

**Análisis metabólico basado en espectrometría de masas del efecto  
antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre *Escherichia coli***

**ATCC 11775**

Luis Eduardo Acuña García

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

**Director**

William Fernando Hidalgo Bucheli, Ph.D.

**Codirector**

Marlon Yesid Cáceres Ortiz, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

## **Dedicatoria**

*A mi señora madre, Claudia Patricia Acuña García, quien, frente a las más desafiantes condiciones, supo promover en su hijo el amor por la ciencia y la pasión por hacer las cosas bien. Del mismo modo, a las mujeres de mi familia, mi señora abuela, Leonor García de Acuña, y mi tía, Yaneth Acuña García, quienes tuvieron la entereza, la paciencia y el amor de criar la curiosidad de un niño, que se transformó en la pasión por la investigación de un hombre.*

*A quien con seguridad hubiese sido el lector más asiduo de este manuscrito, mi querido abuelo, Constantino Arístides Acuña Q.E.P.D. Quien desinteresadamente hizo posible el sueño de su nieto por convertirse en científico. Gracias a sus incansables esfuerzos por dar alas a los sueños de sus nietos y por el infinito amor de padre que supo darme en vida.*

### **Agradecimientos**

Al programa Bio-Reto XXI 15.50, a Colciencias, ministerio de educación nacional, ministerio de industria, comercio y turismo e ICETEX, convocatoria ecosistema científico – Colombia científica. Fondo Francisco José de Caldas, contrato RC-FP44842-212-2018.

Al Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), por suministrar el aceite esencial empleado en este estudio, facilitar su caracterización y por la invaluable ayuda al desarrollar los análisis instrumentales de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. A la doctora Elena Stashenko, por todos sus consejos, ánimos, escucha y aliento en los momentos difíciles, los cuales contribuyeron al desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Excelencia en Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO) de la Universidad CEU San Pablo, y en especial al doctor Alberto Gil de la Fuente, por la valiosa colaboración y soporte prestados en el uso de la herramienta Mass-mediator.

Al grupo de investigación en Bioquímica y microbiología (GIBIM) por el préstamo de las instalaciones para desarrollar el proyecto, y en especial a los doctores William Hidalgo y Marlon Cáceres por todo el tiempo, atención y paciencia ofrecidos en el desarrollo de este trabajo. De igual manera a la doctora Claudia Ortiz, directora del grupo de investigación, y del proyecto 11 del programa Bio-reto XXI 15-50, por todo el apoyo brindado en el desarrollo del presente proyecto.

## Tabla de Contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
1.1 Objetivo General	17
1.2 Objetivos Específicos	17
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>18</b>
2.1. <i>Escherichia coli</i>	18
2.2. Agentes antimicrobianos y pruebas de evaluación <i>in vitro</i>	22
2.3. Aceites esenciales como fuente de sustancias bioactivas y antimicrobianas	23
2.4. Los aceites esenciales como agentes antimicrobianos	24
2.5. Herramientas metabólicas para investigar mecanismos de acción antimicrobianos	27
2.6. Metabolómica no dirigida basada en cromatografía líquida y espectrometría de masas	31
2.7. Procesamiento de datos y flujo de análisis estadísticos en estudios metabólicos no dirigidos	33
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
3.1. Materiales	39
3.1.1 Microorganismo y medios de cultivo	39
3.1.2 Material vegetal y extracción de aceites esenciales	39
3.2. Métodos	39

Análisis metabolómico basado en espectrometría de masas del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre *Escherichia coli* ATCC 11775

	5
3.2.1. Crecimiento del microorganismo y pruebas de actividad antimicrobiana	39
3.2.2. Extracción de metabolitos bacterianos y preparación de la muestra	41
3.2.3. Análisis de los perfiles químicos	42
3.2.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico	44
3.2.5. Identificación presuntiva de los metabolitos diferenciales y reconstrucción de las rutas metabólicas afectadas	48
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
4.1 Actividad antimicrobiana del aceite esencial frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	49
<hr/>	
4.2. Obtención de los perfiles químicos	52
4.2.1. Tratamiento preliminar de los datos y obtención de las tablas de intensidad de iones	52
4.2.2. Pretratamiento estadístico con las muestras de control de calidad	54
4.3. Identificación de los cambios en los perfiles químicos	56
4.3.1 Determinación de los cambios globales en los perfiles metabólicos de las muestras mediante métodos estadísticos multivariados	56
4.3.2. Determinación de las características ( <i>features</i> ) moduladas diferencialmente	59
4.4. Identificación presuntiva de los metabolitos modulados por la acción antimicrobiana del aceite esencial	68
4.5. Identificación de los procesos metabólicos afectadas por la acción del aceite esencial	77
<hr/>	
4.5.1. Biosíntesis de poliaminas y ciclo de la urea	78

Análisis metabolómico basado en espectrometría de masas del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre *Escherichia coli* ATCC 11775

	6
4.5.2. Metabolismo del triptófano y del ácido indolacético _____	80
4.5.3. Degradación de la leucina y valina _____	82
4.5.4. Metabolización de componentes activos del aceite esencial _____	84
<b>5. CONCLUSIONES</b> _____	<b>87</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b> _____	<b>89</b>
<b>8. FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN</b> _____	<b>90</b>
<b>9. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS Y PRODUCTOS ACADÉMICOS DERIVADOS</b> _____	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	<b>91</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> _____	<b>105</b>

## Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales y extractos vegetales _____	26
<b>Tabla 2.</b> Descripción de los grupos de muestras utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana _____	41
<b>Tabla 3.</b> Valores de significancia estadística para las relaciones ( $m/z$ ) que presentaron modulación diferenciada en los perfiles metabólicos obtenidos en el modo de adquisición de iones negativo _____	60
<b>Tabla 4.</b> Valores de significancia estadística para las relaciones ( $m/z$ ) que presentaron modulación diferenciada en los perfiles metabólicos obtenidos en el modo de adquisición de iones positivo _____	61
<b>Tabla 5.</b> Identificación presuntiva de los metabolitos de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 modulados diferencialmente durante el tratamiento con el aceite esencia LOT-II _____	69
<b>Tabla 6.</b> Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> quimiotipo timol II _____	86

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Número de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> confirmados como resistentes a cefalosporinas de tercera generación por cada millón de habitantes presentados en el 2016 (a), 2018 (b), y 2020 (c). Casos reportados por el sistema GLASS en su informe de 2022. Adaptado de: (World Health Organization, 2022): .....	20
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> en servicios hospitalarios en Colombia durante 2018 en salas de unidad de cuidados intensivos UCI (a) y salas no UCI (b) .....	21
<b>Figura 3.</b> Popularidad de la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) en estudios metabolómicos desde 1999 hasta 2022. Número de publicaciones reportadas en la base de datos de SCOPUS usando como ecuación de búsqueda las frases “Untargeted Metabolomics” AND “Mass spectrometry” y “Untargeted-Metabolomics” AND “NMR” .....	32
<b>Figura 4.</b> Niveles de certeza en la identificación de metabolitos definidos por la sociedad de metabolómica. Adaptado de: (Gil-De-La-Fuente et al., 2019) .....	38
<b>Figura 5.</b> Gráfica de la cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 al ser tratada con las concentraciones de LOT-II en rango 0,08 a 0,5 mg/mL .....	49
<b>Figura 6.</b> Gráfica de la cinética de inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 al ser tratada con las concentraciones de LOT-II en rango 0.18 a 0.3 mg/mL .....	50
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano de diferentes concentraciones del aceite esencial LOT-II frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775. A la izquierda y en color verde los	

porcentajes encontrados en el primer experimento, a la derecha y en m magenta, los porcentajes reportados en la segunda selección de concentraciones..... 51

**Figura 8.** Cromatogramas de iones totales originales obtenidos mediante el modo de adquisición de iones negativos **(a)**, y positivo **(c)**; Cromatograma de iones totales alineados obtenidos mediante el modo de adquisición de iones ionización negativo **(b)**, y positivo **(d)**..... 53

**Figura 9.** Gráficos de score correspondientes a los análisis por componentes principales de los perfiles metabólicos obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo **(a)**, y positivo **(b)**..... 55

**Figura 10.** Gráficos de score correspondientes a los análisis por componentes principales de los perfiles metabólicos de las muestras de control, y tratamiento, obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo **(a)**, y positivo **(b)** ..... 57

**Figura 11.** Gráficos de score correspondientes a los análisis discriminantes por mínimos cuadrados parciales de los perfiles metabólicos de las muestras de control, y tratamiento, obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo **(a)**, y positivo **(b)**..... 58

**Figura 12.** Mapas de calor de las características que presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento de los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de adquisición de iones negativo **(a)** y positivo **(b)**. En color rojo se muestran las características que presentaron una modulación positiva, en verde aquellas que se modularon de manera negativa ..... 65

**Figura 13.** Gráficos de volcán de las características que presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento de los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de adquisición de iones negativo **(a)** y positivo **(b)**. En color rojo se muestran las características

que presentaron una modulación positiva, en azul aquellas que se modularon de manera negativa, en color gris se presentan las características cuya modulación no superó los umbrales establecidos de significancia estadística..... 66

**Figura 14.** Gráficos de score correspondientes a los análisis discriminantes por mínimos cuadrados parciales de los perfiles metabólicos de las muestras de control, y tratamiento, obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo (a), y positivo (b)..... 67

**Figura 15.** Mapa de calor de los metabolitos identificados de manera presuntiva, que presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento. En color rojo se muestran los metabolitos que presentaron una modulación positiva, en verde aquellos que fueron modulados de manera negativa..... 76

**Figura 16.** Gráfico de barras del análisis de enriquecimiento realizado sobre los metabolitos modulados diferencialmente. .... 77

**Figura 17.** Reconstrucción de la biosíntesis de poliaminas y el ciclo de la urea de *Escherichia coli* al ser tratada con el aceite esencial LOT-II. En color rojo se muestran los nombres de los metabolitos modulados positivamente frente al tratamiento, en verde aquellos modulados de manera negativa, en gris se presentan los nombres de algunos intermediarios de la ruta. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito identificado, en color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento ..... 78

**Figura 18.** Reconstrucción del metabolismo del triptófano y el ácido indolacético de *Escherichia coli* al ser tratada con el aceite esencial LOT-II. En color verde se muestran los nombres de los metabolitos modulados negativamente frente al tratamiento, en gris se presentan los nombres de algunos intermediarios de la ruta. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito

identificado, en color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento. .... 81

**Figura 19.** Reconstrucción de la degradación de la Leucina y la valina de *Escherichia coli* al ser tratada con el aceite esencial LOT-II. En color rojo se muestran los nombres de los metabolitos modulados positivamente frente al tratamiento, en verde aquellos modulados de manera negativa, en gris se presentan los nombres de algunos intermediarios de la ruta. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito identificado, en color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento..... 83

**Figura 20.** Posibles productos del metabolismo de componentes del aceite esencial. En color rojo se muestran los nombres de los metabolitos modulados positivamente frente al tratamiento. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito identificado, en color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento85

## Resumen

**Título:** Análisis metabolómico basado en espectrometría de masas del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia organoides* sobre *Escherichia coli* ATCC 11775\*

**Autor:** Luis Eduardo Acuña García\*\*

**Palabras Clave:** Aceite esencial, Antimicrobiano, metabolómica no dirigida, mecanismo de acción.

**Descripción:** La pérdida de efectividad de los antimicrobianos clásicos para tratar infecciones bacterianas ha mostrado la urgencia con la que se requiere investigar y desarrollar nuevos antibióticos. Uno de los microorganismos que más preocupa a diversas autoridades de salud es *Escherichia coli*, esto debido a su capacidad para desarrollar mecanismos de resistencia y a su prevalencia en ambientes hospitalarios. Una de las alternativas sustentables al uso de antimicrobianos clásicos que ha surgido desde la investigación de productos naturales es el uso de los aceites esenciales y extractos vegetales, puesto que presentan buena efectividad antibiótica, y baja citotoxicidad en mamíferos. Sin embargo, se requiere un mayor número de estudios sobre el mecanismo de acción de estos fito-fármacos y sobre la estabilidad de sus componentes para que puedan llegar a ser una fuente importante de nuevos agentes antimicrobianos.

Para responder a esta problemática, el presente estudio tuvo como objetivo investigar los cambios metabólicos en *Escherichia coli* durante el tratamiento con el aceite esencial de *Lippia organoides*. La Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI<sub>50</sub>) del aceite esencial se determinó en 0,24 mg/mL mediante el método microdilución en caldo. La investigación del modo de acción antimicrobiano del aceite esencial se realizó mediante una aproximación de metabolómica no dirigida basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Esta metodología, permitió identificar de manera presuntiva, la modulación diferenciada de 59 metabolitos bacterianos, asociados con el metabolismo de la espermina y la espermidina, el ciclo de la urea, el metabolismo del triptófano y el ácido indol acético, la degradación de la lisina, la degradación de la leucina y la valina, y el ciclo de los ácidos tricarbónicos como las principales rutas metabólicas afectadas por el aceite esencial de *L. organoides*. De igual manera, el estudio permitió establecer, la posible presencia de productos degradados de componentes minoritarios de este aceite esencial. Los resultados de este estudio indican los posibles targets afectados en el metabolismo de *E. coli* y, sirven como base para investigar estrategias que permitan mejorar la efectividad antibiótica de estos fito-fármacos y, en consecuencia, fortalecer su uso como una fuente sostenible de fitoterapéuticos.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de ciencias. Escuela de Química. Pregrado en Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli, Ph.D. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortíz, Ph.D.

### Abstract

**Title:** Mass spectrometry-based metabolomic analysis of the antimicrobial effect of *Lippia origanoides* essential oil on *Escherichia coli* ATCC 11775\*

**Author:** Luis Eduardo Acuña Garcia\*\*

**Key Words:** Essential oil, Antimicrobial Agent, Untargeted metabolomics, mode of action

**Description:** The loss of effectiveness of classical antimicrobials to treat bacterial infections has shown the urgency with which research and development of new antibiotics are required. One of the microorganisms of greatest concern to various health authorities is *Escherichia coli*, due to its ability to develop resistance mechanisms and its prevalence in hospital environments. One of the sustainable alternatives to substitute classical antimicrobials is the use of essential oils and plant extracts since they present good antibiotic effectiveness and low cytotoxicity in mammals. However, more studies on the mechanism of action of these phytopharmaceuticals and on the stability of their components are required for them to become an important source of new antimicrobial agents.

In response to this problem, the present study aimed to investigate the metabolic changes in *Escherichia coli* during the antibacterial action of the essential oil of *Lippia origanoides*. The minimum inhibitory concentration<sub>50</sub> of the essential oil was established as 0,24 mg/mL and was determined by the micro-broth dilution method. The investigation of the antimicrobial mode of action of the essential oil was performed using a non-targeted metabolomics approach based on liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry. This methodology made it possible to presumptively identify 59 differential bacterial metabolites and to establish that the metabolic pathways affected by treatment with the essential oil corresponded to spermine and spermidine metabolism, the urea cycle, tryptophan, and indole acetic acid metabolism, lysine degradation, leucine and valine degradation, and the tricarboxylic acid cycle. Likewise, the study allowed us to establish for the first time, the possible presence of degraded products of minor components of this essential oil.

The results of this study are intended to serve as a basis for investigating strategies to improve the antibiotic effectiveness of these phytopharmaceuticals and, consequently, to strengthen their use as a sustainable source of drugs.

---

\* Degree Work

\*\* Facultad de ciencias. Escuela de Química. Pregrado en Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli, Ph.D. Codirector: Marlon Yesid Cáceres Ortíz, Ph.D.

## Introducción

La disminución en la efectividad de los antibióticos es una preocupación creciente para organismos de control como la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance, 2019). En un informe de la secretaría general de la ONU, se proyecta que para el 2050, el número de muertes por infecciones de patógenos que no responden a los antibióticos podría superar a nivel global los diez millones anualmente. Una de las bacterias patógenas que han sido motivo de alerta para varios entes regulatorios a nivel mundial es *Escherichia coli*. Esto se debe al alto riesgo en la salud que podría provocar una infección por *E. coli*, sobre todo en niños menores de cinco años y adultos mayores de 60, a la alta frecuencia con la que este microorganismo es aislado en ambientes comunitarios y hospitalarios, y a la resistencia que presenta a diferentes clases de antibióticos (Gómez-Duarte, 2014).

Ante un panorama en el que los antimicrobianos más ampliamente utilizados ya no surtan efecto para tratar infecciones bacterianas, la OMS ha instado urgentemente a que se investigue y desarrollen de manera sustentable, nuevos agentes antibacterianos, que puedan conjurar una eventual crisis sanitaria mundial por cuenta de la pérdida de efectividad de los antibióticos (Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance, 2019; Shrivastava *et al.*, 2018). Una de las alternativas más llamativas que ha surgido desde la investigación de productos naturales, es el uso de los aceites esenciales y extractos vegetales. Estas complejas mezclas de metabolitos secundarios bioactivos han presentado excelentes propiedades antibacterianas contra microorganismos patógenos, en términos de efectividad antibiótica y baja toxicidad en los

mamíferos (Choudhari, 2017; Tariq *et al.*, 2019). Actualmente, los aceites esenciales y extractos vegetales se encuentran en el foco de las investigaciones en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que permitan tratar procesos bacterianos relacionados con la resistencia como lo son la formación de biopelículas y la comunicación celular (Silva *et al.*, 2016).

A pesar de las propiedades mencionadas, actualmente los aceites esenciales y extractos vegetales no son una fuente considerable para la producción de antibióticos y antimicrobianos de grado farmacéutico. Esto se debe a la dificultad que existe para obtener propiedad intelectual sobre productos naturales que incorporan aceites esenciales en su formulación, el reto que presenta para los controles de calidad el análisis de mezclas complejas de sustancias, y principalmente, la falta de conocimiento existente acerca de los mecanismos de acción que están detrás de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (Rempe *et al.*, 2017).

Ante esta coyuntura, la metabolómica (la cual es la ciencia óhmica encargada de analizar los cambios en la expresión celular de compuestos de bajo peso molecular), se presenta como una opción llamativa para estudiar el mecanismo de acción de los aceites esenciales, puesto que esta misma proporciona una “fotografía instantánea” del estado metabólico de la célula (Cavaliere *et al.*, 2011). Además, esta ciencia óhmica permite superar algunos de los inconvenientes que las metodologías convencionales de estudio de mecanismos de acción de fármacos presentan. Tales como el alto consumo de tiempo, recursos económicos, y de reactivos de las pruebas bioquímicas estandarizadas (Van Der Werf *et al.*, 2005); y la pérdida de información sobre múltiples dianas celulares que implican los pasos de aislamiento de los componentes activos de los aceites esenciales en las metodologías de estudio convencional. (Lou *et al.*, 2015; Tuyiringire *et al.*, 2018).

En Colombia, varias investigaciones han comprobado que los aceites esenciales provenientes de especies de flora nativa presentan una buena actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas (Cáceres *et al.*, 2020; Díaz *et al.*, 2015; Ortega-Cuadros *et al.*, 2018). Sin embargo, la falta de conocimiento sobre el posible mecanismo de acción subyacente a la actividad biológica ha impedido que los aceites esenciales de plantas medicinales colombianas se contemplen como una fuente viable para el desarrollo de antibióticos y antimicrobianos de grado farmacéutico. Frente a esta problemática, el presente estudio se planteó como objetivo, determinar el efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre el metabolismo de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos en este trabajo y plasmados a lo largo de este manuscrito, permitieron contestar la pregunta sobre ¿cuáles son los posibles targets o dianas celulares afectados por la acción antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre *Escherichia coli*? Se espera que, a futuro, este tipo de investigaciones permitan fortalecer el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos basados en productos naturales de especies vegetales colombianas.

