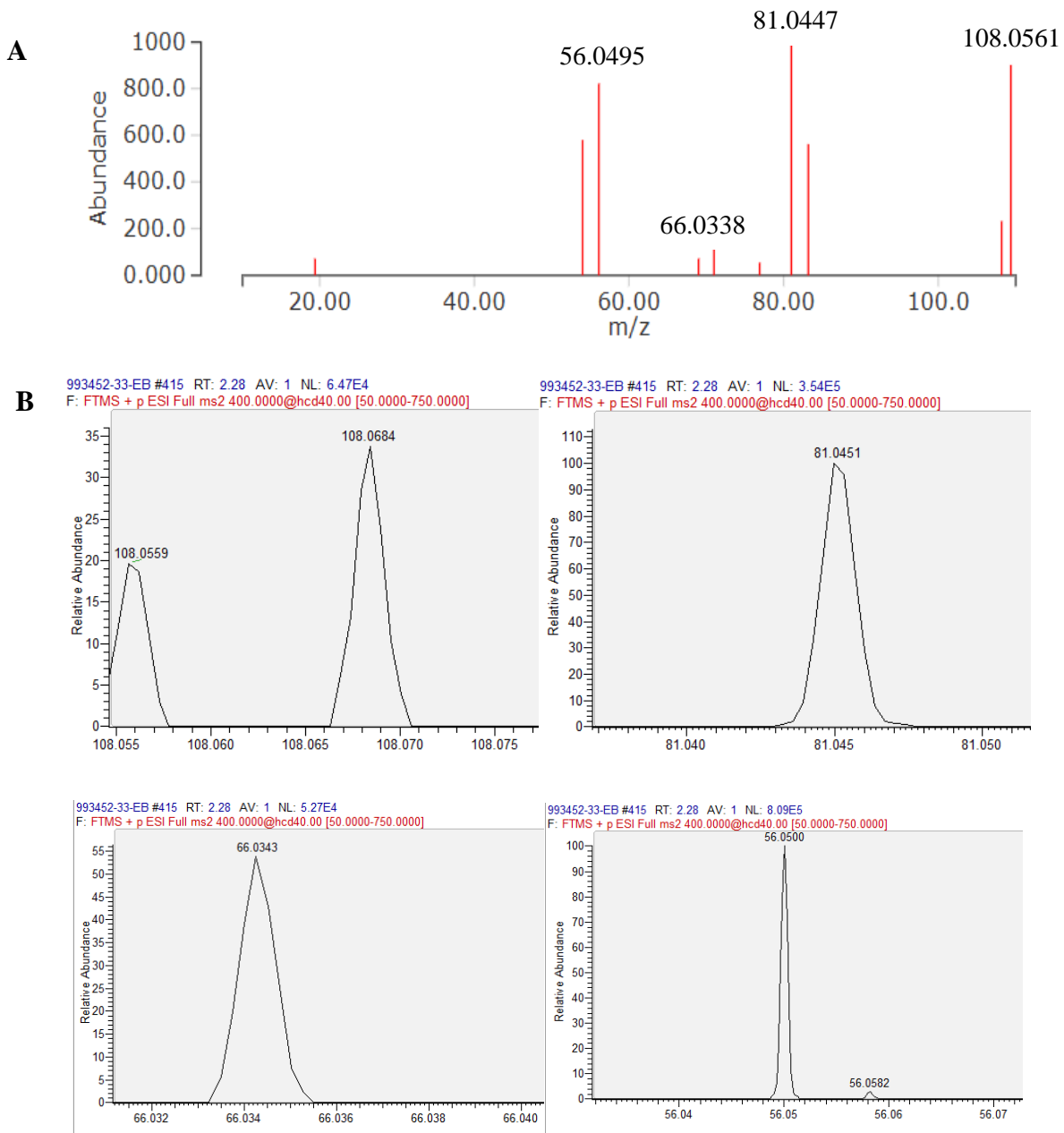
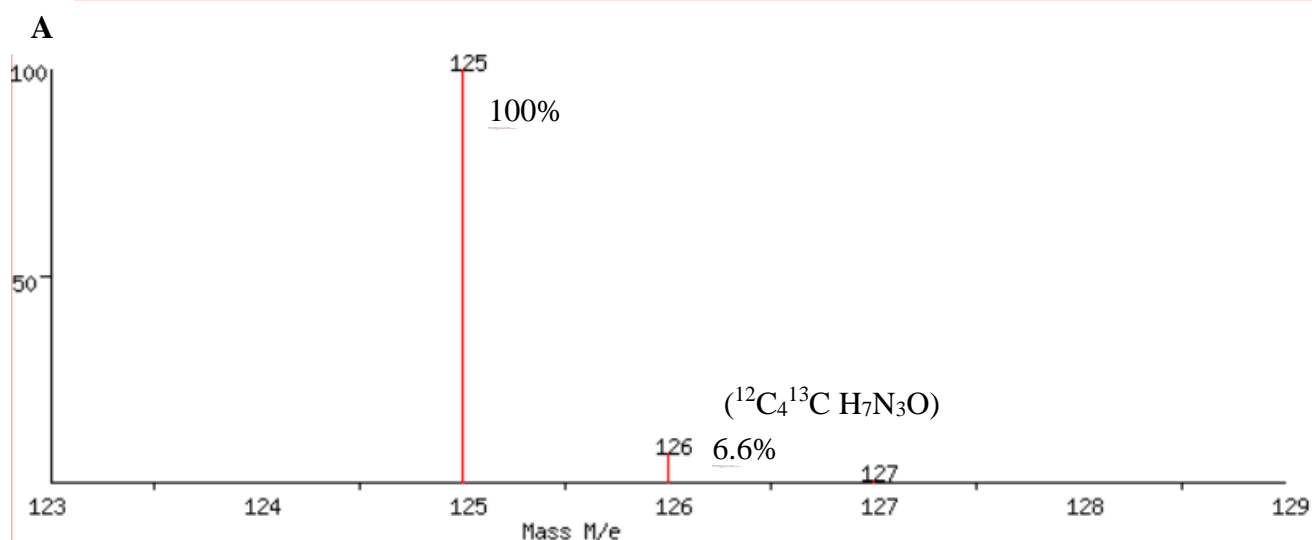


Figura S5.3. Patrón isotópico 5-metilcitosina, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental



B

993452-33-EB #415 RT: 2.28 AV: 1 NL: 1.60E6

F: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd40.00 [50.0000-750.0000]

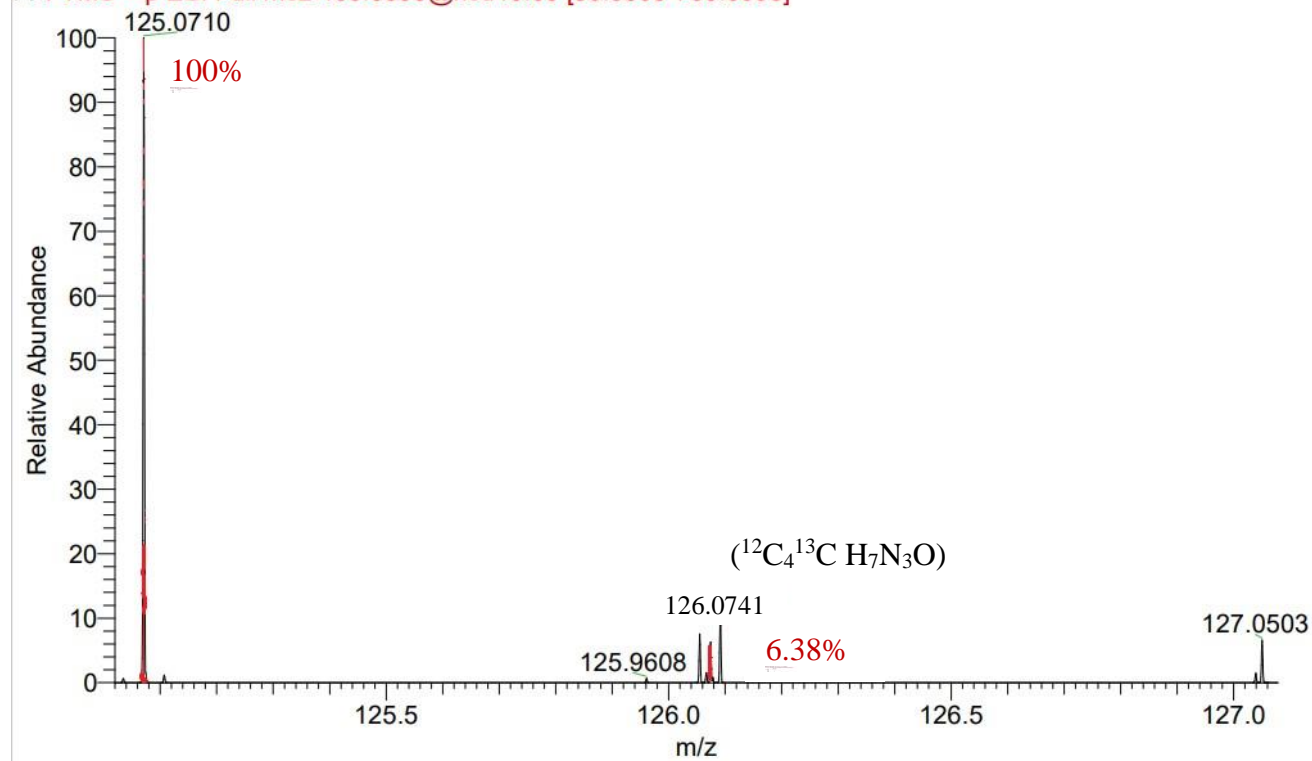


Figura S6.1. Estructura química de 9,10-DiHOME