La presente investigación fue desarrollada como parte del proyecto N° 11 “Desarrollo de nuevos productos con actividad antimicrobiana, insecticida y repelente a partir de moléculas aisladas de plantas aromáticas colombianas” adscrito al programa Bio-reto XXI-15:50 de la convocatoria Ecosistema Científico del Programa Colombia Científica. Programa que se encargó de desarrollar productos para sectores industriales a partir de aceites esenciales o extractos vegetales de plantas aromáticas colombianas. Dentro del marco del proyecto 11, en el grupo de investigación en bioquímica y microbiología GIBIM, se desarrollaron las investigaciones que incluyeron la selección de los aceites esenciales con mejor actividad antibacteriana y, la búsqueda

Análisis metabolómico basado en espectrometría de masas del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre *Escherichia coli* ATCC 11775

17

de posibles modos de acción antimicrobianos de los mismos frente a bacterias patógenas mediante el uso de herramientas metabolómicas, proteómicas y transcriptómicas.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Determinar el efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre el metabolismo de *Escherichia coli*

### 1.2 Objetivos Específicos

- Identificar el perfil metabólico de *Escherichia coli* al ser tratada con el aceite esencial de *Lippia origanoides*
- Establecer las rutas metabólicas afectadas por el aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre las células plantónicas de *Escherichia coli*

## 2. Marco Teórico

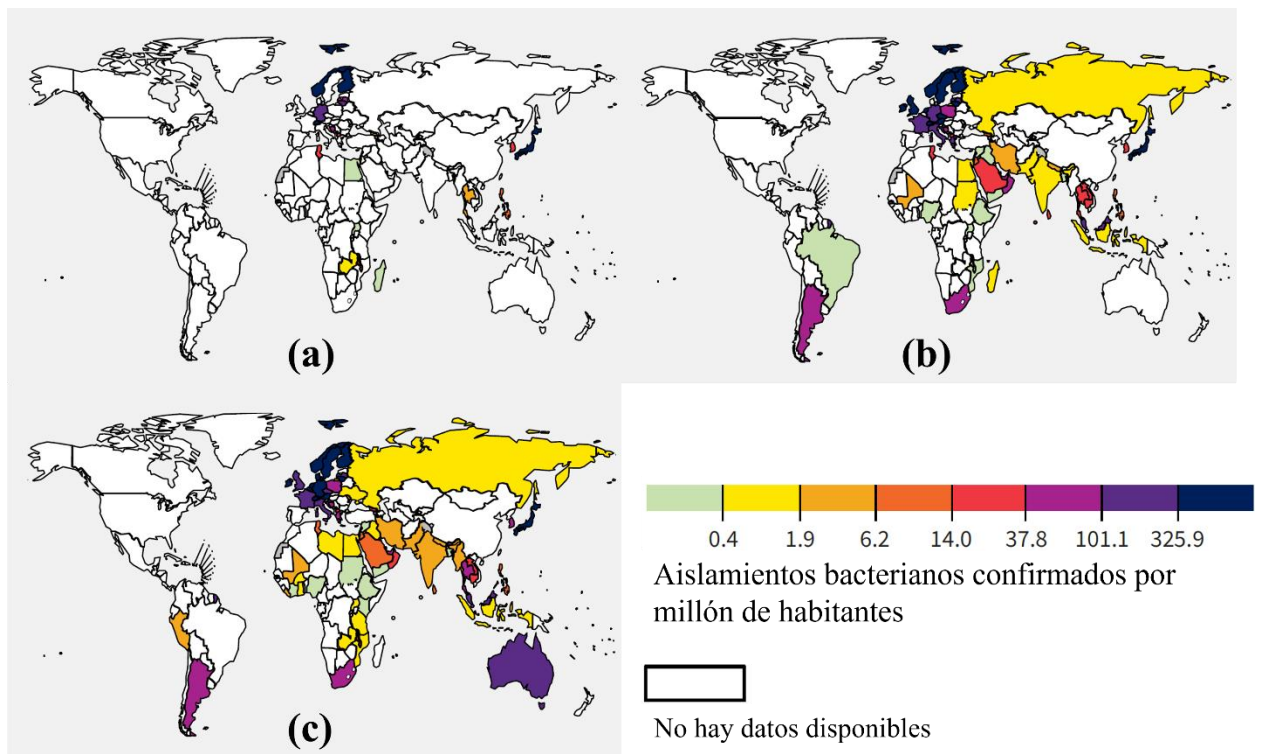
### 2.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria bacilar Gram negativa perteneciente a la familia de las enterobacterias. En el ser humano y en la mayoría de los vertebrados de sangre caliente, *E. coli* hace parte del microbioma intestinal y vive de manera simbiótica con su hospedador; sin embargo, existen cepas de este microorganismo que son patógenas del ser humano y representan un riesgo para la salud. La colonización de *E. coli* en otros tejidos del cuerpo conlleva a la ocurrencia de cuadros de enfermedad como infecciones urinarias, enfermedad diarreica aguda, intoxicación alimentaria, infecciones del torrente sanguíneo y encefalitis; las cuales son condiciones que ponen en riesgo la vida de ciertos grupos poblacionales (Mueller *et al.*, 2022).

La resistencia antimicrobiana que presenta *E. coli* es una problemática preocupante para diferentes entes de vigilancia. Según reportes de la Organización Mundial de la salud (OMS), a nivel global, desde el 2016 se ha venido presentando un incremento de más del 20% en el número de aislamientos de *E. coli* resistente a antibióticos de primera y segunda generación (World Health Organization, 2022). Por otra parte, en los países en vías de desarrollo, cada vez son más frecuentes las infecciones resistentes de este patógeno que conllevan a muertes por intoxicación alimentaria y enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años (Gómez-Duarte, 2014); y por falla renal grave en adultos mayores de 65 años (National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (U.S.) & Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2016). Según el reporte más reciente del Sistema Global de Uso y Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana (GLASS por sus siglas en inglés), de la OMS, *E. coli* es el patógeno bacteriano más frecuentemente asociado a

infecciones resistentes en el torrente sanguíneo y en el tracto urinario (World Health Organization, 2022).

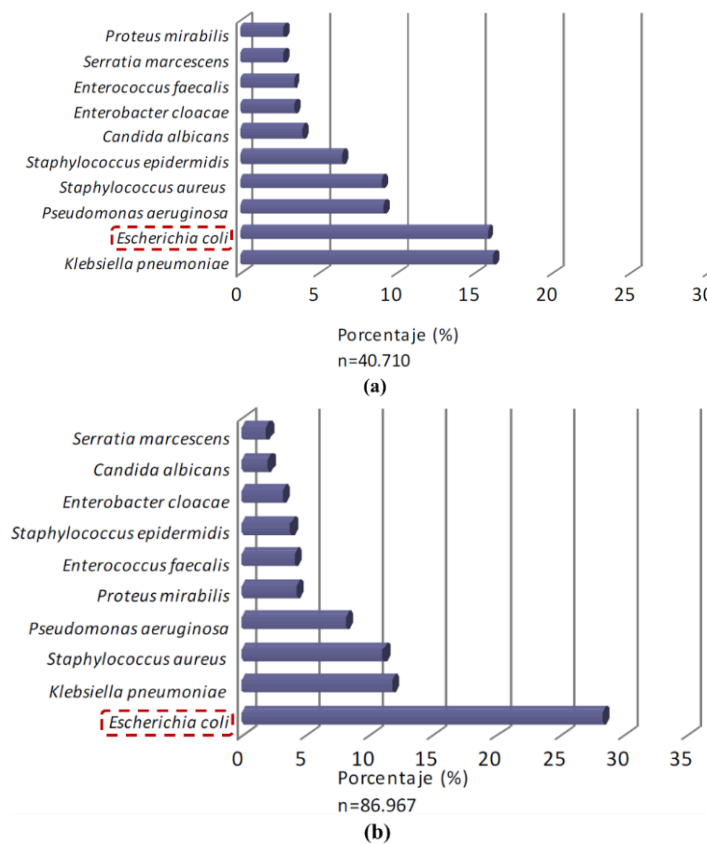
De acuerdo con el mismo reporte del GLASS, desde el 2016, se ha venido presentando un incremento en el porcentaje a nivel mundial de casos de infecciones resistentes de este patógeno a antibióticos de primera y segunda generación, como la ampicilina y las fluoroquinolonas; las cuales son los fármacos más ampliamente usados para tratar los cuadros clínicos asociados a este microorganismo. Igualmente, es preocupante que la resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación esté presentado un incremento gradual a nivel mundial en el mismo periodo de tiempo descrito (Figura 1) (World Health Organization, 2022).



**Figura 1.** Número de aislamientos de *Escherichia coli* confirmados como resistentes a cefalosporinas de tercera generación por cada millón de habitantes presentados en el 2016 (a), 2018 (b), y 2020 (c). Casos reportados por el sistema GLASS en su informe de 2022. Adaptado de: (World Health Organization, 2022):

En Colombia, el organismo de control encargado de monitorear los aislamientos y brotes de bacterias resistentes es el Instituto Nacional de Salud (INS). En el informe de resultados de vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud del año 2019, el INS documentó que *E. coli* fue el principal patógeno bacteriano aislado en ambientes hospitalarios (figura 2) (Instituto Nacional de Salud, 2019). De manera muy preocupante, el INS a través de sus boletines epidemiológicos reportó que, en el 2016, se presentó

el primer caso de un aislamiento de *E. coli* resistente a la colistina. El evento se presentó en un caso de infección de vías urinarias de una mujer del departamento de Santander (Saavedra *et al.*, 2016). Este hecho puede representar una seria amenaza para el sistema de salud nacional, puesto que la colistina es considerada un antibiótico de último recurso para tratar infecciones resistentes que no responden a ningún otro tratamiento.



**Figura 2.** Porcentaje de aislamientos de *Escherichia coli* en servicios hospitalarios en Colombia durante 2018 en salas de unidad de cuidados intensivos UCI (a) y salas no UCI (b). Adaptado de: (Instituto Nacional de Salud, 2019)

## **2.2. Agentes antimicrobianos y pruebas de evaluación *in vitro***

Los antimicrobianos son sustancias producidas por un ser vivo (o modificadas a partir de estos) que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otro ser vivo; esta capacidad se determina a través de metodologías estandarizadas que son definidas por algún organismo de control internacionalmente reconocido como la Organización Internacional de Estandarización, ISO (por sus siglas en inglés); o el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI (por sus siglas en inglés) (CLSI, 2015).

La susceptibilidad de un microorganismo frente a un agente antimicrobiano puede ser evaluado mediante dos categorías principales de pruebas. La primera corresponde a las pruebas de difusión en disco, en las cuales se determina el diámetro de un halo de inhibición, el cual es provocado al colocar un disco absorbente impregnado con agente antimicrobiano sobre la superficie de una placa de agar en la que se desarrolla el cultivo bacteriano. Por otra parte, hay una categoría de pruebas que determinan la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual corresponde a la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe un determinado porcentaje del crecimiento de una bacteria; en esta categoría se incluyen los métodos de dilución en agar, dilución en caldo y micro-dilución en caldo (Tenover, 2009).

El método empleado de manera más amplia para evaluar la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales es la micro-dilución en caldo (Chouhan *et al.*, 2017). En esta metodología, se dispone en una microplaca de 96 pozos, disoluciones del AE ajustadas a un rango de concentración deseado. Posteriormente, un inóculo bacteriano, el cuál es una suspensión de células del microorganismo ajustada a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), es dispuesta en los pozos de la microplaca a ensayar

(CLSI, 2015). La inhibición en el crecimiento del microorganismo se monitorea de manera indirecta a través de una medición de turbidimetría del medio de cultivo empleado en el ensayo (Tenover, 2009). Finalmente, se compara el crecimiento del microorganismo sin tratamiento con el presentado en las concentraciones de AE evaluadas y se determina el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI<sub>50</sub>), la cual corresponde a la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe al menos el 50% del crecimiento bacteriano.

### **2.3. Aceites esenciales como fuente de sustancias bioactivas y antimicrobianas**

Los aceites esenciales (AE) son sustancias que se pueden encontrar en la mayoría de las especies vegetales, en estructuras como las flores, hojas, raíces, corteza, frutos y semillas (Ungvarsky, 2020). En especies vegetales, los aceites esenciales se presentan como mezclas complejas, poco viscosas y bastante volátiles de compuestos orgánicos hidrófobos de bajo peso molecular. Estas características son las que otorgan a los AE su distintivo olor fragante, notorio rasgo que ayuda a diferenciarlos de los aceites vegetales, los cuales son mezclas de ácil-glicerol, ácidos grasos libres y esteroides que se encuentran mayoritariamente en semillas y de los que derivan productos como los aceites de cocina y la mantequilla vegetal (Thomas *et al.*, 2015).

Los AE son sustancias que en las plantas provienen de rutas metabólicas que no están directamente implicadas en procesos que son esenciales para mantener el crecimiento, la reproducción y en general la vida vegetal (Stashenko *et al.*, 2012). Los AE por tanto se categorizan como metabolitos secundarios, mientras que otras sustancias que se relacionan con el metabolismo de azúcares, aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos son denominados metabolitos primarios, pues son indispensables para la vida de la planta. Los AE se caracterizan por presentar una gran

diversidad química de metabolitos y a la vez, una alta complejidad estructural (Kahl, 2015). Dentro de las clases químicas que los componen se encuentran los alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres, fenoles, polifenoles, terpenoides, carotenoides y otros derivados de estos. En las diversas matrices vegetales, los AE son sustancias que pueden llegar a representar entre 0,5% y el 6,0% del peso de una planta (Stashenko, 2009).

Los compuestos presentes en los AE pueden cumplir con diversas funciones que aseguran la supervivencia de las plantas. Algunos de los metabolitos secundarios presentes en los AE contribuyen a la defensa de la planta frente a depredadores, previenen la colonización de plagas, ayudan a que la planta se adapte a condiciones climáticas como sequía y altos niveles de radiación solar (Kahl, 2015); y pueden servir como mensajeros químicos en canales de comunicación con polinizadores y otras plantas (Stashenko, 2009). Se ha reportado que los AE de diversas especies vegetales presentan una considerable actividad bactericida, y que incluso tienen el potencial de disminuir la resistencia a antimicrobianos y actuar como supresores de factores de virulencia de diversas bacterias que afectan al ser humano (Schillaci *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016; Snoussi *et al.*, 2015; Wijesundara & Rupasinghe, 2019).

#### **2.4. Los aceites esenciales como agentes antimicrobianos**

Diversos autores han descrito que los AE tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano y actuar como poderosos agentes desinfectantes. Además, se ha reportado en diferentes investigaciones que pueden modular factores de virulencia de bacterias patógenas, afectar rutas metabólicas de importancia que intervienen en procesos de infección y bloquear mecanismos que favorecen la aparición de resistencia antimicrobiana, como la formación de

*biofilm* y la comunicación bacteriana (*Quorum-sensing*) (Silva *et al.*, 2016). Debido a esto, el uso de los AE ha empezado a considerarse como una alternativa atractiva a la hora de tratar y prevenir infecciones de cepas bacterianas multirresistentes (Silva *et al.*, 2016; Tariq *et al.*, 2019); cuya aparición comúnmente está relacionada con el uso extensivo de antibióticos y agentes antimicrobianos clásicos.

Varias investigaciones se han llevado a cabo y han logrado comprobar la eficacia de los AE como antioxidantes, antiinflamatorios, repelentes de insectos, antivirales, antimicóticos y antibacterianos (Pandey *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2016). La tabla 1 muestra algunas investigaciones recientes en las que los AE de diversas especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. Ante la problemática mundial de pérdida de efectividad de los antibióticos clásicos, una de las alternativas propuestas para encontrar nuevos agentes antimicrobianos es buscar en la fuente de fármacos más antigua de la humanidad: Los compuestos obtenidos de las plantas y árboles, que constituyen la base de las medicinas ancestrales y son el origen de principios activos de medicamentos.

El mecanismo de acción antimicrobiana frente a *E. coli* de diversos aceites esenciales aún no se ha dilucidado completamente. Diferentes investigaciones indican que los AE afectan la integridad de la membrana celular, interfieren en los procesos de respiración celular y el ciclo de Krebs, y afectan la síntesis de material genético y de algunas proteínas (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2021; X. Wang *et al.*, 2020). A pesar de que las pesquisas sobre el modo de acción antimicrobiano de los AE han sido abundantes, estas se han concentrado en examinar desde una perspectiva dirigida los procesos metabólicos centrales para la vida bacteriana.

Esta tendencia ha ocasionado que se esté omitiendo información valiosa sobre como los AE modulan procesos metabólicos de relevancia clínica como la aparición de resistencia antimicrobiana, la comunicación celular y la expresión de factores de virulencia. En este escenario es donde las ciencias “ómicas” y la química analítica pueden contribuir con una mirada más amplia y menos parcializada de los procesos metabólicos afectados por la acción antimicrobiana de los aceites esenciales.

**Tabla 1.** Actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales y extractos vegetales

Aceite esencial o extracto vegetal	Componente del aceite esencial o extracto vegetal asociado a la actividad biológica	Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria (CMI <sub>50</sub> ) (mg/mL)	Referencia
<i>Cymbopogon citratus</i> (AE)	Citral	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	1,32	(de Oliveira <i>et al.</i> , 2017)
<i>Cymbopogon citratus</i> , (AE)	Citral	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 35688	2,61	(de Oliveira <i>et al.</i> , 2017)
<i>Plectranthus amboinicus</i> , (AE)	Carvacrol	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina y ofloxacina	0,25	(Vasconcelos <i>et al.</i> , 2017)
<i>Thymus vulgaris</i> L., (AE)	<i>p</i> -cimeno, timol, carvacrol	<i>Bacillus cereus</i>	0,25	(Kang <i>et al.</i> , 2018)
<i>Juglans regia</i> L., extracto vegetal	Juglona	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (aislados clínicos)	4	(Dolatabadi <i>et al.</i> , 2018)
<i>Artemisia negrei</i> L., (AE)	$\alpha$ -Pinenos y camfeno	<i>Escherichia coli</i> ATB:57	6,25	(Chebbac <i>et al.</i> , 2021)
<i>Artemisia negrei</i> L., (AE)	$\alpha$ -Pinenos y camfeno	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,25	(Chebbac <i>et al.</i> , 2021)
<i>Mentha x piperita</i> , (AE)	Mentol, mentona	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,5	(Kang <i>et al.</i> , 2019)

<i>Origanum vulgare</i> , (AE)	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno	<i>Escherichia. coli</i> ATCC 25922	0,25	(Hao <i>et al.</i> , 2023)
<i>Origanum vulgare</i> , (AE)	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,25	(Hao <i>et al.</i> , 2023)

---

## 2.5. Herramientas metabolómicas para investigar mecanismos de acción antimicrobianos

La necesidad de tener más claridad en la manera en que actúa un agente antibacteriano es una problemática que se plantea en los estudios que buscan nuevas especies químicas con actividad biológica. Sin importar que tan prometedora sea la acción antimicrobiana de una sustancia, es necesario conocer los mecanismos de acción que subyacen a la actividad biológica para que la especie química pueda, a futuro, desarrollarse en una alternativa terapéutica. En la actualidad existen diversas metodologías que permiten analizar el efecto de una sustancia biológicamente activa sobre el metabolismo de un ser vivo. Dichas metodologías permiten estudiar los cambios en la expresión de diversas biomoléculas de interés y son ampliamente conocidas como ciencias ómicas.

Las ciencias ómicas estudian la estructura, función e identidad química de conjuntos bien definidos de las biomoléculas que componen un organismo. El propósito general de las ciencias ómicas es ayudar a comprender mejor el funcionamiento biológico de una célula o de un organismo complejo. En tal sentido, las aplicaciones de estas metodologías pueden incluir el diagnóstico de enfermedades, la identificación de los efectos sobre el metabolismo que produce la exposición a toxinas o condiciones de estrés, e incluso la determinación de mecanismos de acción de fármacos (Cox *et al.*, 2014; Theodoridis *et al.*, 2013). A grandes rasgos, puede decirse que las

ciencias ómicas se dividen en: 1) La genómica, cuyo objeto de estudio es el ADN y la expresión de los genes; 2) la transcriptómica que estudia los ARN mensajeros y los cambios en su expresión; 3) la proteómica que investiga las diferencias en la expresión de múltiples proteínas y, 4) la metabolómica, la cual se encarga de identificar y cuantificar todas las especies químicas de bajo peso molecular de un ser vivo (Cavaliere *et al.*, 2011).

Entre las ciencias ómicas, la metabolómica se define como el análisis exhaustivo de todos los metabolitos sintetizados por un organismo, es decir, la identificación y cuantificación de todas las especies químicas de bajo peso molecular (<1500 Dalton) de un organismo (Kuehnbaum & Britz-McKibbin, 2013). A diferencia de la transcriptómica y la proteómica, la metabolómica permite relacionar de una manera directa los cambios en su conjunto de moléculas de estudio con diferencias en la actividad metabólica. Los cambios en el transcriptoma o en el proteoma de un organismo no implican necesariamente variaciones en su bioquímica, pero los cambios en el metaboloma sí proporcionan “fotografías instantáneas” del estado metabólico de un organismo. En este sentido, la metabolómica puede proporcionar más información funcional, puesto que el metaboloma es considerado el “estadio final en una cadena de eventos bioquímicos que van desde la replicación de la información genética, hasta la síntesis y modulación de los metabolitos”. Además, el fenotipo metabólico es la imagen más fiel del estado de un sistema biológico, dado que los metabolitos tienen funciones celulares bien definidas que también se pueden relacionar con las condiciones ambientales a las que está sometido un organismo (Cavaliere *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2011)

La metabolómica puede ser empleada como una herramienta para describir el estado bioquímico de un organismo desde dos aproximaciones diferentes. La primera, consiste en

la identificación y cuantificación de metabolitos con características conocidas, los cuales son previamente seleccionados. Estas sustancias por lo general son químicamente similares y pueden ser sustratos de una enzima, productos de la catálisis de una proteína o miembros de una misma ruta metabólica. Tal aproximación, implica el trabajo con una ventana de analitos limitada y se denomina **metabolómica dirigida** (Theodoridis *et al.*, 2013). Por otro lado, existe una aproximación más amplia, que busca identificar todos los metabolitos que puedan ser medidos en una muestra; dicha metodología mide una ventana de analitos más amplia y no tiene un enfoque parcializado, sino que trata de medir todas las moléculas pequeñas (de bajo peso molecular) que hacen parte de un sistema biológico. Esta aproximación se conoce como **metabolómica no dirigida** (Theodoridis *et al.*, 2013).

El monitoreo y la cuantificación absoluta de un grupo específico de metabolitos es una tarea analítica que la metabolómica dirigida frecuentemente lleva a cabo. Esta metodología se ha empezado a utilizar ampliamente en el análisis de la metabolización o la toxicidad de un fármaco, el monitoreo de un biomarcador específico asociado a una enfermedad, y principalmente, el diseño, validación y certificación de pruebas clínicas que monitorean analitos como glucosa en sangre, hormonas en suero o aminoácidos en orina (Cavaliere *et al.*, 2011; Hopfgartner *et al.*, 2013). A diferencia de las metodologías dirigidas, la metabolómica no dirigida no implica una validación ni cuantificación rigurosa, esto permite que sea aplicada a problemas analíticos que requieran el monitoreo de perfiles metabólicos completos (o de mayor complejidad). En tal orden de ideas, se pueden nombrar diversas aplicaciones como el análisis de la bioquímica de enfermedades como el cáncer y la artritis, la identificación de especies bacterianas por medio de sus perfiles metabólicos, el descubrimiento de nuevos fármacos, y finalmente, la identificación de

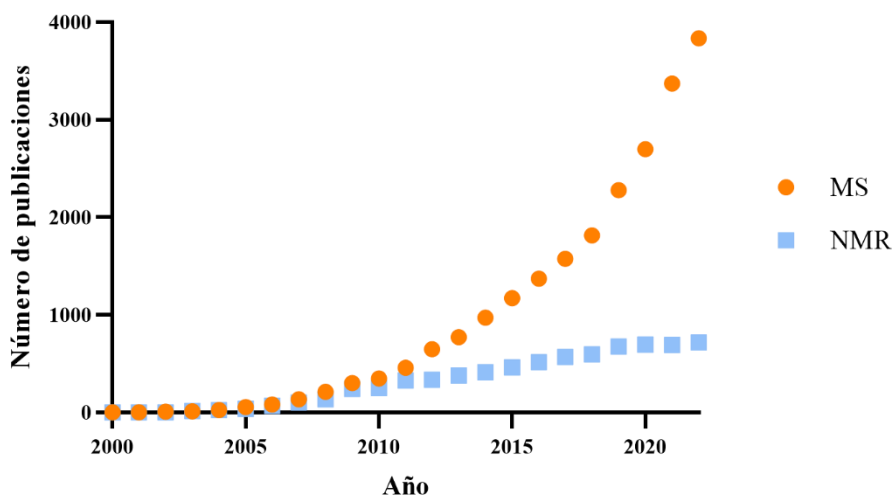
mecanismos de acción de moléculas con actividad biológica (Favre *et al.*, 2017; Lou *et al.*, 2015; Theodoridis *et al.*, 2013).

La metabolómica es una herramienta efectiva que puede ser empleada para describir los cambios en el metabolismo bacteriano que produce la exposición a un agente con actividad antibacteriana (J. Chen *et al.*, 2020). Las mediciones de los cambios en la abundancia de los metabolitos celulares permiten entender cómo el metabolismo bacteriano se adapta para responder a la presión generada por un determinado agente antimicrobiano. Dichos cambios en la actividad metabólica permiten identificar qué rutas biosintéticas se ven afectadas por el agente antibacteriano, esto brinda información necesaria para poder formular un posible mecanismo de acción (Tuyiringire *et al.*, 2018). La metabolómica puede emplearse para determinar mecanismos de acción de fármacos o de compuestos con actividad biológica desde una perspectiva dirigida, la cual emplea pruebas directas para cuantificar metabolitos específicos; también puede emplearse desde un enfoque no dirigido y medir un conjunto amplio de metabolitos para identificar diferencias significativas del metaboloma al aplicar los tratamientos con el agente antibacteriano (Rempe, 2016).

En términos de publicaciones, existen más trabajos que emplean aproximaciones no dirigidas, pues proporcionan un mayor alcance en cuanto a la cantidad de analitos que puede ser examinada (Theodoridis *et al.*, 2013). Sin embargo, las metodologías dirigidas complementan las no dirigidas posibilitando la validación de los datos, a pesar de que su enfoque puede limitar el alcance de los mecanismos que pueden ser identificados, lo cual no es deseable, en especial cuando se busca definir modos de acción de nuevos agentes con actividad biológica (Rempe, 2016).

## **2.6. Metabolómica no dirigida basada en cromatografía líquida y espectrometría de masas**

Como se ha explicado, los estudios metabolómicos y en especial, los no dirigidos, implican la medición simultánea de diversos analitos, por esta razón, las técnicas de análisis instrumental que se emplean en estos deben ser versátiles, en el sentido que puedan manejar la diversidad química de los analitos y el amplio rango dinámico de concentraciones en las que se encuentran (Tang, 2011). De acuerdo con estas necesidades, las dos técnicas instrumentales que más han sido empleadas para hacer metabolómica son la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) y la resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés). Ambas técnicas son altamente reproducibles, sensibles, permiten manejar una gran diversidad de analitos y brindan información que lleva a la identificación confirmatoria. Sin embargo, la larga tradición del acoplamiento de MS con técnicas de separación cromatográficas y la sensibilidad de varios órdenes de magnitud superior a NMR, ha hecho que la espectrometría de masas tenga una mayor popularidad en estudios metabolómicos (Ebbels & De Iorio, 2011) (Figura 3). En cuanto a los estudios de metabolómica no dirigida, la mayoría de las aplicaciones han empleado metodologías de MS de alta resolución, llevadas a cabo principalmente con los analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF), Orbitrap y resonancia de ion-ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR) (Ebbels & De Iorio, 2011).



**Figura 3.** Popularidad de la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) en estudios metabólicos desde 1999 hasta 2022. Número de publicaciones reportadas en la base de datos de SCOPUS usando como ecuación de búsqueda las frases “*Untargeted Metabolomics*” AND “*Mass spectrometry*” y “*Untargeted-Metabolomics*” AND “*NMR*”

La cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas es la técnica más ampliamente utilizada para estudios metabólicos no dirigidos. Esto se debe a la posibilidad que esta tecnología brinda para escoger los parámetros relacionados con la separación y la detección de un amplio rango de metabolitos celulares, y al mismo tiempo permite analizar especies químicas en un amplio rango dinámico de concentraciones (Cox *et al.*, 2014; Theodoridis *et al.*, 2013). En cuanto al modo de elución de la cromatografía líquida, la mayoría de los estudios no dirigidos se realizan en fase reversa, principalmente por el acoplamiento con espectrometría de masas, y también, debido a la compatibilidad de la técnica con la naturaleza predominante de los metabolitos en el medio celular. De la misma manera, la interfaz de ionización por electrospray

(ESI) suele ser la escogida para aproximaciones no dirigidas (Cox *et al.*, 2014). A pesar de las ventajas mencionadas, es necesario recordar que una sola técnica instrumental no tiene la capacidad de analizar el metaboloma completo de una célula, tampoco existe un solvente universal ni una metodología de extracción que permita obtener todos los metabolitos de una célula; sin embargo, para estudios con un carácter preliminar y de hipótesis libre, como lo son las aproximaciones no dirigidas, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas desempeña un buen rol para identificar procesos metabólicos alterados.

## **2.7. Procesamiento de datos y flujo de análisis estadísticos en estudios metabolómicos no dirigidos**

La identificación de las especies químicas en las metodologías no dirigidas inicia por el tratamiento preliminar de los datos crudos. En el caso de las metodologías basadas en HPLC-MS los archivos “*raw* o crudos” corresponden a listas de triadas de datos de tiempo de retención ( $t_R$ ), relación masa sobre carga ( $m/z$ ); y número de iones (Ebbels & De Iorio, 2011). En la mayoría de los estudios metabólicos los datos no son analizados en estos formatos crudos, debido a su mayor complejidad, la presencia de factores que puedan confundir y a la existencia de formatos de archivos propios de cada fabricante. Por lo tanto, es necesario recurrir a herramientas informáticas que convierten estos datos crudos (propios de cada sistema analítico) en archivos con un formato universal que puedan ser leídos, tratados e interpretados estadísticamente mediante herramientas bioinformáticas (Theodoridis *et al.*, 2013). Así los archivos crudos pueden ser leídos por las plataformas de procesamiento, donde se realiza la detección de picos, deconvolución, corrección de la deriva de  $t_R$ , sustracción del ruido de fondo e integración de los picos. Estas plataformas

digitales permiten tener en cuenta los parámetros utilizados en las etapas de separación cromatográfica y detección mediante espectrometría de masas. Los datos resultantes de este tratamiento preliminar, finalmente se organizan en arreglos matriciales, en los que cada vector representa la réplica de una muestra y los componentes de este, la intensidad medida de los iones que componen su espectro de masas completo (Ebbels & De Iorio, 2011).

La manera en que se realizan los análisis estadísticos en metodologías de metabolómica no dirigida depende en gran medida de los objetivos del estudio. En general, las metas principales de cualquier análisis estadístico metabólico son la clasificación y diferenciación de los individuos estudiados en diferentes grupos basados en sus perfiles químicos; la determinación de diferencias significativas entre los grupos de muestras con relación a un fenotipo, tratamiento o estado biológico de interés; y finalmente la identificación de los metabolitos diferenciales que expliquen las diferencias observadas en los perfiles químicos (Ebbels & De Iorio, 2011).

En los estudios que involucran la determinación del efecto de un tratamiento, los métodos de análisis estadístico multivariado más utilizados son el Análisis por Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés, Principal Component Analysis) y el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés) (Smilde *et al.*, 2013). Ambos métodos buscan hacer transformaciones lineales de variables de significancia para generar un par de variables nuevas, ortogonales entre sí las cuales son denominadas como “componentes”. Mediante los cuales se puede explicar la varianza observada en los perfiles químicos de las

muestras y simultáneamente se consigue disminuir la dimensionalidad de las matrices de datos que las representan (Y. Chen *et al.*, 2022).

El análisis PCA, se basa en una búsqueda no supervisada de la pareja de componentes principales que puedan explicar la mayor cantidad de varianza observada, esta misma se representa gráficamente mediante proyecciones de cada uno de los vectores de la matriz (cada muestra) sobre los dos componentes. El resultado de estas operaciones es una gráfica de scores, en la que los ejes coordenados corresponden a los dos componentes principales, y cada punto es una representación que guarda información del espectro de masas completo de una réplica (Miller & Miller, 2018). De acuerdo con lo anterior, los puntos que presentan una agrupación tienen perfiles químicos similares y, en contraposición, los puntos que se encuentran más alejados en el gráfico de scores presentan perfiles químicos diferentes. Esto permite categorizar las muestras estudiadas de acuerdo con un criterio no supervisado basado en la similitud química.

De manera similar al PCA, el PLS-DA también busca encontrar semejanzas y diferencias entre los perfiles metabólicos de las muestras mediante los gráficos de score, sin embargo, a diferencia del PCA, este método multivariado tiene en cuenta la preexistencia de grupos de muestras definidos, por lo que busca explicar de manera más eficiente la varianza presentada entre los dos grupos previamente definidos mediante un modelo de regresión. Por otra parte, El PLS-DA también permite realizar el proceso de validación cruzada mediante el estadístico  $Q^2$ , este valor es una medida del error del modelo matemático para categorizar y predecir la pertenencia de las muestras de estudio a un grupo según la similitud química de las mismas (Szymańska *et al.*, 2012). En estudios de metabolómica, este procedimiento de validación permite asegurar que los

metabolitos seleccionados como posibles biomarcadores de algún efecto de interés están contribuyendo directamente a explicar las diferencias observadas en la separación de los gráficos de Score del PLS-DA (Pang *et al.*, 2022).

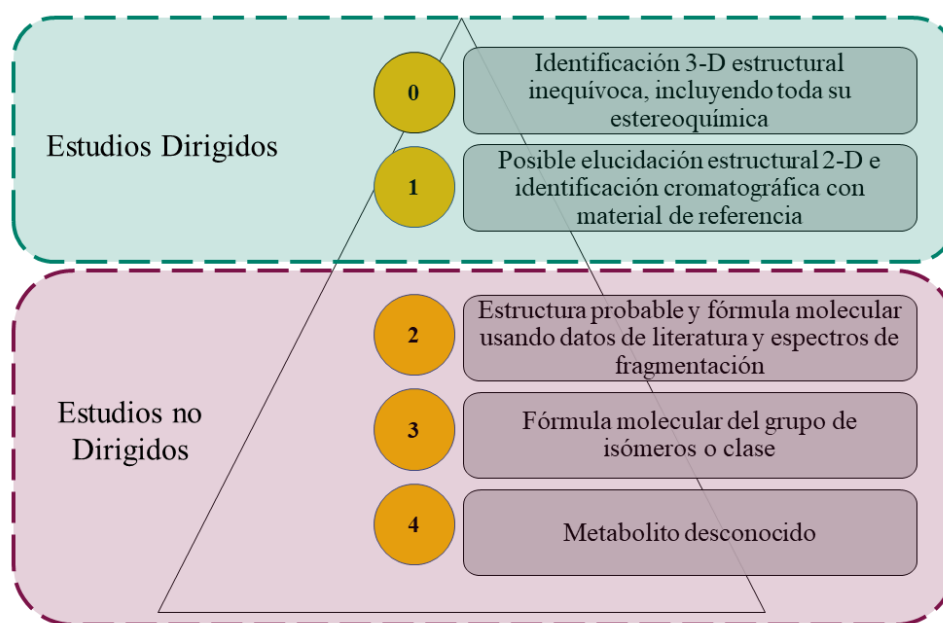
Ambos métodos de análisis multivariados son ampliamente utilizados en estudios metabólicos, y sus resultados deben ser interpretados de manera conjunta, para evitar los problemas de sobreajuste de los datos metabolómicos producto de los modelos de regresión propios del PLS-DA (Y. Chen *et al.*, 2022).

Una vez ha sido establecida la clasificación de las muestras mediante los métodos mencionados, usualmente se suele seguir con una estrategia que permita evaluar la significancia estadística de las relaciones ( $m/z$ ) responsables de las agrupaciones formadas. Para este fin se emplean métodos estadísticos univariados como las gráficas de volcán, el análisis de las veces de cambio (fold-change) y la prueba t de Student (Y. Chen *et al.*, 2022). Estos métodos permiten encontrar una serie de características de relación masa carga (o *features*, que representan un compuesto químico) que superan un umbral de significancia estadística determinado y por lo tanto constituyen posibles metabolitos modulados de manera diferente por la acción del tratamiento.

Los análisis mencionados hasta el momento son, por lo general, la parte que demanda más tiempo y esfuerzo del investigador en los estudios metabolómicos (Theodoridis *et al.*, 2013). Por lo que estas actividades deben hacerse antes de continuar con la identificación de los metabolitos afectados por el tratamiento. Las relaciones ( $m/z$ ) de relevancia estadística son luego sometidas al proceso de anotación, el cual consiste en generar listas de posibles candidatos a partir de su búsqueda en diferentes bases de datos. Una vez se establecen cuáles son los posibles metabolitos

modulados diferencialmente, se procede a realizar la identificación presuntiva o confirmatoria (según el caso) de los mismos (Hopfgartner *et al.*, 2013).

Al igual que gran parte del flujo de trabajo en los estudios metabolómicos, la identificación de los metabolitos también depende del tipo de estudio y de los objetivos que se hayan planteado. De manera general, la sociedad internacional de metabolómica recomienda que para los estudios no dirigidos se llegue hasta un nivel de identificación presuntiva, en el que se establezca la fórmula molecular y la estructura probable del metabolito (Gil-De-La-Fuente *et al.*, 2019); por otra parte, para las investigaciones basadas en metodologías dirigidas es necesario llegar a la identificación inequívoca y confirmatoria de los analitos (Figura 4). Lo anterior está en consonancia con lo expuesto en la sección 2.5. puesto que los estudios no dirigidos buscan categorizar un conjunto de individuos o muestras, de acuerdo con diferencias globales en los perfiles metabólicos, e identificar cómo el metabolismo de un ser vivo se modula en respuesta a un determinado tratamiento o condición de estrés biótico o abiótico. Por otro lado, los estudios dirigidos se centran en la confirmación y validación de marcadores biológicos previamente definidos, que puedan servir de base para elaborar modelos predictivos, los cuales pueden ser usados para pronosticar alguna propiedad biológica de interés.



**Figura 4.** Niveles de certeza en la identificación de metabolitos definidos por la sociedad de metabolómica. Adaptado de: (Gil-De-La-Fuente *et al.*, 2019)

La asignación de la identidad química de los metabolitos en estudios no dirigidos se realiza mediante la comparación de las masas exactas y las abundancias de los picos diagnósticos encontrados en el modo de operación *full-scan* con información registrada en librerías de espectros de masas como Metlin, ChemSpider, Human Metabolome Database (HMDB), MassBank-, entre otras (Chatzimitakos & Stalikas, 2016). Finalmente, una vez identificados de manera presuntiva los metabolitos que se modulen diferencialmente debido al tratamiento, es necesario emplear una herramienta bioinformática, (como los análisis de enriquecimiento ofrecidos en la plataforma de acceso libre Metaboanalyst 5.0.) que permita asociar las diferencias en los perfiles metabólicos con las rutas biosintéticas afectadas por la acción del agente antimicrobiano (Theodoridis *et al.*, 2013).

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Materiales**

##### ***3.1.1 Microorganismo y medios de cultivo***

El microorganismo usado en este estudio fue *Escherichia coli* ATCC11775, el cual se obtuvo del American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). El medio de cultivo Luria Bertani (LB) fue obtenido de OXOID. El dimetil sulfóxido (DMSO) utilizado como disolvente del aceite esencial fue grado HPLC y se adquirió en Merck. Las microplacas de 96 pozos de polipropileno de fondo plano con tapa fueron marca Biologix. Todos los ensayos biológicos fueron realizados con agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$ , obtenida del Equipo Smart 2 Pure (Thermo Fisher Scientific, Helsinki, Finlandia).

##### ***3.1.2 Material vegetal y extracción de aceites esenciales***

El aceite esencial empleado en este estudio fue el aceite *bioreto 019*, el cual fue destilado de la planta aromática medicinal *Lippia origanoides* quimitipo timol-Carvacrol (LOT-II). Este fue químicamente caracterizado y suministrado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM).

#### **3.2. Métodos**

##### ***3.2.1. Crecimiento del microorganismo y pruebas de actividad antimicrobiana***

La actividad antimicrobiana del aceite esencial *bio-reto 019* fue determinada siguiendo el método de microdilución en caldo para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias aerobias, estipulado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio CLSI, por sus siglas en inglés (CLSI, 2015).

Los cultivos de *E. coli* se prepararon tomando una pequeña colonia de una placa de agar e incubándola en 3 mL de medio de caldo Luria Bertani, (LB), durante 12 horas a 30 °C, con una agitación constante de 200 rpm, a esta preparación se le denominó como preinóculo bacteriano. Al día siguiente se hizo una dilución 1:10 del preinóculo en medio LB y se verificó que su densidad óptica medida a una longitud de onda de 595 nm estuviese en el rango de 0,08 a 0,1, valor que corresponde a una población bacteriana de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL (CLSI, 2015).

En una microplaca de poliestireno de 96 pozos, y en el menor tiempo posible, se procedió a sembrar la bacteria junto con el aceite esencial para realizar la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, para esto se establecieron los grupos de muestras mostrados en la tabla 2. La densidad óptica a 595 nm fue medida para el tiempo cero en un lector de microplacas (Biorad, imarck version 1.02.01, Hercules, CA, USA). La microplaca fue incubada en las mismas condiciones descritas para el preinóculo, haciendo mediciones cada hora durante 8 horas hasta terminar el ensayo.

Mediante estas pruebas se determinó el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI<sub>50</sub>), el cual correspondió a la concentración más baja de aceite esencial que inhibió al menos el 50% del crecimiento bacteriano. La concentración de aceite *bio-retó* 019 determinada mediante esta metodología fue empleada para análisis posteriores en la metodología de metabolómica no dirigida.

**Tabla 2.** Descripción de los grupos de muestras utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Composición</b>
<b>Control de esterilidad</b>	100 $\mu$ L de caldo LB + 100 $\mu$ L de agua peptonada al 0,1% <i>p/v</i>
<b>Control de crecimiento</b>	100 $\mu$ L de inóculo bacteriano + 100 de agua peptonada al 0,1% <i>p/v</i>
<b>Cinética de Crecimiento</b>	100 $\mu$ L de inóculo bacteriano + 100 $\mu$ L de solución de AE
<b>Blanco del aceite esencial</b>	100 $\mu$ L de agua peptonada al 0,1% <i>p/v</i> + 100 $\mu$ L de solución de AE

### ***3.2.2. Extracción de metabolitos bacterianos y preparación de la muestra***

La extracción de los metabolitos fue realizada según la metodología descrita por Zhou (Zhou *et al.*, 2019) con algunas modificaciones. Para obtener la cantidad de biomasa necesaria para realizar los análisis metabolómicos, cada tipo de muestra fue dispuesta en cuatro tubos Eppendorf de punta cónica, con capacidad de dos mililitros, estos fueron llenados con mezclas del inóculo bacteriano con el aceite esencial LOT-II (tratamiento), o con agua peptonada (control). Las muestras de tratamiento fueron preparadas mezclando en proporción 1:1 inóculo bacteriano y aceite esencial ajustado a una concentración de 0,48 mg/mL, esto para lograr una concentración final de aceite esencial en 0,24 mg/mL (la cual correspondió a la CMI<sub>50</sub> del AE determinada). Por otra parte, las muestras de control fueron preparadas con una mezcla en proporción 1:1 de inóculo bacteriano y agua peptonada.