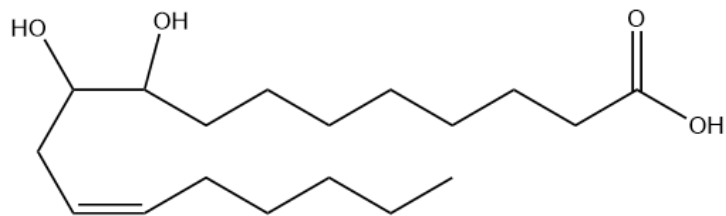


Figura S6.2. Comparación de espectros de masas de 9,10-DiHOME, A) espectro de masas de la literatura, B) espectro de masas experimental

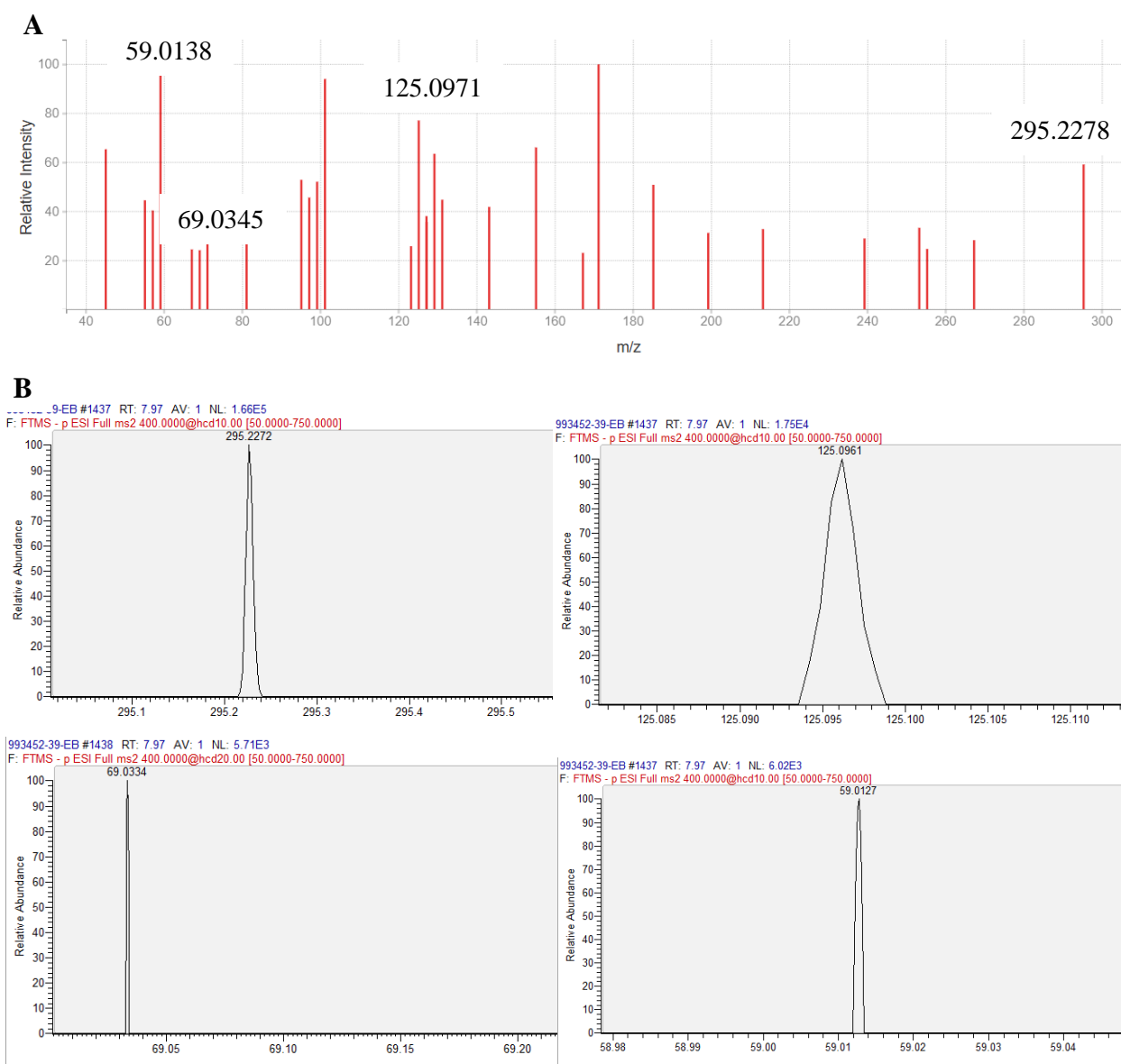


Figura S6.3. Patrón isotópico 9,10-DiHOME, A) patrón isotópico teórico, B) patrón isotópico experimental