Los cultivos bacterianos fueron incubados bajo agitación constante a 200 rpm, durante 8 horas, a una temperatura de 37 °C. Una vez se alcanzó la octava hora, y en el menor tiempo posible, los tubos fueron retirados de la incubadora y sometidos a tres ciclos de lavado. Los cuales comprendieron un paso de centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante

y se resuspendió en agua peptonada. Estos lavados fueron practicados para aislar el pellet microbiano y descartar el medio de cultivo sin alterar el equilibrio osmótico, previniendo así la ruptura no deseada de la membrana celular (Gulik *et al.*, 2013).

El pellet microbiano fue sometido a un proceso de lisis química y mecánica, para esto, los pellets se resuspendieron en 500  $\mu$ L de metanol en frío al 50% (v/v) y en seguida llevados a un baño de hielo. Para efectuar la lisis mecánica se empleó un equipo de sonicador de punto, operado bajo los siguientes parámetros: Tres ciclos que comprendieron 45 segundos en modo de descanso, con pulsos de 10 segundos de duración a una frecuencia de 20 KHz (Takahashi *et al.*, 2010). Las muestras fueron diluidas nuevamente en 500  $\mu$ L de acetonitrilo en frío al 50% (v/v) y sometidas por segunda vez al proceso de lisis mecánica en baño de hielo (Mohd Kamal *et al.*, 2022).

Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 25 minutos, el sobrenadante fue trasvasado a tubos Eppendorf de fondo en U, cuidando de no arrastrar los desechos celulares precipitados. Estas soluciones fueron llevadas hasta sequedad en un equipo Savant Speed Vac SPD120 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC 28804, EE.UU) y conservadas en un refrigerador a -20 °C hasta realizar el análisis instrumental. Finalmente, las muestras de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés, quality control) del análisis fueron preparadas mediante la mezcla de 20  $\mu$ L de cada una de las muestras de trabajo descritas anteriormente.

### ***3.2.3. Análisis de los perfiles químicos***

El residuo conservado fue reconstituido en 800  $\mu$ L de una mezcla de metanol en frío tipo UHPLC al 50% (v/v) que contenía el dipéptido carbobenzoxiglicil-L-tirosin (Z-GLY-TYR-OH) (Merck, Darmstadt, Alemania) y cafeína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU) a una

concentración de 5  $\mu\text{M}$ , estos fueron empleados como estándares internos para realizar la cuantificación relativa de los metabolitos bacterianos. Las muestras fueron limpiadas empleando un filtro de jeringa tipo PTFE con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Finalmente, 270  $\mu\text{L}$  de cada tipo de muestra fueron dispuestos en viales con insertos para análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC/HRMS).

Para realizar el análisis instrumental, una alícuota de 270  $\mu\text{L}$  de muestra fue analizada mediante cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI/HRMS). Se empleó un equipo de UHPLC *Dionex<sup>TM</sup> Ultimate<sup>TM</sup> 3000* (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU), equipado con un desgasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostataada para la columna (TCC 3000). La columna empleada para realizare la separación cromatográfica fue una columna *Hypersil GOLD<sup>TM</sup> aQ* (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100X 2.1 mm, 1,9  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) termostatada a 30 °C. La fase móvil correspondió a mezclas de ácido fórmico al 0,2% en agua (A) y ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo (B). El gradiente de elusión se fijó de la siguiente manera: 100% de A cambiando linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante durante 4 minutos, se regresó a 100% A en 1 minuto y se mantuvo en equilibrio durante 3 minutos. El flujo de la fase móvil fue de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  y el volumen de inyección, 1  $\mu\text{L}$ .

El equipo de 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, Sunnyvale, CA, EE.UU.), a través de una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), operada en modo de iones positivos, a 350 °C, voltaje de capilar +3500V, temperatura

del capilar 320 °C. El analizador de masas *Orbitrap* operó en modo de barrido completo (*Full MS Scan*) con resolución 70.000. Los iones fueron fragmentados en una celda de disociación por colisiones activadas de alta energía (HCD, *High-Energy Collisional Dissociation*), a diferentes energías (10, 20, 30, 40 eV) en el modo de escaneo escalonado (*Stepped Scan*). Para cada energía de colisión, se utilizó una resolución  $R_{FWHM}$  de 35.000, usando AGC de  $3 \times 10^6$  y un tiempo de inyección en la cámara *C-trap* de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de  $m/z$  80 – 1000 u. Esta misma metodología fue utilizada para el modo de adquisición de iones negativo.

#### **3.2.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico**

Para llevar a cabo la metodología de análisis con base en una aproximación de metabolómica no dirigida, se realizó un tratamiento preliminar de los cromatogramas de iones completos para obtener los perfiles químicos de las muestras de control y tratamiento. Para esto, los archivos crudos de los espectros de masas fueron transformados del formato .raw, (propio de Thermo), al formato universal .MzXML usando la herramienta MSConvert del software de acceso libre ProteoWizzard (Y. Chen *et al.*, 2022). Esta transformación permitió obtener los archivos correspondientes a los espectros de masas obtenidos en los modos de adquisición de iones positivo y negativo, lo que facilitó el uso de las plataformas de procesamiento de datos de acceso abierto, las cuales operan de manera independiente al formato archivos de cada fabricante y sistema analítico.

Una vez transformados los datos, estos fueron analizados en la plataforma de procesamiento de datos en línea de acceso libre XCMS (Smith *et al.*, 2006). Mediante esta

herramienta, se realizaron los procesos de corrección de tiempo de retención, alineamiento de los cromatogramas, filtrado, sustracción del ruido de fondo y detección de características para los cromatogramas de iones completos obtenidos mediante ambos modos de adquisición. Para realizar estas operaciones, se realizaron trabajos en modo multi-grupo con las muestras de control (**CTRL**), control de calidad (**QC**), y tratamiento (**TTO**). Estos trabajos fueron llevados a cabo teniendo en cuenta la configuración de parámetros descrita por Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 2006) con las modificaciones listadas a continuación: La configuración base escogida fue UPLC/ORBITRAP (171), para la detección de características se seleccionó el modo CentWave con error de masas de 5 ppm, ancho de pico mínimo de 5 segundos y ancho de pico máximo de 20 segundos; para la corrección del tiempo de retención se seleccionó el método obiwarp (profStep=1); y para la alineación de los cromatogramas se definió: mzwid= 0.025 y bw=5.

A partir del pretratamiento descrito previamente, se logró obtener la tabla de intensidad de iones que sirvió como matriz de datos. En este arreglo, las duplas de relación  $m/z$  e intensidad relativa a lo largo del cromatograma de iones obtenidos en el análisis de cada una de las muestras fueron organizadas en un archivo de Excel, en el cual los encabezados de las columnas fueron etiquetados con un código que representó el tipo de muestra y el número de réplica de cada condición. Los arreglos de datos obtenidos mediante los procesos descritos con anterioridad se designaron a partir de este punto como los perfiles metabolómicos de las muestras. Los archivos correspondientes a estos últimos posteriormente fueron analizados en la plataforma de análisis bioinformático de acceso libre en línea MetaboAnalyst 5.0. para realizar los correspondientes análisis estadísticos (Pang *et al.*, 2022).

Para determinar el efecto del tratamiento con el AE LOT-II se empleó una combinación de análisis estadísticos uni- y multivariados que permitieron identificar presuntivamente cuales metabolitos sufrieron cambios en su modulación en las muestras de tratamiento. Para esto, los perfiles químicos de los tres tipos de muestras fueron depurados con base en el coeficiente de variación (CV) de las intensidades relativas de los iones de los espectros de masas en las muestras de control de calidad. En este orden de ideas, las relaciones  $m/z$  que presentaron un CV igual o superior al 30 % fueron retiradas del estudio. Los archivos depurados correspondientes a los perfiles químicos se analizaron en la plataforma Metaboanalyst 5.0., en donde preliminarmente se aplicó un Análisis por Componentes Principales mediante el cual se compararon los grupos de muestras correspondientes a QC, CTRL Y TTO. Este paso se realizó para asegurar que las diferencias observadas a posteriori, en los perfiles químicos de las muestras de CTRL y TTO se relacionan con cambios en el metabolismo bacteriano como respuesta al estrés ejercido por el aceite esencial, y no a errores aleatorios en el método analítico (Y. Chen *et al.*, 2022).

Una vez se verificó que hubo una buena separación en los gráficos de score de los PCA de los 3 tipos de muestras, se procedió a crear una nueva matriz de datos en la cual solo se incluyeron las columnas correspondientes a los perfiles químicos obtenidos en ambos modos de adquisición de iones de las muestras de CTRL y TTO. El análisis PCA fue aplicado nuevamente para esta comparación de parejas y se verificó nuevamente la separación de los dos tipos de muestra.

Se procedió determinar las características  $m/z$  que fueron responsables del agrupamiento observado en los gráficos de Score del PCA. Para esto se implementó una estrategia en la que se evaluó la significancia estadística de los posibles metabolitos diferenciales en las muestras mediante análisis estadístico uni- y multivariado. En este orden de ideas, las características que

presentaron valores de significancia estadística superiores a un umbral, (establecido a continuación), fueron seleccionadas como posibles metabolitos modulados diferencialmente. El conjunto de valores de significancia estadística establecidos para el estudio se lista a continuación. Valor  $p$ , e índice de Falso Descubrimiento (FDR) menores a 0,05 en la prueba de Student; valor de Fold-change mayor o igual a 2,0 o menor o igual a 0,5; y valor VIP en el PLS-DA igual o mayor a 1,5.

Para lograr la identificación presuntiva de los metabolitos diferencialmente moduladas en las muestras de tratamiento, se realizó una búsqueda de los posibles compuestos candidatos basada en los posibles aductos que se formaron, y el error de masas de estos expresados en ppm. Esto se logró mediante el uso de la herramienta de anotación y búsqueda en línea CEU-Mass mediator 3.0 (Gil-De-La-Fuente *et al.*, 2019). Los parámetros utilizados para delimitar la búsqueda incluyeron el modo de adquisición de iones empleado en el estudio, los posibles aductos que pudiesen formarse de acuerdo con la composición de la fase móvil, el modo de adquisición y la tolerancia de masas. Como resultado, se obtuvo un listado de posibles metabolitos, los cuales fueron depurados a través de una revisión bibliográfica de estudios sobre metabolitos funcionales de *E. coli* que podrían verse afectados por la acción del aceite esencial (Dai *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2021; Guo & Lu, 2020; Lu *et al.*, 2019). En este orden de ideas, para realizar la selección de la posible identidad química de los metabolitos, se tuvieron en cuenta algunos criterios de escogencia como: sustancias químicas que ya han sido previamente reportados como blanco del efecto antimicrobiano de otros productos naturales, metabolitos que estén relacionados con mecanismos de comunicación celular o formación de *Biofilm*, y productos celulares que estén inmersos en los

procesos de metabolismo central de carbono y la energética celular, el metabolismo de aminoácidos y la biosíntesis de nucleótidos (Dai *et al.*, 2021).

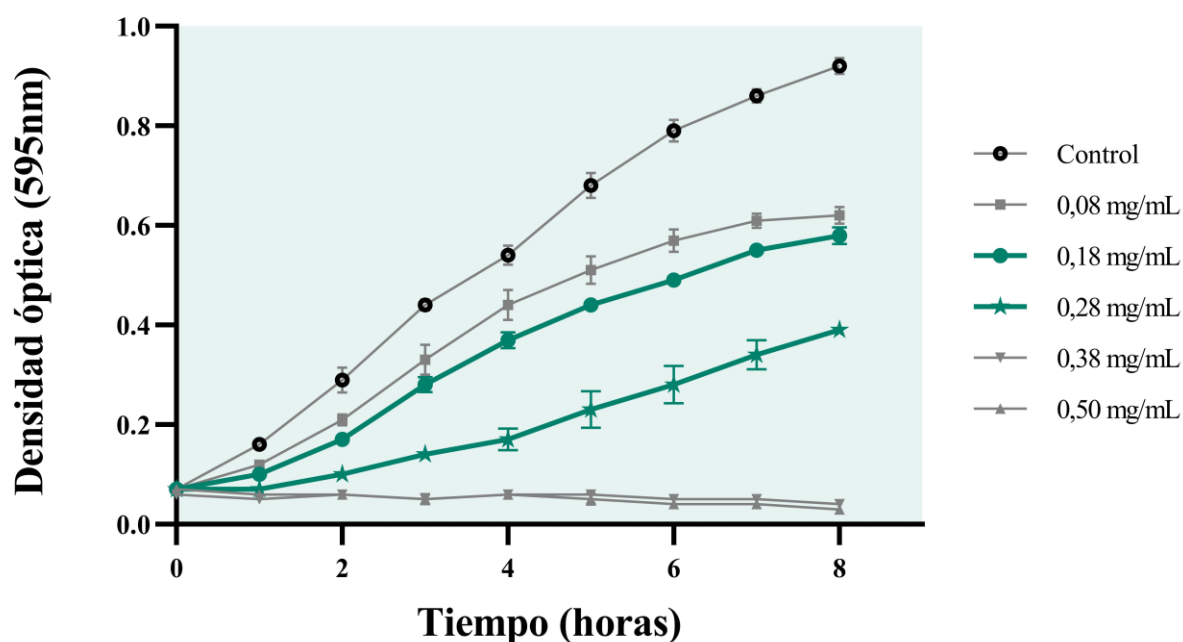
### ***3.2.5. Identificación presuntiva de los metabolitos diferenciales y reconstrucción de las rutas metabólicas afectadas***

La identificación presuntiva de los metabolitos diferenciales se realizó mediante la comparación de los iones característicos de los espectros de masas reportados en diferentes bases de datos con aquellos encontrados en los cromatogramas de iones completos. Para realizar dicha comparación, los iones moleculares de los metabolitos, para graficar los cromatogramas obtener los datos de intensidad relativa y masa exacta se empleó el software *Thermo Xcalibur 3.0* (*Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA*). Así, los metabolitos fueron buscados a lo largo de la corriente iónica total de las muestras utilizando como referencia el dato de  $t_R$  suministrado por el software XCMS. Una vez encontrados los iones moleculares en la corriente iónica total, se dispuso de los iones obtenidos a partir de la celda de disociación de colisiones activadas (HCD) según el espectro de masas reportado. Posteriormente se obtuvieron las parejas de datos de masa exacta e intensidad relativa y se compararon los iones diagnósticos de cada metabolito, con aquellos reportados en repositorios como Kegg, HMDB, LipidMaps, Metlin, NP Atlas, KNApSAcK, Mass Bank y MINE. Este proceso permitió establecer de manera presuntiva, la identidad de los metabolitos de acuerdo con el segundo nivel de certeza definido por la sociedad de metabolómica para estudios no dirigidos (Gil-De-La-Fuente *et al.*, 2019; Sumner *et al.*, 2007).

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1 Actividad antimicrobiana del aceite esencial frente a *Escherichia coli* ATCC 11775

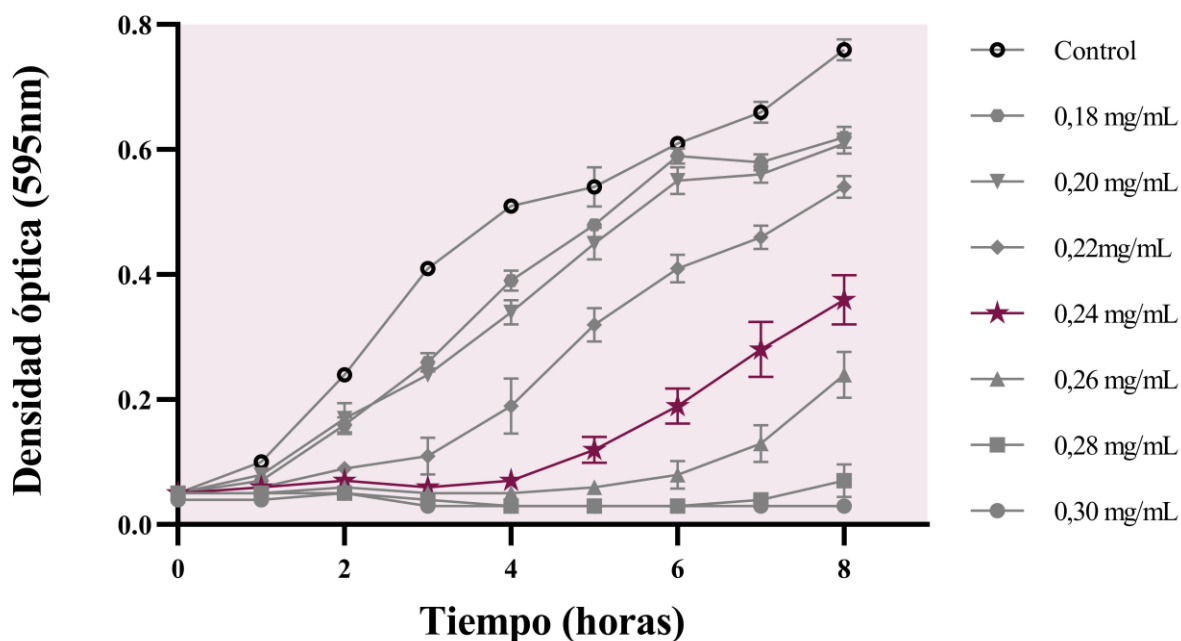
La actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial LOT-II frente a *E. coli* ATCC 11775 se llevó a cabo mediante el método de microdilución en caldo descrito en la sección 3.2.1. Para determinar la CMI<sub>50</sub> inicialmente se trabajó con rango de concentración de aceite esencial de 0,08 a 0,5 mg/L; la figura 5 muestra la cinética de inhibición del crecimiento obtenida al tratar los inóculos bacterianos con las concentraciones de LOT mencionadas.



**Figura 5.** Gráfica de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 11775 al ser tratada con las concentraciones de LOT-II en rango 0,08 a 0,5 mg/mL

Como se observa en las figuras 5 y 6, el valor de CMI<sub>50</sub> de LOT-II se encontró en el rango de concentraciones de 0,18 a 0,28 mg/mL; estos valores de concentración corresponden a

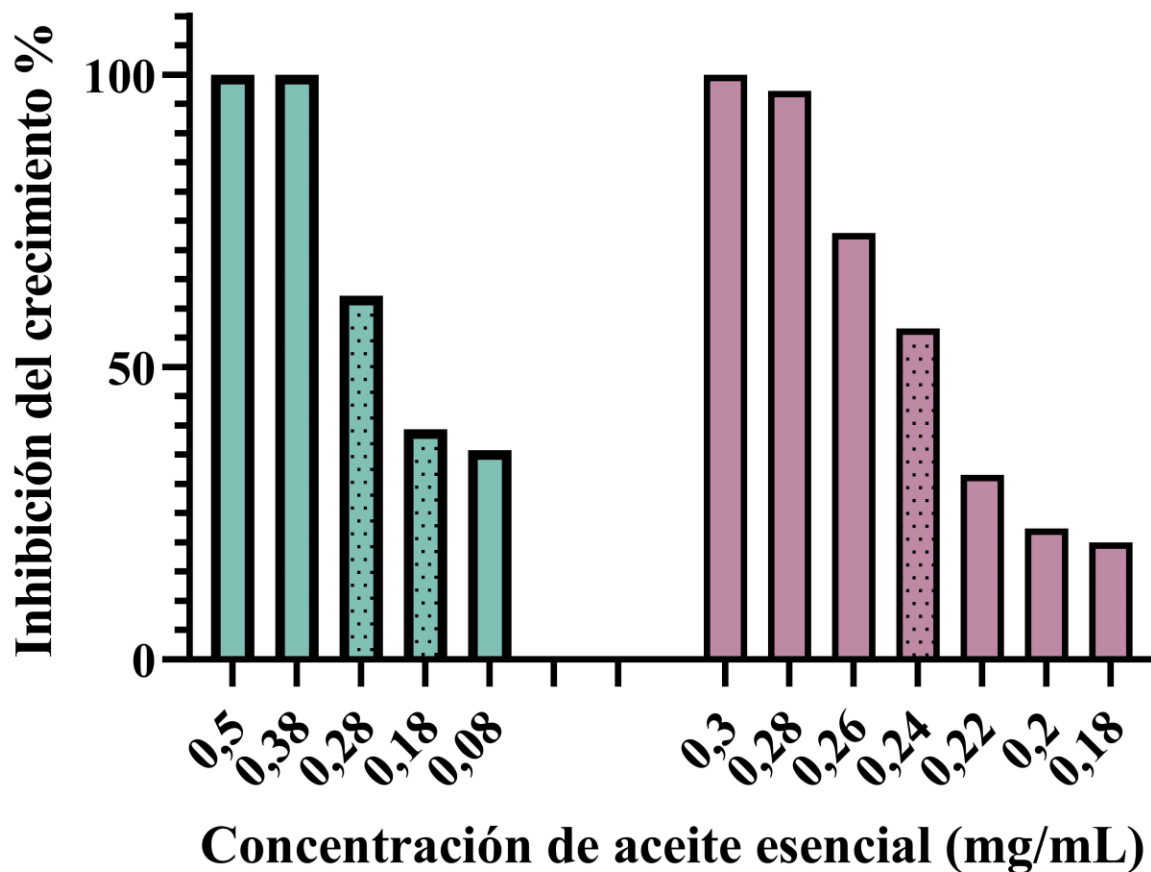
porcentajes de inhibición de 62,2% y 39,4%, respectivamente (Figura 7, izquierda). De acuerdo con lo anterior se decidió investigar la actividad antimicrobiana de LOT-II en el rango de concentraciones mencionado anteriormente. La figura 6 muestra la cinética de crecimiento obtenida en este nuevo rango de estudio.



**Figura 6.** Gráfica de la cinética de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 11775 al ser tratada con las concentraciones de LOT-II en rango 0.18 a 0.3 mg/mL

De acuerdo con los datos representados en las figuras 6 y 7, se estableció que el valor de la CMI50 para el aceite esencial LOT-II correspondió a 0,24 mg/mL, el cual presentó un porcentaje inhibición de crecimiento microbiano de 56,6%. Este valor se encuentra por debajo del obtenido para aceites esenciales de otras especies vegetales sobre microorganismos Gram negativos (ver

tabla 1) y es cercano al valor de CMI<sub>50</sub> reportado para el aceite esencial de orégano común sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, según lo reportado por Hao y colaboradores (Hao *et al.*, 2023).



**Figura 7.** Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano de diferentes concentraciones del aceite esencial LOT-II frente a *Escherichia coli* ATCC 11775. A la izquierda y en color verde los porcentajes encontrados en el primer experimento, a la derecha y en magenta, los porcentajes reportados en la segunda selección de concentraciones

Finalmente, el valor determinado de  $CMI_{50}$  del aceite esencial LOT-II fue el empleado para llevar a cabo los experimentos correspondientes a la aproximación de metabolómica no dirigida para determinar los procesos celulares afectados por la acción antimicrobiana del aceite esencial.

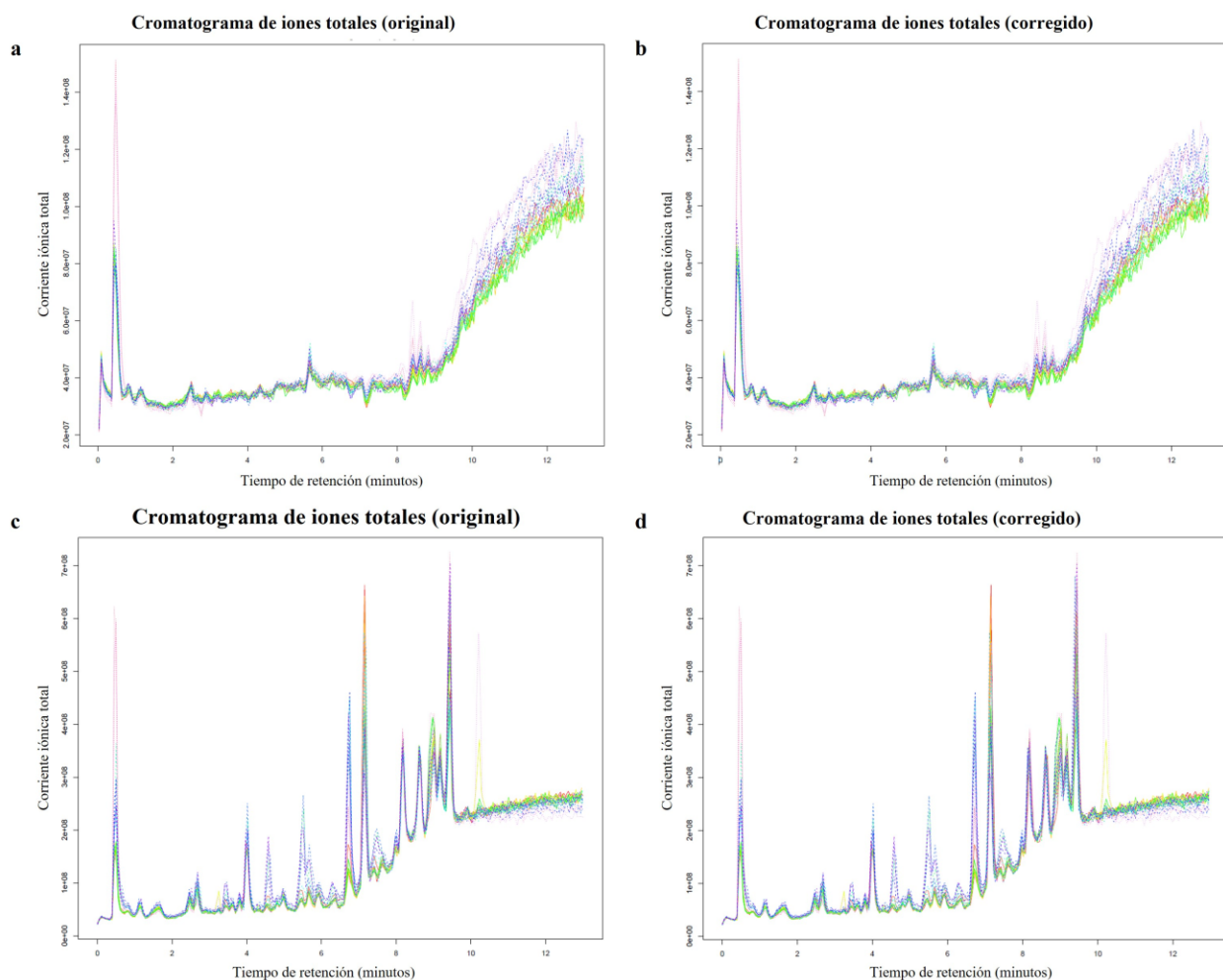
## **4.2. Obtención de los perfiles químicos**

Los metabolitos celulares fueron extraídos y analizados según la metodología descrita en las secciones 3.2.2. y 3.2.3. Los parámetros utilizados para los análisis cromatográficos y en la detección mediante espectrometría de masas fueron descritos en las secciones mencionadas. Como resultado de este primer paso de análisis instrumental, se lograron obtener 22 archivos en formato .raw, correspondientes a los cromatogramas de iones completos de las nueve réplicas de las muestras del grupo de control, nueve réplicas de las muestras del grupo de tratamiento, y cuatro réplicas correspondientes al grupo de control de calidad. Estos archivos fueron procesados según lo descrito en la sección 3.2.4 y analizados en la plataforma XCMS para continuar el proceso de tratamiento de datos.

### ***4.2.1. Tratamiento preliminar de los datos y obtención de las tablas de intensidad de iones***

Mediante la plataforma XCMS, y siguiendo los parámetros descritos en la sección 2.3.4., se realizaron los procesos de tratamiento de datos, entre ellos el alineamiento de los cromatogramas a lo largo de las muestras, y la corrección en la deriva del tiempo de retención. La figura 8 muestra las gráficas de los cromatogramas de iones totales antes y después del proceso de alineamiento realizado mediante un trabajo en modo multigrupo con la plataforma XCMS. A continuación, se

realizó el proceso de conversión de los cromatogramas de iones completos a tablas de intensidad de iones. Para esto se tomaron los datos de relación masa carga promedio e intensidad relativa, y se dispusieron en forma de tablas, en estas, cada columna representó el perfil metabólico completo de las muestras estudiadas.



**Figura 8.** Cromatogramas de iones totales originales obtenidos mediante el modo de adquisición de iones negativos (a), y positivo (c); Cromatograma de iones totales alineados obtenidos mediante el modo de adquisición de iones ionización negativo (b), y positivo (d)

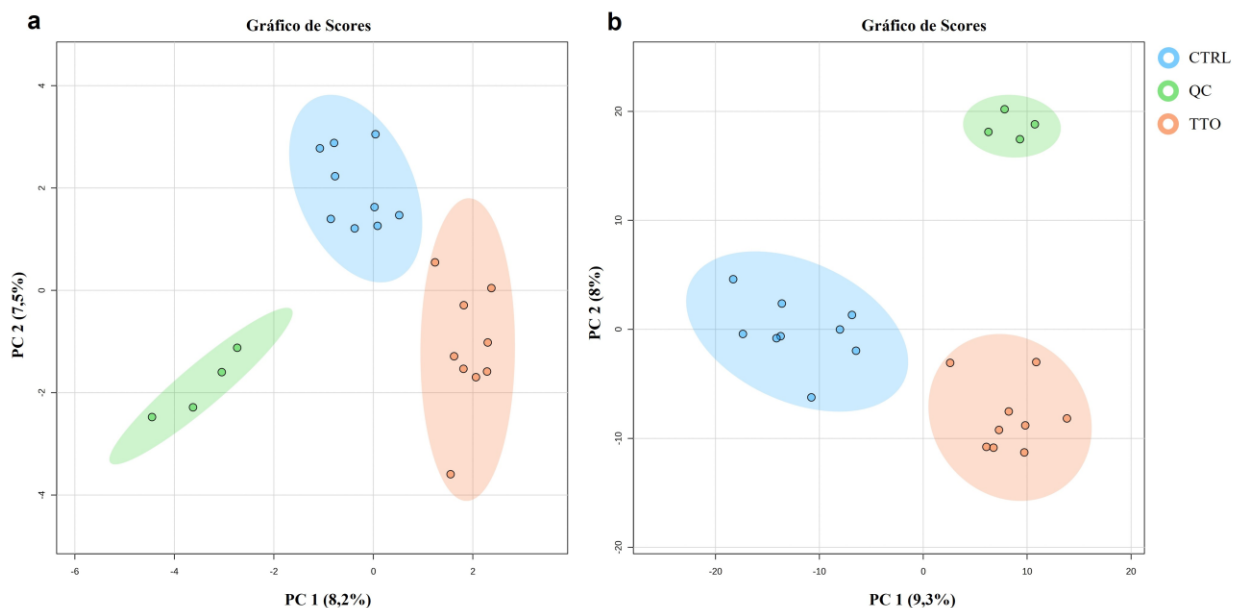
A partir de las tablas de intensidad de iones, se obtuvieron arreglos matriciales de datos, en los que se registró la intensidad relativa y relación masa/carga ( $m/z$ ) de cada una de las muestras de estudio en ambos modos de ionización. Como resultado de este proceso se generaron archivos delimitados por comas en Excel, que describieron los cromatogramas de iones completos de las muestras, los cuales fueron conformados por 2468 características ( $m/z$ ) para el modo de adquisición positivo, y 1088 características para el modo de adquisición negativo.

Para realizar un mejor filtrado de datos, y asegurar que las alteraciones entre los perfiles metabólicos de las muestras de control y tratamiento correspondieron a cambios en el metabolismo bacteriano y no a factores de ruido, se realizó un filtrado con base en el coeficiente de variación de los valores de intensidad relativa de las muestras de control de calidad. Aquellas características ( $m/z$ ) que presentaron un CV igual o mayor al 30% fueron retiradas de los archivos de Excel. Como resultado de esta operación, se obtuvieron plantillas de datos, correspondientes a los perfiles metabólicos de las muestras de estudio. Estos archivos estuvieron conformados por 1933 y 702 características ( $m/z$ ) para los modos de adquisición de iones positivos, y negativos respectivamente.

#### ***4.2.2. Pretratamiento estadístico con las muestras de control de calidad***

Las plantillas mencionadas en la sección anterior fueron cargadas en la plataforma de análisis bioinformático Metaboanalyst 5.0, para continuar con los análisis de datos multivariados. La figura 9, muestra los gráficos de score obtenidos al realizar la comparación en modalidad de multigrupo de las muestras de CTRL, QC y TTO. Como se puede apreciar en la figura citada, los

tres tipos de muestras presentaron un agrupamiento satisfactorio entre sus réplicas técnicas, y una separación evidente entre los tres tipos de muestras. Adicionalmente, se observa que el primer componente (PC1) de los gráficos de score, logró explicar más varianza entre los perfiles metabólicos de los tres tipos de muestras obtenidos mediante ambos modos de ionización.



**Figura 9.** Gráficos de score correspondientes a los análisis por componentes principales de los perfiles metabólicos obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo (a), y positivo (b)

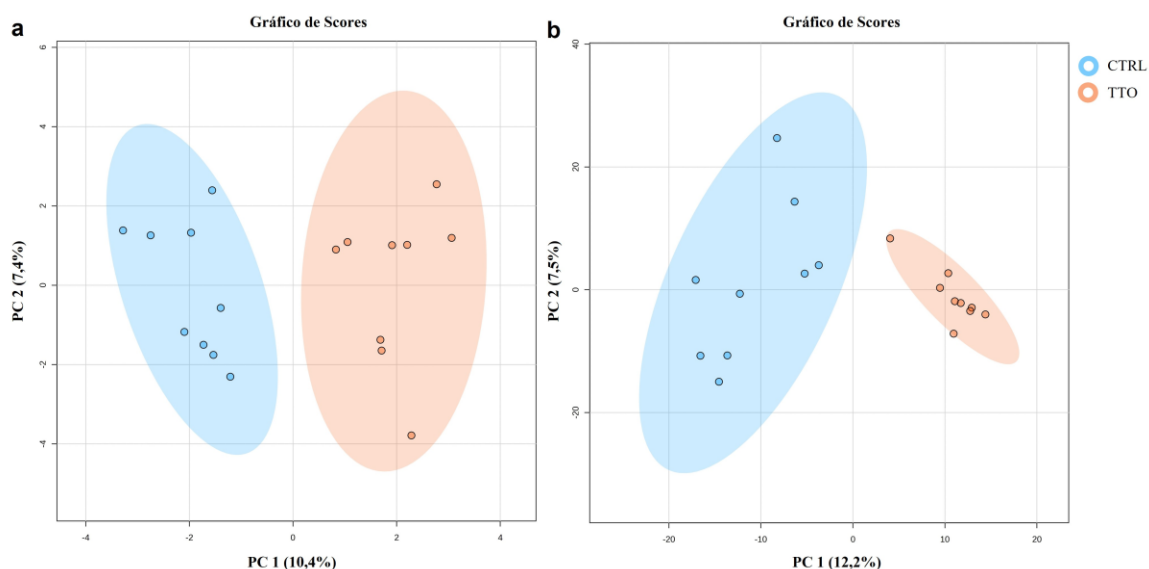
De acuerdo con lo anterior, se concluyó que las diferencias observadas en los perfiles metabólicos de *Escherichia coli* ATCC 11775 al ser tratada con el aceite esencial LOT-II, se pueden asociar con cambios del metabolismo bacteriano como respuesta al tratamiento con el fármaco y no a posibles errores experimentales en la marcha analítica.

### **4.3. Identificación de los cambios en los perfiles químicos**

Una vez se comprobó la fiabilidad de los datos obtenidos mediante las muestras de control de calidad, se procedió a retirar de los archivos de las plantillas las columnas que representaron los perfiles químicos de estos controles. Las nuevas plantillas fueron generadas y analizadas en Metaboanalyst 5.0., para lograr identificar las principales diferencias entre los perfiles metabólicos de las muestras de control y tratamiento mediante una metodología que involucró el uso de métodos de análisis estadístico uni- y multivariados.

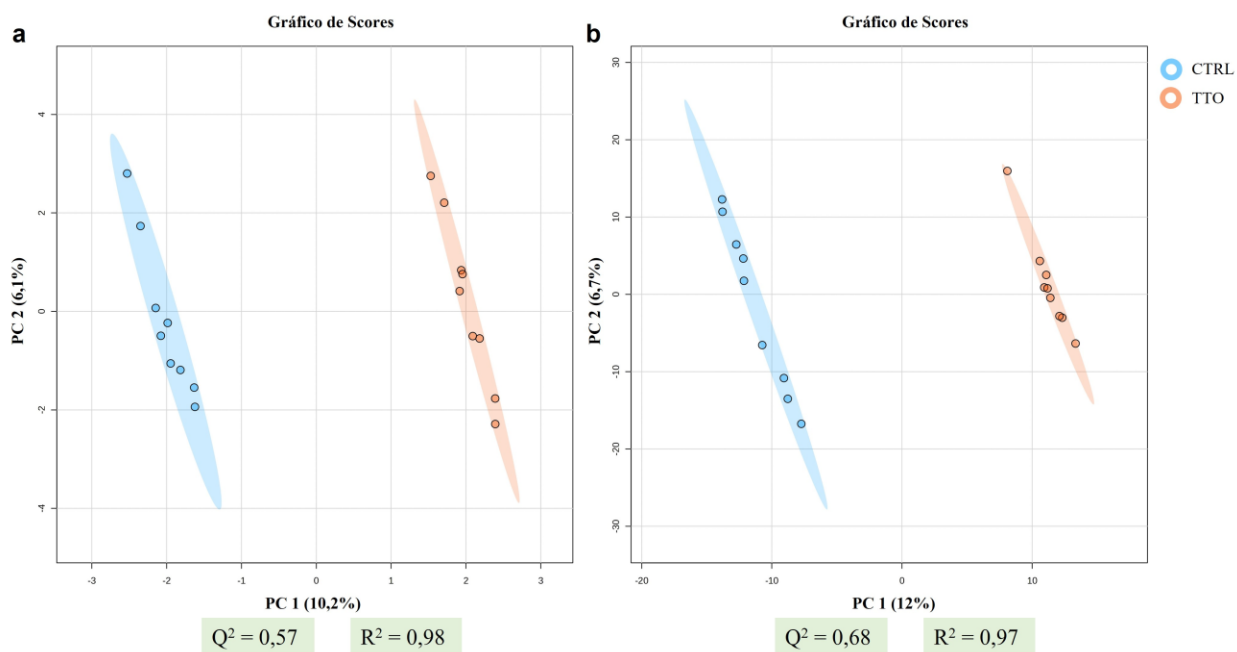
#### ***4.3.1 Determinación de los cambios globales en los perfiles metabólicos de las muestras mediante métodos estadísticos multivariados***

La figura 10, muestra los gráficos de score obtenidos al aplicar el PCA en las muestras de control y tratamiento. Para los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de iones negativos, el primer componente logró explicar 17.8% de la varianza observada entre los dos grupos de muestras, en el caso del modo de iones positivo la varianza explicada mediante el primer componente fue del 19.7%. En ambos casos el agrupamiento entre muestras de una misma condición biológica fue exitoso, y la separación observada en los gráficos de score, entre los dos tipos de muestras fue clara.



**Figura 10.** Gráficos de score correspondientes a los análisis por componentes principales de los perfiles metabólicos de las muestras de control, y tratamiento, obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo (a), y positivo (b)

Para validar los resultados obtenidos en el paso anterior, y simultáneamente obtener información sobre cuáles fueron las características ( $m/z$ ) que contribuyeron en mayor medida para explicar el agrupamiento observado, se aplicó el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). La figura 11, muestra que la varianza explicada mediante el modelo PLS-DA fue del 16.3% y del 18.7% para los perfiles obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo y positivo, respectivamente.



**Figura 11.** Gráficos de score correspondientes a los análisis discriminantes por mínimos cuadrados parciales de los perfiles metabólicos de las muestras de control, y tratamiento, obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo (a), y positivo (b)

Por otra parte, también se observó que los valores de  $Q^2$  de los modelos generados a partir de los análisis PLS-DA para los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de adquisición de iones positivo y negativo, fueron de 0,57 y 0,68 respectivamente. El coeficiente  $Q^2$ , es una medida de que tan eficaz fue el modelo matemático del PS-DA para predecir la pertenencia de una muestra a un determinado grupo, y es una forma eficaz de realizar el proceso de validación cruzada; En este orden de ideas, se considera que las buenas predicciones están en el rango de 0,7 a 1,0 (Szymańska *et al.*, 2012). De acuerdo con lo anterior, se concluye que el modelo matemático generado mediante el análisis PLS-DA no realizó predicciones satisfactorias sobre la pertenencia

de las muestras estudiadas a su grupo al usar como variables todas las características ( $m/z$ ) de los perfiles metabólicos de las muestras. Sin embargo, más adelante se mostrará que la validación cruzada se logró empleando como variables, únicamente las características ( $m/z$ ) consideradas como moduladas diferencialmente debido a la condición de tratamiento.

#### **4.3.2. Determinación de las características (*features*) moduladas diferencialmente**

Para determinar cuáles características ( $m/z$ ) fueron las que más contribuyeron para explicar las diferencias observadas en los perfiles metabólicos del microorganismo al ser tratado con el aceite esencial, se aplicó una estrategia de filtrado con base en valores de significancia estadística de diferentes métodos. En este orden de ideas, solamente las características que presentaron un valor de coeficiente VIP en la prueba del PLS-DA igual o superior a 1,5; un valor de Fold-change menor a 0,5 o mayor a 2,0; y un valor  $p$  del estadístico igual o menor a 0,05 fueron consideradas como estadísticamente significativas; y por tanto se concluyó que presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento. Estos resultados son mostrados a detalle en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3.** Valores de significancia estadística para las relaciones (*m/z*) que presentaron modulación diferenciada en los perfiles metabólicos obtenidos en el modo de adquisición de iones negativo

Característica ( <i>m/z</i> )	Valores de significancia estadística			Modulación *
	VIP-PLS- DA	Fold-change	Valor P	
540,0541	4,09	0,01	5,09 x 10 <sup>-8</sup>	(-)
275,9183	2,62	0,17	1,48 x 10 <sup>-6</sup>	(-)
656,7148	2,58	0,14	5,23 x 10 <sup>-5</sup>	(-)
107,9304	2,52	0,21	5,78 x 10 <sup>-5</sup>	(-)
126,9782	2,37	0,26	5,03 x 10 <sup>-4</sup>	(-)
158,0814	1,56	0,50	4,69 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
197,8073	1,61	0,50	6,18 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
211,9175	1,73	0,35	0,01	(-)
145,0497	1,74	0,44	0,01	(-)
145,8612	1,38	0,44	0,02	(-)
259,1297	3,29	0,48	1,55 x 10 <sup>-7</sup>	(-)
256,0937	2,32	0,43	4,08 x 10 <sup>-5</sup>	(-)
326,20837	2,14	0,40	0,01	(-)
243,0619	1,74	0,48	0,02	(-)
117,0183	1,91	0,46	0,03	(-)
298,1563	3,61	5,23	3,38 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
164,8352	2,30	6,50	5,81 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
205,8391	2,47	7,02	6,85 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
248,9602	2,52	2,08	7,07 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
213,9145	1,81	2,06	8,95 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
192,9928	1,89	2,20	0,01	(+)
215,8454	2,22	2,16	0,02	(+)
315,1198	2,92	3,24	0,01	(+)
296,8411	2,13	3,32	0,01	(+)
118,9975	1,52	2,34	0,02	(+)

456,2367	1,98	3,97	0,02	(+)
313,1644	2,24	4,24	0,02	(+)
443,1782	2,68	2,46	0,02	(+)
213,9145	1,81	2,06	0,03	(+)
216,0701	1,66	2,05	0,04	(+)
456,2368	1,98	2,43	0,04	(+)
260,12500	1,63	6,16	0,05	(+)

Nota \* Modulación de abundancia del metabolito en las muestras tratamiento

**Tabla 4.** Valores de significancia estadística para las relaciones ( $m/z$ ) que presentaron modulación diferenciada en los perfiles metabólicos obtenidos en el modo de adquisición de iones positivo

Característica ( $m/z$ )	Valores de significancia estadística			Modulación*
	VIP-PLS- DA	Fold-change	Valor P	
176,0705	2,94	0,26	$1,90 \times 10^{-18}$	(-)
146,0600	2,93	0,34	$2,25 \times 10^{-16}$	(-)
413,2655	2,67	0,14	$2,57 \times 10^{-7}$	(-)
113,0348	2,25	0,15	$2,34 \times 10^{-4}$	(-)
664,1145	2,63	0,44	$6,01 \times 10^{-7}$	(-)
233,1496	2,60	0,17	$1,31 \times 10^{-6}$	(-)
331,1875	2,35	0,45	$7,21 \times 10^{-5}$	(-)
89,9640	2,35	0,19	$7,22 \times 10^{-5}$	(-)
209,2011	2,33	0,13	$9 \times 10^{-5}$	(-)
294,1753	2,33	0,34	$9,62 \times 10^{-5}$	(-)
462,2373	2,15	0,21	$5,84 \times 10^{-4}$	(-)
178,0579	2,13	0,27	$6,77 \times 10^{-4}$	(-)
279,1374	2,13	0,34	$6,96 \times 10^{-4}$	(-)
209,0554	1,94	0,33	$2,98 \times 10^{-3}$	(-)

Análisis metabolómico basado en espectrometría de masas del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre *Escherichia coli* ATCC 11775

62

77,0389	1,93	0,38	3,14 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
81,0175	1,92	0,27	3,95 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
399,1771	1,89	0,37	4,06 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
167,9936	1,89	0,15	4,12 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
89,1077	1,88	0,48	4,32 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
107,0705	1,88	0,37	4,37 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
148,0393	1,84	0,24	5,52 x 10 <sup>-3</sup>	(-)
277,0849	1,84	0,21	5,55x 10 <sup>-3</sup>	(-)
350,2045	1,83	0,34	5,83x 10 <sup>-3</sup>	(-)
87,0445	1,82	0,22	6,47x 10 <sup>-3</sup>	(-)
296,2580	1,79	0,25	7,30x 10 <sup>-3</sup>	(-)
89,0873	1,79	0,39	7,63x 10 <sup>-3</sup>	(-)
223,1158	1,78	0,28	8,16x 10 <sup>-3</sup>	(-)
156,0421	1,75	0,33	9,12x 10 <sup>-3</sup>	(-)
223,0635	1,75	0,48	9,21x 10 <sup>-3</sup>	(-)
205,0970	1,74	0,42	9,71x 10 <sup>-3</sup>	(-)
360,3231	1,74	0,36	0,01	(-)
195,1355	1,74	0,48	0,01	(-)
160,0756	1,71	0,30	0,01	(-)
116,9861	1,69	0,50	0,01	(-)
177,1121	1,63	0,29	0,02	(-)
185,1653	1,60	0,48	0,02	(-)
164,0423	1,58	0,45	0,02	(-)
151,0274	1,58	0,29	0,02	(-)
183,1491	1,56	0,48	0,02	(-)
168,1382	1,55	0,43	0,03	(-)
224,0997	1,54	0,13	0,03	(-)
183,0765	1,87	2,03	4,69 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
145,1335	2,91	2,10	2,14 x 10 <sup>-14</sup>	(+)
200,1758	2,88	2,33	5,11 x 10 <sup>-8</sup>	(+)
154,1339	2,73	2,33	3,76 x 10 <sup>-8</sup>	(+)
213,1596	2,59	9,72	1,57 x 10 <sup>-6</sup>	(+)
203,1137	2,58	3,30	2,12 x 10 <sup>-6</sup>	(+)

Análisis metabolómico basado en espectrometría de masas del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia organoides* sobre *Escherichia coli* ATCC 11775

63

153,1022	2,55	6,81	3,52 x 10 <sup>-6</sup>	(+)
218,2113	2,52	4,60	5,80 x 10 <sup>-6</sup>	(+)
341,2177	2,52	6,29	6,93 x 10 <sup>-6</sup>	(+)
163,0389	2,42	3,46	3,09 x 10 <sup>-5</sup>	(+)
332,1810	2,39	4,58	4,70 x 10 <sup>-5</sup>	(+)
230,1133	2,35	7,22	7,69 x 10 <sup>-5</sup>	(+)
106,0501	2,33	3,32	9,69 x 10 <sup>-5</sup>	(+)
231,0973	2,30	4,54	1,26 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
165,0909	2,30	2,87	1,36 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
116,0708	2,25	3,81	2,22 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
310,13928	2,23	8,75	2,88 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
117,1024	2,14	3,30	6,58 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
132,1019	2,13	6,59	7,03 x 10 <sup>-4</sup>	(+)
212,1472	2,09	3,94	1,02 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
229,1544	2,08	3,73	1,03 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
157,0971	2,06	4,11	1,26 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
240,1955	2,04	2,36	1,41 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
172,1524	2,04	2,60	1,48 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
620,2735	2,03	4,67	1,61 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
157,1335	1,99	3,82	2,08 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
223,0963	2,07	4,88	1,17 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
137,1325	1,71	4,12	0,01	(+)
235,1690	1,62	3,24	0,02	(+)
155,1430	1,60	2,30	0,02	(+)
163,1479	1,95	3,46	2,70 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
136,0617	1,93	3,59	3,14 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
131,1291	1,87	2,05	4,78 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
209,1259	1,84	4,95	5,45 x 10 <sup>-3</sup>	(+)
102,0997	1,84	2,39	5,65x 10 <sup>-3</sup>	(+)
151,0051	1,81	3,12	6,59x 10 <sup>-3</sup>	(+)
74,0241	1,80	2,06	6,94x 10 <sup>-3</sup>	(+)

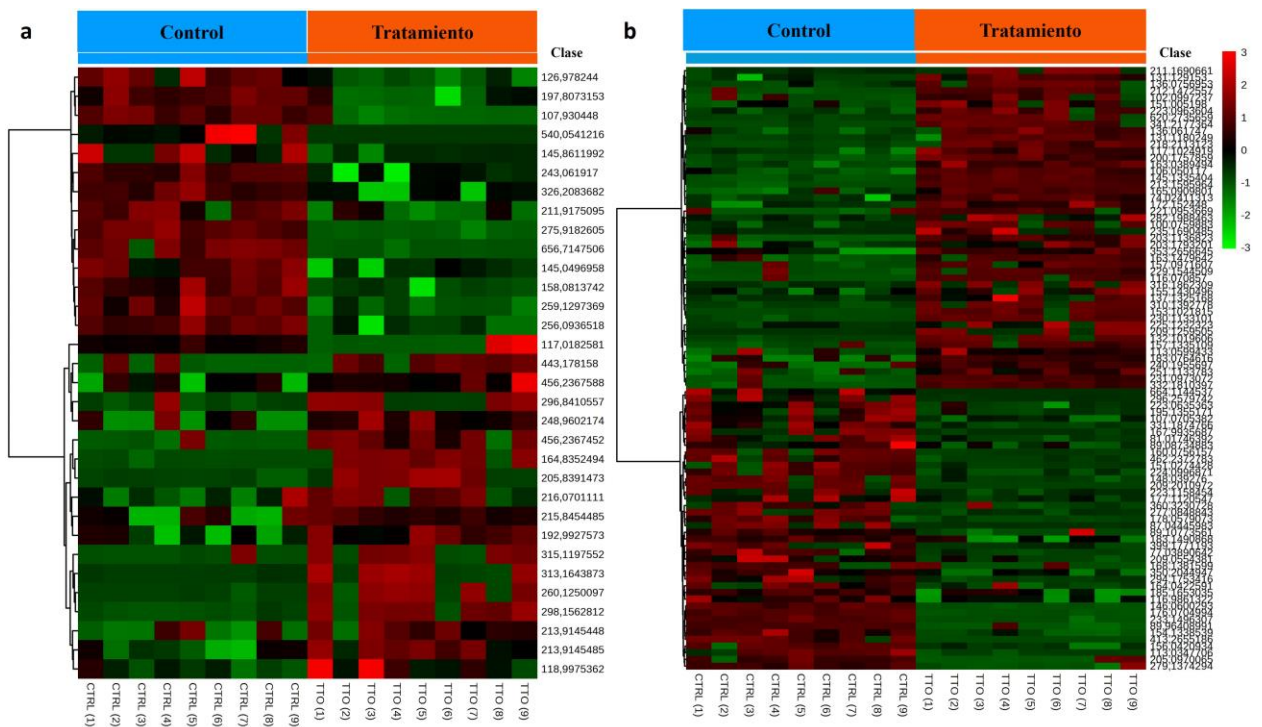
251,1133	1,80	2,38	7,01x 10 <sup>-3</sup>	(+)
136,0756	1,77	3,54	8,37x 10 <sup>-3</sup>	(+)
221,0953	1,73	2,51	0,01	(+)
353,2656	1,71	2,03	0,01	(+)
316,1862	1,69	5,40	0,01	(+)
203,1793	1,69	2,27	0,01	(+)
282,1988	1,68	2,57	0,01	(+)
225,1232	1,64	3,16	0,02	(+)
100,0759	1,63	3,15	0,02	(+)
113,0599	1,61	2,21	0,02	(+)
211,1690	1,55	4,20	0,02	(+)
131,1180	1,54	2,24	0,03	(+)

*Nota \* Modulación de abundancia del metabolito en las muestras tratamiento*

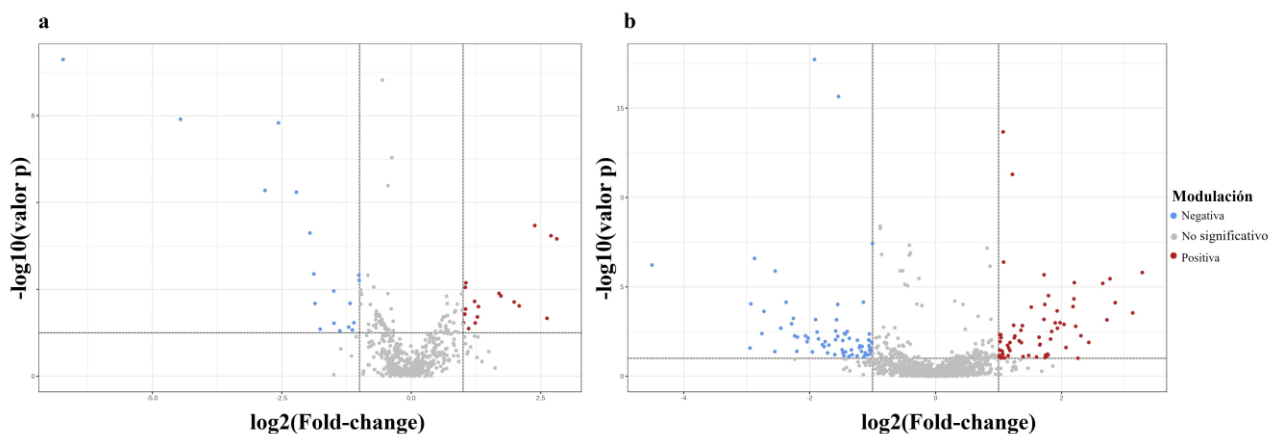
Para conocer cuáles características ( $m/z$ ) presentaron una modulación negativa o positiva en las muestras de tratamiento con el aceite esencial, se aplicó una estrategia basada en el análisis de fold-change. En este orden de ideas, las características que presentaron un valor menor a 0,5 en la dirección de comparación tratamiento/control, se encontraron en una menor cantidad en las muestras de tratamiento en comparación con las muestras de control, por lo tanto, estas características se consideraron como moduladas de manera negativa en el grupo de tratamiento. De manera similar, las características que presentaron un valor de fold-change igual o superior a 2, en la misma dirección de comparación, fueron encontradas en mayor cantidad relativa en las muestras de tratamiento, y por lo tanto se consideró que presentaron una modulación positiva frente al tratamiento con el aceite esencial.

De acuerdo con lo reportado en las tablas 3 y 4, se encontró que 32 características de los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de adquisición de iones negativo superaron los umbrales de significancia estadística establecidos y, por lo tanto, se consideraron como moduladas de manera diferencial al aplicar el tratamiento con el aceite esencial LOT-II. De manera similar,

90 características fueron encontradas para los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de adquisición de iones positivo. Para tener una mejor visualización de los datos y apreciar de manera más clara las diferencias observadas en los perfiles metabólicos, se realizaron gráficos de mapas de calor y de volcán, los cuales se presentan en las figuras 12 y 13 respectivamente.

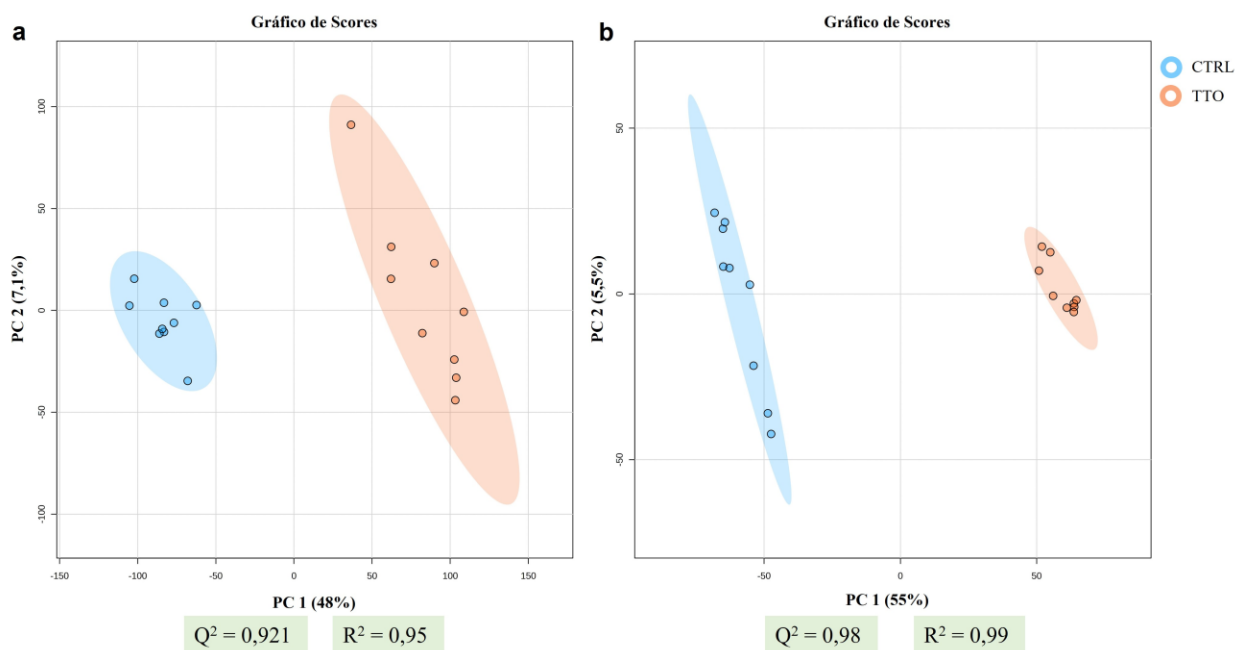


**Figura 12.** Mapas de calor de las características que presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento de los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de adquisición de iones negativo (a) y positivo (b). En color rojo se muestran las características que presentaron una modulación positiva, en verde aquellas que se modularon de manera negativa



**Figura 13.** Gráficos de volcán de las características que presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento de los perfiles metabólicos obtenidos mediante el modo de adquisición de iones negativo (a) y positivo (b). En color rojo se muestran las características que presentaron una modulación positiva, en azul aquellas que se modularon de manera negativa, en color gris se presentan las características cuya modulación no superó los umbrales establecidos de significancia estadística

De manera simultánea a los análisis ya listados, se procedió a realizar nuevamente el proceso de validación cruzada mediante el análisis PLS-DA, pero esta vez solo fueron tenidas en cuenta las características ( $m/z$ ) seleccionadas como diferencialmente moduladas, según lo mostrado en las tablas 3 y 4. El resultado del parámetro de validación cruzada  $Q^2$ , junto con los gráficos de score son mostrados en la figura 14.



**Figura 14.** Gráficos de score correspondientes a los análisis discriminantes por mínimos cuadrados parciales de los perfiles metabólicos de las muestras de control, y tratamiento, obtenidos mediante los modos de adquisición de iones negativo (a), y positivo (b)

De acuerdo con los valores satisfactorios del coeficiente  $Q^2$  observados en la figura 14, se concluye que el modelo matemático del PLS-DA asignó con precisión el grupo al cual las muestras pertenecieron, a partir de las diferencias observadas en la modulación de las características ( $m/z$ ) seleccionadas (Barker & Rayens, 2003), y por tanto se logró realizar la validación cruzada. En concordancia con lo anterior, y con las pruebas de significancia estadística de las características ( $m/z$ ) consideradas como moduladas diferencialmente, se concluye que las 90 características encontradas en el modo de adquisición de iones positivo, y las 32 del modo negativo pueden

aportar valiosa información sobre como el metabolismo bacteriano fue afectado por la acción antimicrobiana del aceite esencial.

#### **4.4. Identificación presuntiva de los metabolitos modulados por la acción antimicrobiana del aceite esencial**

Una vez confirmada la significancia estadística de las características ( $m/z$ ) que presentaron una modulación diferenciada debido al tratamiento, se procedió a establecer mediante identificación presuntiva, la identidad química de las mismas. Para esto, se realizó de manera conjunta una búsqueda preliminar de posibles candidatos mediante la herramienta CEU-Mass mediator 3.0, esta búsqueda se realizó de acuerdo con lo propuesto en la sección 3.2.4; Simultáneamente, se realizó un proceso de filtrado de los posibles candidatos teniendo en cuenta información de la literatura sobre metabolitos que hayan sido reportados en bacterias y en especial en *Escherichia coli*.

La tabla 5, muestra los resultados correspondientes a la identificación presuntiva de los metabolitos bacterianos modulados de manera diferencial debido al tratamiento con el aceite esencial. La identificación se hizo de acuerdo con el nivel 2 de certeza en la identificación de metabolitos, según lo establecido por la sociedad de metabolómica, y lo reportado por De la Fuente y colaboradores (Gil-De-La-Fuente *et al.*, 2019). Este nivel corresponde a una identificación de carácter presuntivo, la cual se recomienda para estudios metabolómicos no dirigidos.

**Tabla 5.** Identificación presuntiva de los metabolitos de *Escherichia coli* ATCC 11775 modulados diferencialmente durante el tratamiento con el aceite esencia LOT-II

Identificación tentativa	Fórmula molecular	Aducto	Modo de adquisición	HCD, (eV)	Masa exacta		Error de masas, Δppm	t <sub>R</sub> , (min)	Iones característicos encontrados		Iones característicos reportados	
					Calculada	Experimental			(m/z)	I%	(m/z)	I%
Ácido Indol-acético <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	176,0711	176,0704	3,7	5,08	(176,0704); (100%); (148,0755); (19,25%); (130,0731) (7,60%)	(176,070); (100%); (148,073); (30,57%); (130,063) (21,93%)		
Indol-carboxaldehído <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> NO	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	146,0605	146,06	3,77	4,86	(146,0599); (9,65%); (118,0863); (100%); (91,0545) (44,30%)	(146,0603); (3,19%); (118,0690); (100%); (91,0560) (33,15%)		
Ribofuranosilpicolinamida Adenina-Dinucleótido <sup>b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>7</sub> O <sub>14</sub> P <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	664,1169	664,1144	3,74	1,29	(664,1140); (100%); (237,0809); (46,31%); (136,0618) (15,14%)	(664,1164); (100%); (237,0870); (21,56%); (136,0618) (25,67%)		
Ácido espermídico II <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	233,1501	233,1496	2,14	1,34	(233,1496); (30,57%); (215,1396); (100%); (197,1225) (55,58%)	(233,1496); (53,08%); (215,1390); (100%); (197,1285) (30,25%)		
Uracilo <sup>b</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	113,0351	113,0347	2,91	1,35	(113,0348); (100%); (98,8517); (6,74%); (70,0936) (4,47%)	(112,9940); (100%); (95,8730); (13,27%); (70,0930) (22,84%)		
Histidina <sup>b</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	Positivo	10	178,0592	178,0579	4,59	6,73	(178,0578); (100%); (155,0603); (13,44%); (110,0265) (69,98%)	(155,9030); (100%); (109,9940) (99%)		
Panteteína <sup>b</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	279,1378	279,1374	1,51	1,96	(279,1365); (32,71%); (261,1241); (100%); (202,1072) (29,91%)	(279,1379); (93,44%); (261,1273); (100%); (202,1079) (26,60%)		

Nitro tirosina <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	20	209,0562	209,0554	3,79	0,56	(227,0661); (14,23%); (209,0553); (100%); (181,0603); (34,68%); (117,0458) (5,36%)	(209,1688); (6,50%); (181,0635); (100%); (117,0483) (53,10%)
Mercaptobenzotiazola <sup>b</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NS <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	167,9941	167,9935	3,52	5,74	(167,9933); (100%); (135,0135); (6,07%); (124,0215) (4,53%)	(167,9913); (100%); (135,0154); (11,605); (124,0171) (8,95%)
Putrescina <sup>b</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	89,1078	89,1077	1,51	0,46	(89,1075); (2,76%); (72,1457) (100%)	(89,1000); (4,99%); (72,1410) (100%)
Indolquinona <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	148,0398	148,0392	3,88	5,61	(148,0392); (85,87%); (120,0445); (100%); (78,0469) (5,69%)	(148,0393); (100%); (120,0444); (82,69%); (78,03338) (15,21%)
Biotinsulfona <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	277,0858	277,0848	3,34	1,06	(277,0845); (100%); (259,0743) (67,08%)	(277,0853); (100%); (2598,0747) (38,83%)
Trimetil glicina <sup>b</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> KNO <sub>2</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	Positivo	10	156,0426	156,042	3,76	0,46	(156,0419); (2,06%); (118,0862); (100%); (59,0734) (3,80%)	(118,0240); (100%); (59,0490) (7,61%)
Triptófanoa <sup>b</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	205,0977	205,097	3,38	3,21	(205,0970); (2,59%); (188,0704); (100%); (146,0599) (40,35%)	(205,0967); (2,1%); (188,0707); (88,9%); (146,0601) (100%)
Indol acetaldehído <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> NO	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	160,0762	160,0756	3,84	2,75	(160,0756); (19,93%); (130,0605); (4,25%); (118,0683) (100%)	(160,0762); (44,62%); (130,0648); (43,62%); (118,0657) (100%)
Ácido cinabarínico <sup>b</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	[M+2H] <sup>++</sup>	Positivo	20	151,0269	151,0274	3,33	6,78	(301,0586); (4,37%); (151,0270); (100%); (255,0413) (2,066%)	(301,0461); (11,30%); (255,0406) (100%)
Dialdehído de espermina <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	10	183,1497	183,149	3,51	4,52	(183,1489); (100%); (128,1069); (68,27%); (98,0967) (11,66%)	(183,1492); (9,64%); (128,1070); (100%); (98,0964) (61,88%)
Ácido dimetilguanidino valérico <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	Positivo	10	224,1011	224,0996	6,35	6,45	(224,0997); (100%); (202,1197); (32,22%); (184,1096) (27,53%)	(202,1186); (99,54%); (184,1081) (100%)

ADP Cíclico <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	20	540,0532	540,0541	1,56	1,77	(540,0549); (13,95%); (540,0533); (5,67%); (541,0563); (2,80%); (541,0373); (1,66%); (134,0461) (100%) (134,0467) (100%)
Dehidrocarnitina <sup>b</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>	[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	Negativo	20	158,0817	158,0813	2,12	4,22	(158,0812); (100%); (158,0823); (89,01%); (59,0126) (52,73%) (59,018) (100%)
Fucosa <sup>b</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	20	145,05	145,0496	2,65	3,22	(145,0496); (21,18%); (145,0506); (19,17%); (73,0296); (33,83%); (73,0295); (69,23%); (59,0137) (100%) (59,0138) (100%)
Glu Ile <sup>b</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	10	259,1293	259,1297	1,34	1,99	(259,1296); 100%; (259,1299); (100%); (241,1188); (21,11%); (241,1194); (47,53%); (130,0864) (26,49%) (130,0874) (12,62%)
Metil citidina <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	20	256,0933	256,0936	1,22	0,87	(256,0930); (100%); (256,0939); (18,56%); (238,0831); (64,02%); (238,0833); (17,03%); (124,0516) (13,07%) (124,0516) (100%)
Uridina <sup>c</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	10	243,0617	243,0619	0,85	0,81	(243,0620); (100%); (243,0628); (100%); (200,0543); (26,02%); (200,0567); (19,5%); (182,0572) (8,63%) (182,0470) (1,8%)
Ácido succínico <sup>b</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	10	117,0187	117,0182	4,46	1,09	(117,0183); (22,88%); (116,9950); (42,86%); (99,0177); (9,02%); (99,0160); (7,33%); (73,1183) (100%) (73,1140) (100%)
N-Acetilcadaverina <sup>b</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	145,134	145,1335	3,72	0,89	(145,1334); (94,07%); (145,1335); (99,24%); (128,1070); (100%); (128,1070); (100%); (89,0913) (20,05%) (89,0964) (50,31%)
Ácido espermidico <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	10	200,1762	200,1757	2,47	0,56	(200,1755); (100%); (200,1757); (100%); (183,1488); (30,06%); (183,1492); (34,09%); (129,1386) (12,60%) (129,1386) (17,47%)
Ácido carboxílico de biperidina <sup>b</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	213,1603	213,1595	3,3	4,88	(213,1594); (100%); (213,1598); (23,84%); (195,1492); (12,84%); (195,1492); (30,58%); (169,1733) (76,77%) (169,1699) (100%)
Propil metoxipirazina <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	153,1027	153,1021	3,91	2,59	(153,1021); (100%); (153,1022); (100%); (123,0916); (3,79%); (123,0917); (3,90%); (121,0764) (22,65%) (121,0760) (39%)

Hidroxifenilpiruvato <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	10	163,0395	163,0389	3,44	6,72	(181,0492); (32,72%); (181,0501); (93,26%); (163,0387); (100%); (163,0395); (100%); (145,0290) (3,68%) (145,0290) (24,73%)
Asn Pro <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	230,114	230,1133	3,35	5,44	(230,1132); (100%); (230,1135); (68,14%); (213,0867); (6,52%); (213,0870); (100%); (116,0707) (16,54%) (116,0706) (22,20%)
Serina <sup>c</sup>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	106,0504	106,0501	2,76	0,46	(106,0499); (23,59%); (106,0495); (87,90%); (88,0969); (100%); (88,0359); (100%); (70,0291) (10,87%) (70,0282) (22,4%)
Pro Asp <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	231,0973	231,0973	3,39	1,24	(231,0973); (59,54%); (231,0975); (36,94%); (213,0864); (100%); (213,0870); (100%); (98,0603) (18,45%) (98,0600) (24,68%)
Ácido propilbenzóico <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	165,0915	165,0909	3,45	4,41	(165,0908); (28,66%); (165,0916); (35,18%); (147,0806); (55,25%); (147,0810); (100%); (119,0896) (100%) (119,0861) (71,13%)
Prolina <sup>c</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	116,0711	116,0708	2,52	5,16	(116,0707); (84,26%); (116,0750); (100%); (70,0656) (100%) (70,0670) (93,3%)
Gln Tyr <sup>b</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	310,1402	310,1392	3,26	1,41	(310,1395); (100%); (310,1397); (67,96%); (293,1138); (16,32%); (293,1132); (100%); (180,0854) (49,39%) (180,0812) (15,61%)
Aminopentamida <sup>b</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	117,1027	117,1024	2,46	0,51	(117,1022); (23,96%); (117,1022); (47,42%); (100,0758); (100%); (100,0757); (100%); (83,0494) (4,11%) (83,0491) (19,68%)
Leucina <sup>c</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	132,1024	132,1019	3,7	1,2	(132,1020); (5,61%); (132,1019); (100%); (86,0969) (100%) (86,0964) (43%)
Leu Pro <sup>b</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	229,1552	229,1544	3,31	2,86	(229,1543); (100%); (229,1547); (100%); (211,1482) (5,11%); (211,1141); (49,79%); (116,0707) (45,36%) (116,0706) (21,74%)
Acetato de coniferilo <sup>b</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	223,097	223,0963	3	6,62	(223,0961); (100%); (223,0970); (100%); (181,0854); (21,90%); (181,0865); (11,15%); (163,0751) (85,10%) (163,0759) (53,52%)

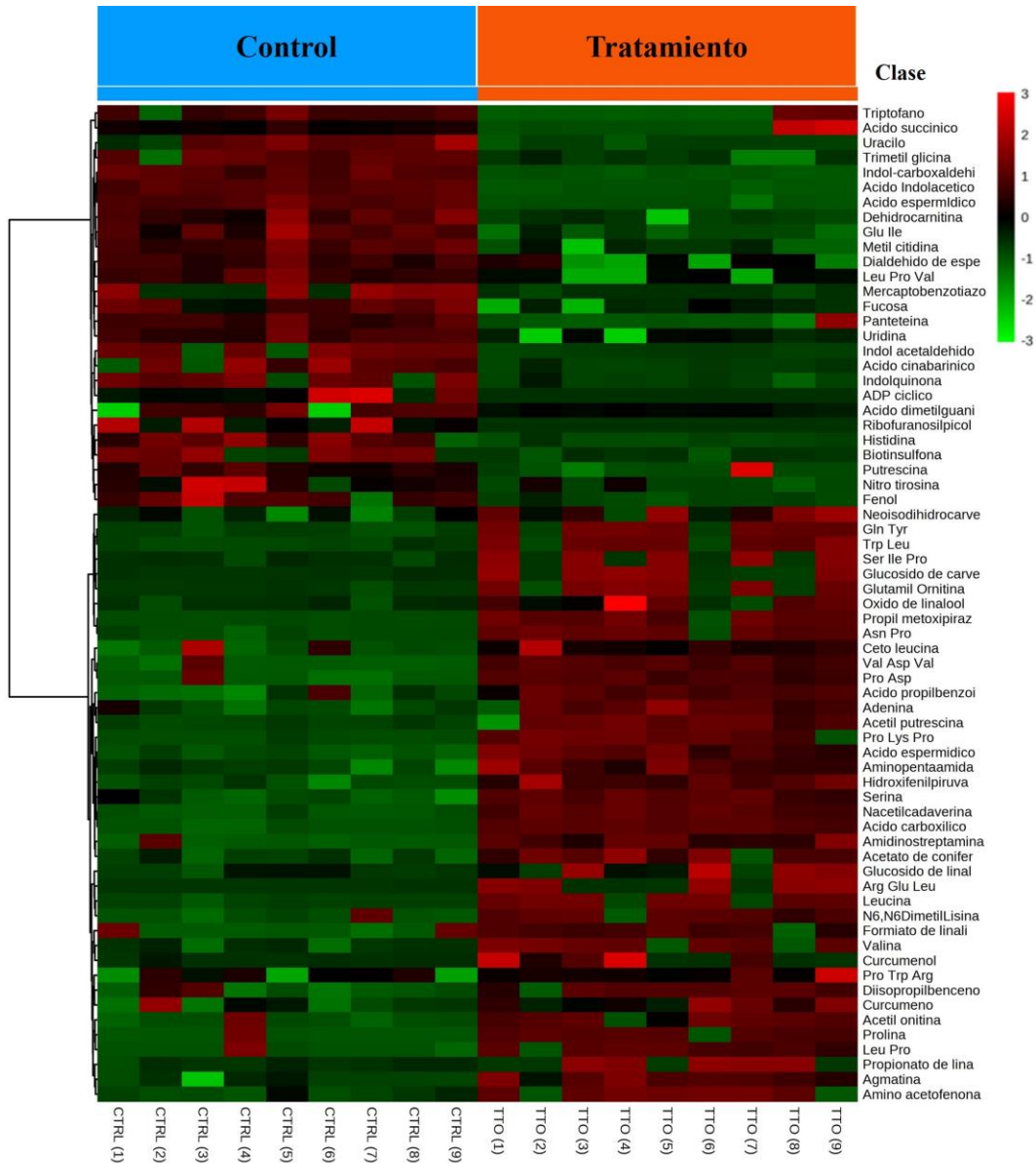
Acetil ornitina <sup>b</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	10	157,0977	157,0971	3,43	1,18	(175,1077); (100%); (175,1075); (100%); (157,0975); (33,91%); (157,0967); (49,80%); (115,0851) (47,60%) (115,0866) (91,54%)
N6,N6-Dimetil-L-Lisina <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	10	157,134	157,1335	3,67	4,09	(175,1481); (18,31%); (175,1447); (78,71%); (157,1331); (8,57%); (157,1341); (15,46); (129,1323) (100%) (129,1392) (100%)
Di-isopropilbenceno <sup>b</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	40	163,1486	163,1479	4,33	9,41	(163,1480); (12,89%); (163,1487); (98,87%); (147,1168); (3,65%); (147,11749); (100%); (121,1013); (100%); (121,1017); (44,59%); (91,0546) (65,95) (91,0548) (54,48%)
Adenina <sup>c</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	30	136,0623	136,0617	4,21	2,54	(136,0617); (93,304%); (136,0623); (100%); (119,0352) (100%) (119,03580) (37,4%)
Agmatina <sup>b</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	131,1296	131,1291	3,94	0,46	(131,1219); (100%); (131,0000); (55,35%); (114,1027); (87,94%); (114,0000); (32,27%); (72,0448) (72,92%) (72,0000) (100%)
Amino acetofenona <sup>b</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	30	136,0762	136,0756	3,93	3,83	(136,0757); (100%); (136,0756); (100%); (119,0491); (21,93%); (119,0491); (2,1%); (94,0652) (38,65%) (94,0651) (70,4%)
Formiato de linalool <sup>b</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> KO <sub>2</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	Positivo	10	221,0943	221,0953	4,46	1,35	(221,0952); (100%); (183,1385); (100%); (183,1326); (36,54%); (167,1072); (1,40%); (167,1067); (8,09%); (137,1330) (25,23%); (137,1323) (8,62%)
óxido de linalool <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	20	137,133	137,1325	3,67	6,73	(137,1325); (5,82%); (137,1330); (14,09%); (83,0859); (38,95%); (83,0861); (76,31%); (81,0702) (100%) (81,0704) (100%)
Curcumeno <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	203,1799	203,1793	3,2	7,55	(203,1794); (11,41%); (203,1794); (100%); (133,1010); (22,74%); (133,1012); (34,76%); (91,0545) (100%) (91,0542) (25%)
Glucósido de xilosa-linalool <sup>b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	[M+2H] <sup>++</sup>	Positivo	10	225,1232	225,1232	0,03	4,09	(449,2394); (30,37%); (449,2387); (50,63%); (225,1228); (72,24%); (155,1436); (100%); (155,1453); (100%); (137,1330) (67,82%); (137,1323) (17,86%)

Valina <sup>b</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	10	100,0762	100,0759	2,42	0,51	(118,0862); (42,57%); (118,0868); (59,81%); (100,0795); (16,56%); (100,0762); (13,14%); (84,0447); (15,29%); (84,0449); (0,05%); (72,0811) (100%) (72,0813) (100%)
Curcumenol <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	20	235,1698	235,169	3,2	7,43	(235,1690); (100%); (235,1698); (100%); (217,1592); (13,39%); (217,1592); (27,56%); (185,1524) (19,45%) (287,1542) (5,35%)
Ceto leucina <sup>b</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	Positivo	10	113,0602	113,0599	2,71	6,78	(131,0705); (19,36%); (131,0708); (93,13%); (113,0599); (100%); (113,0603); (100%); (95,0495); (14,72%); (95,0497); (24,62%); (85,0651) (10,72%) (85,0653) (85,07)
Neoisodihidrocarveol <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	155,1435	155,143	3,48	6,83	(155,1428); (64,81%); (155,1430); (78,52%); (130,1325); (41,44%); (130,1325); (53,67%); (97,1014) (100%) (97,1012) (100%)
Propionato de linalool <sup>b</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	211,1698	211,169	3,48	5,83	(211,1692); (100%); (211,1698); (100%); (155,1450); (29,53%); (155,1436); (26,81%); (137,1322) (21,25%) (137,1330) (32,01%)
Acetil putrescina <sup>b</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	Positivo	10	131,1184	131,118	3,09	0,56	(131,1180); (20,17%); (131,1184); (100%); (114,091); (100%); (114,0917); (53,67%); (72,0812) (88,56%) (72,0809) (6,32%)
Trp Leu <sup>b</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	Negativo	10	298,1555	298,1562	2,45	8,15	(316,1572); (12,26%); (316,1667); (100%); (298,1561); (100%); (298,1561); (22,85%); (272,1616); (43,18%) (272,1768) (46,82%)
Glucósido de carveol <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	20	313,1651	313,1643	2,31	8,49	(313,1651); (10,60%); (313,1651); (10,60%); (295,1545); (2,60%); (295,1545); (2,60%); (151,1123) (100%) (151,1123) (100%)
Glutamil Ornitina <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	Negativo	10	260,1246	260,125	1,42	0,92	(260,1252); (100%); (260,1252); (100%); (242,1146); (48,56%); (242,1146); (48,56%); (216,1354) (32,52%) (216,1354); (32,52%)

Nota. Iones característicos de los metabolitos consultados en las siguientes bases de datos: **a** (Mass Bank of North America[MONA]); **b** (Human Metabolome Data Base[HMDB]); **c** (MassBank);

Para tener un mejor panorama sobre cuáles metabolitos presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento, se decidió hacer un único listado de estos primeros, combinando los perfiles metabólicos diferenciados que fueron adquiridos mediante ambos modos de adquisición de iones. En este orden de ideas, ambos listados de metabolitos fueron combinados en un solo archivo de excel, lo cual permitió obtener un nuevo mapa de calor que muestra de manera clara como fueron modulados los metabolitos bacterianos como respuesta al tratamiento con el aceite esencial LOT-II. Este resultado puede ser observado en la figura 15.

De acuerdo con la tabla 5, se encontró un grupo diverso de metabolitos bacterianos que fueron afectados por la acción antimicrobiana del aceite esencial, entre estos destacan algunos aminoácidos proteogénicos como la serina, valina, leucina, histidina y el triptófano; algunos metabolitos derivados del indol, como aldehídos de indol y ácido indol acético; poliaminas, nucleótidos y péptidos cortos. De manera interesante, también se encontraron algunos posibles productos de la metabolización de algunos componentes de los aceites esenciales, tales como óxidos, glucósidos y acetaldehídos. La manera en la que estos fueron modulados a lo largo de diversos procesos metabólicos y su relevancia dentro del metabolismo bacteriano son discutidos en la siguiente sección. Los espectros de masas con los iones característicos encontrados de los metabolitos usados en los análisis de la siguiente sección, se encuentran consignados en la sección de material suplementario.

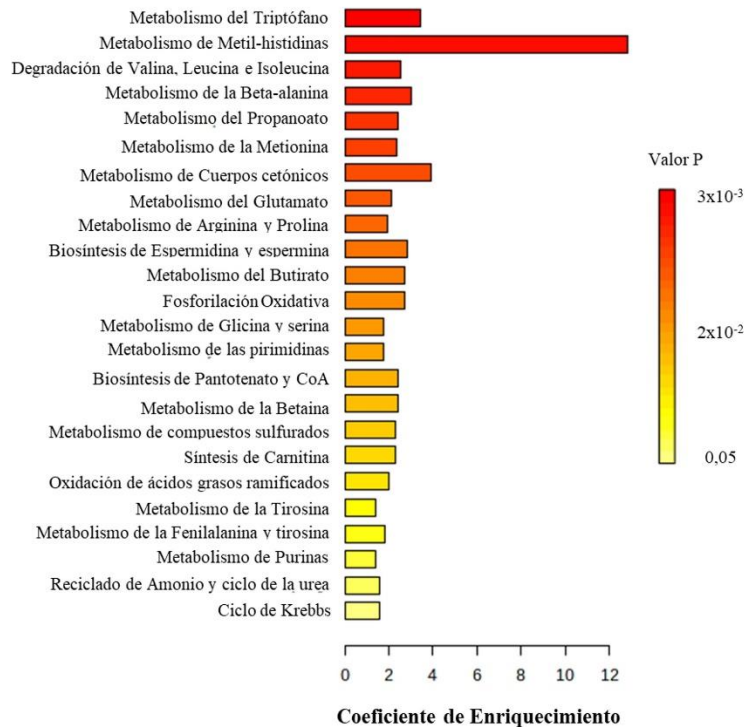


**Figura 15.** Mapa de calor de los metabolitos identificados de manera presuntiva, que presentaron una modulación diferenciada entre las muestras de control y tratamiento. En color rojo se muestran los metabolitos que presentaron una modulación positiva, en verde aquellos que fueron modulados de manera negativa.

#### 4.5. Identificación de los procesos metabólicos afectados por la acción del aceite esencial

Para identificar cuáles procesos metabólicos del microorganismo habían sido afectados en mayor medida por el tratamiento con el aceite esencial, se realizó un Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Metabolitos (MSEA, por sus siglas en inglés). Este análisis, permitió establecer con un 95% de certeza, los 24 procesos metabólicos que más resultaron afectados por el efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre *Escherichia coli*.

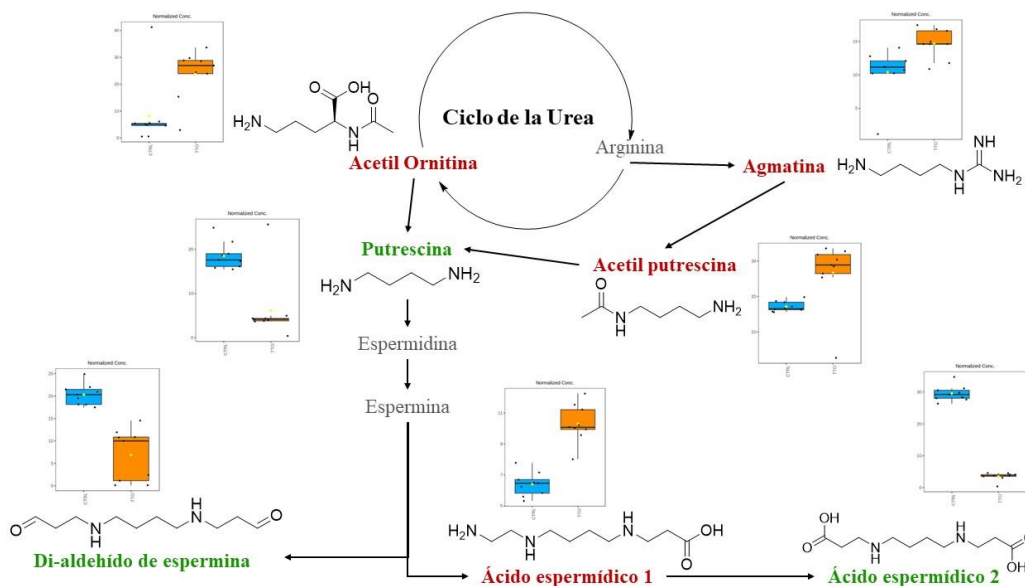
La figura 16 muestra los resultados correspondientes al análisis de enriquecimiento.



**Figura 16.** Gráfico de barras del análisis de enriquecimiento realizado sobre los metabolitos modulados diferencialmente.

#### 4.5.1. Biosíntesis de poliaminas y ciclo de la urea

De acuerdo con el análisis de enriquecimiento, con revisiones de la literatura y con la consulta en bases de datos como la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG), y la base de datos de rutas de moléculas pequeñas (SMPDB) (Frolkis *et al.*, 2010), se lograron identificar los procesos metabólicos del microorganismo que presentaron mayores afectaciones por el tratamiento con el aceite esencial. El primero de estos correspondió a la biosíntesis de poliaminas y el ciclo de la urea. La figura 17, muestra una reconstrucción de este proceso metabólico, resaltando los metabolitos que fueron encontrados en el estudio.



**Figura 17.** Reconstrucción de la biosíntesis de poliaminas y el ciclo de la urea de *Escherichia coli* al ser tratada con el aceite esencial LOT-II. En color rojo se muestran los nombres de los metabolitos modulados positivamente frente al tratamiento, en verde aquellos modulados de manera negativa, en gris se presentan los nombres de algunos intermediarios de la ruta. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito identificado, en

color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento

Como se puede observar en la figura 17, y de acuerdo con lo encontrado en los análisis de fold-change de las tablas 3 y 4, se concluye que hay una mayor acumulación de los primeros metabolitos de la ruta de biosíntesis de poliaminas en las muestras de tratamiento. En este sentido, se puede observar con claridad, que la conversión de acetil ornitina, agmatina y acetil putrescina a putrescina presentó una afectación. Por tanto, la biosíntesis de poliaminas como la espermidina, la espermina y sus derivados fue modulada de manera negativa. Esto concuerda con lo descrito por Michael y colaboradores, quienes en su artículo de revisión muestran como la biosíntesis de la espermidina y sus derivados depende de la correcta metabolización de la ornitina y la agmatina (Michael, 2016).

En cuanto al rol de las poliaminas en la regulación metabólica, se ha reportado que estas primeras pueden regular la tasa de crecimiento celular, regular el balance redox al interior de la célula y participar en mecanismos de patogenicidad bacteriana como la formación de biopelículas y la formación de compuestos sideróforos. De acuerdo con Guasco y colaboradores, en células procariotas las poliaminas tienen la capacidad de atrapar radicales libres y disminuir el daño oxidativo; sin embargo, su catabolismo acelerado puede ser una fuente de un mayor estrés oxidativo a nivel celular (Guasco Herrera *et al.*, 2014). Por otra parte, Wang y colaboradores, establecen que la inhibición en la biosíntesis de poliaminas retrasa las tasas metabólicas y el crecimiento celular (C. Wang *et al.*, 2003).

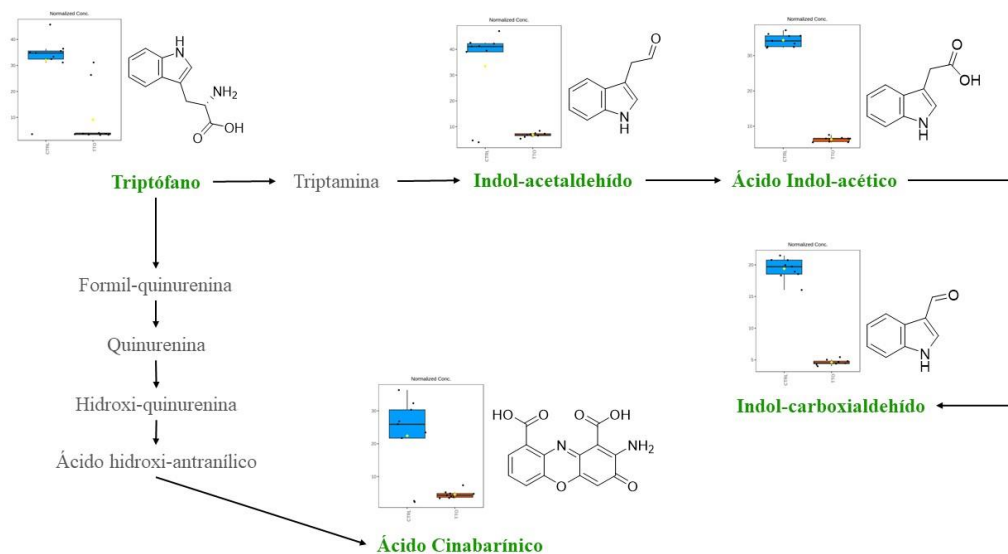
Guo y colaboradores en el 2021, encontraron que la modulación negativa en la síntesis de las poliaminas afecta la capacidad de formación de biopelículas en *Escherichia coli* (Guo *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede inferir que la presión ejercida (estrés causado por el AE) debido al daño oxidativo pudo provocar que el microorganismo buscara una menor tasa metabólica, modulando de manera negativa el metabolismo de las poliaminas y afectando el ciclo de la urea. Por otra parte, la modulación negativa en metabolitos claves para la formación de biopelículas como la espermina y la espermidina, concuerda con la capacidad, previamente documentada, de los aceites esenciales para modular mecanismos de patogenicidad como la formación de biopelículas en *Escherichia coli* (Silva *et al.*, 2016).

#### ***4.5.2. Metabolismo del triptófano y del ácido indolacético***

Otro proceso metabólico bacteriano afectado por el tratamiento con el aceite esencial fue el metabolismo del triptófano, el ácido indolacético y sus derivados. Como se puede apreciar en la figura 18, la mayoría de los metabolitos implicados en esta ruta fueron modulados de manera negativa.

De acuerdo con lo encontrado mediante el análisis de fold-change, y los resultados representados en la figura 18, se logró determinar que todos los metabolitos funcionales identificados, fueron modulados de manera negativa en la ruta del metabolismo del triptófano y el ácido indolacético. Según Roth y colaboradores, el triptófano puede metabolizarse a través de la degradación por indol, y mediante la degradación por la ruta de la quinurenina (Roth *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta que según la figura 18, tanto el triptófano, como los

dos productos finales de su degradación se vieron modulados de manera negativa, se puede concluir que todo el metabolismo del triptófano se efecto negativamente debido al tratamiento con el aceite esencial.



**Figura 18.** Reconstrucción del metabolismo del triptófano y el ácido indolacético de *Escherichia coli* al ser tratada con el aceite esencial LOT-II. En color verde se muestran los nombres de los metabolitos modulados negativamente frente al tratamiento, en gris se presentan los nombres de algunos intermediarios de la ruta. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito identificado, en color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento.

En cuanto al rol metabólico del triptófano y sus derivados, se ha reportado que el ácido indolacético, es capaz de mejorar la respuesta frente a condiciones de estrés celular en *Escherichia coli*. En concreto, Bianco y colaboradores reportan que el tratamiento con ácido

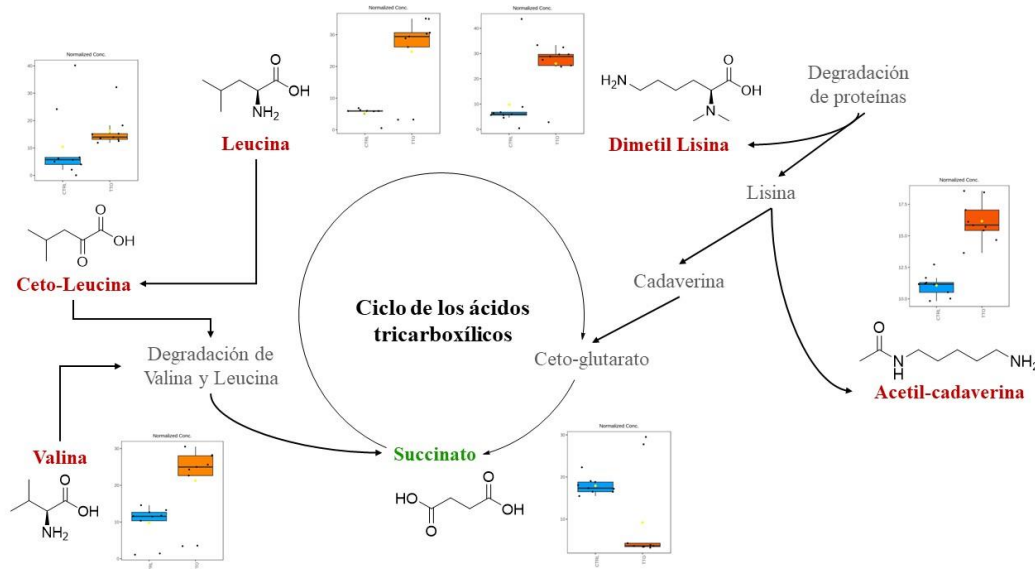
indolacético sobre *E. coli* provoca un aumento en la expresión de genes que codifican a componentes de la membrana plasmática y proteínas involucradas en la respuesta celular a condiciones de estrés. Estos mismos autores, sugieren que el ácido indolacético también provoca un aumento en la producción de los exopolisacáridos que dan estructura a las biopelículas formadas por *E. coli* (Bianco *et al.*, 2006). Lo anterior concuerda con lo documentado por Guo y Lu en el 2020, quienes identificaron al ácido indolacético como un metabolito de importancia para la formación de biopelículas en *E.coli* (Guo & Lu, 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, y los resultados con respecto a la reconstrucción de la ruta metabólica, se puede inferir que el aceite esencial de *L. origanoides* tuvo la capacidad de bloquear el metabolismo del triptófano. Este desequilibrio, sumado al daño oxidativo que comúnmente ejercen los aceites esenciales sobre las membranas plasmáticas contribuyó a que el microorganismo perdiera la habilidad de tolerar y adaptarse a la condición de estrés derivada de la acción antimicrobiana del AE.

#### ***4.5.3. Degradación de la leucina y valina***

Otros procesos metabólicos que se identificaron como afectados por el tratamiento del microorganismo con el aceite esencial, fueron la degradación de aminoácidos como la leucina, la valina y la lisina. Según se muestra en la figura 19, normalmente la lisina que proviene de procesos de ruptura de proteínas es metabolizada completamente hasta formar cadaverina y posteriormente glutarato, el cual ingresa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos como succinato (Leggett *et al.*, 2022) . Sin embargo, los resultados muestran que estos procesos se vieron alterados por cuenta de la formación de dimetil lisina y acetyl cadaverina en su lugar. Este hallazgo concuerda con el hecho de haber encontrado una menor cantidad

de succinato en las muestras de control, puesto que una de las rutas que contribuye a la formación de este último se vio afectada.



**Figura 19.** Reconstrucción de la degradación de la Leucina y la valina de *Escherichia coli* al ser tratada con el aceite esencial LOT-II. En color rojo se muestran los nombres de los metabolitos modulados positivamente frente al tratamiento, en verde aquellos modulados de manera negativa, en gris se presentan los nombres de algunos intermediarios de la ruta. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito identificado, en color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento

Por otra parte, también se evidencia un bloqueo en los pasos iniciales de la ruta de la degradación de la leucina y la valina. Esto se explica al encontrar mayores cantidades de leucina, valina y cetoleucina en las muestras de tratamiento, de la misma manera que en el

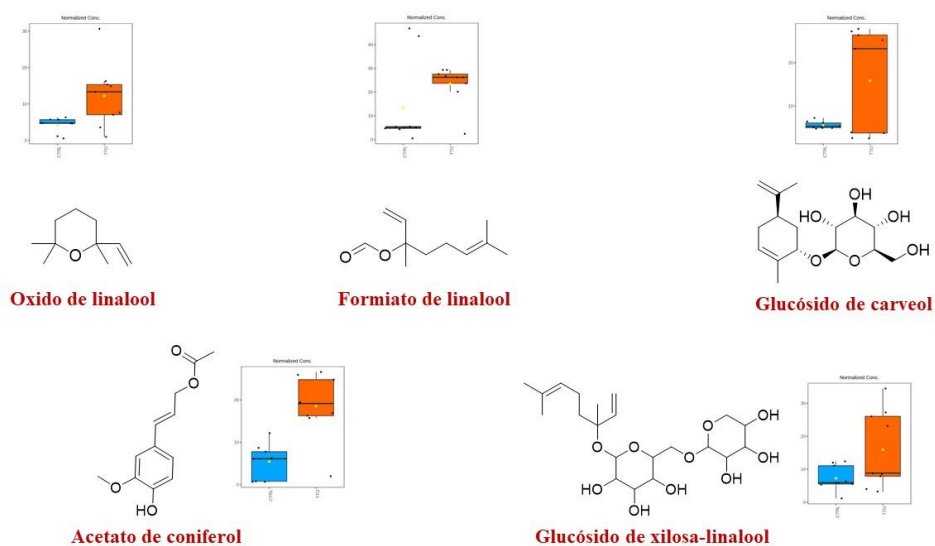
metabolismo de la lisina, se observa que hay una menor cantidad del producto final de estas rutas (el succinato) en las muestras de tratamiento. Lo Anterior sugiere que el AE fue capaz de afectar la metabolización de los aminoácidos mencionados con anterioridad y puede indicar que por cuenta de ello se produjo un desequilibrio en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el cual es uno de los principales procesos de obtención de energía a nivel celular.

#### ***4.5.4. Metabolización de componentes activos del aceite esencial***

Otro grupo importante de metabolitos identificados de manera presuntiva, fueron algunos posibles productos de la metabolización de los componentes del aceite esencial. De acuerdo con la tabla 5 y con el análisis de fold-change realizado, se encontró que cinco metabolitos fueron modulados de manera positiva en el grupo de tratamiento. A pesar de que estos metabolitos no fueron clasificados dentro de alguna ruta mediante el análisis de enriquecimiento, se consideró necesario discutir sobre su modulación, dada su relevancia en el estudio. Estos cinco metabolitos son mostrados en la figura 20.

En cuanto al metabolismo de componentes de los aceites esenciales, se ha documentado que las estrategias más comunes de eliminación de terpenoides y sesquiterpenoides por parte de los microorganismos, incluyen la hidroxilación, la carboxilación, la oxidación química y la acetilación (Mikami, 1988). La literatura sobre la metabolización por parte de procariotas de los componentes de estas mezclas volátiles no es muy abundante, puesto que la mayoría de las investigaciones se concentran en indagar sobre su caracterización, actividad biológica y la metabolización en modelos celulares eucariotas o humanos. En este orden de ideas, se ha reportado que el complejo citocromo P-450, ubicado

en la membrana mitocondrial de las eucariotas, puede realizar la eliminación de algunos componentes de aceites esenciales mediante la glucosilación (Zehetner *et al.*, 2019). Este complejo también se encuentra en la membrana celular de algunas bacterias, por lo que esta ruta de degradación puede estar disponible también para los procariontes.



**Figura 20.** Posibles productos del metabolismo de componentes del aceite esencial. En color rojo se muestran los nombres de los metabolitos modulados positivamente frente al tratamiento. También se presentan los diagramas de caja de cada metabolito identificado, en color azul se representan las muestras del grupo de control, en naranja las muestras del grupo de tratamiento

Teniendo en cuenta lo expuesto con anterioridad, y los resultados mostrados en la figura 20, se puede inferir que *Escherichia coli* pudo metabolizar componentes minoritarios del aceite esencial LOT-II mediante la oxidación y glucosilación del linalol, la acetilación

del coniferol, y la glucosilación del carveol. De acuerdo con la tabla 6, el aceite LOT II no posee como componentes mayoritarios a los terpenoides que originan los productos señalados en la figura 20, por lo que se puede inferir que el microorganismo no tuvo la capacidad de metabolizar los componentes mayoritarios del aceite esencial como el timol y el carvacrol, los cuales están relacionados con daño directo en las membranas plasmáticas, cambios en la fluidez de estas, y daño oxidativo por cuenta de producción de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (Tariq *et al.*, 2019).

**Tabla 6.** Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo timol II

<i>Lippia origanoides</i> , quimiotipo timol II	
Componentes mayoritarios	Abundancia relativa (%)
Timol	71,7
<i>p</i> -cimeno	10,5
Carvacrol	4,4
$\beta$ -mirceno	2,1
$\gamma$ -terpineno	2
Óxido de cariofileno	1,6
Metil timil éter	0,9
<i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno	0,9
Epóxido de humuleno II	0,7
Terpinen-4-ol	0,4

*Nota: Composición química facilitada por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies Vegetales Aromáticas y Medicinales tropicales (CENIVAM)*

## 5. Conclusiones

El método de investigación del modo de acción antimicrobiano del aceite esencial LOT-II, basado en una aproximación de metabolómica no dirigida, permitió establecer de manera confiable, que 122 características  $m/z$  fueron moduladas diferencialmente por *Escherichia coli* ATCC 11755 como respuesta al tratamiento con el aceite esencial de *Lippia origanoides*. De estas características, 59 metabolitos pudieron ser identificados de manera presuntiva, de acuerdo con los estándares de certeza propuestos por la sociedad internacional de metabolómica.

Los análisis de enriquecimiento permitieron identificar que la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *L. origanoides* alteró de manera significativa 6 procesos metabólicos de *Escherichia coli* 11775. Estos procesos pudieron ser reconstruidos teniendo en cuenta los metabolitos modulados diferencialmente; y correspondieron al metabolismo de la espermina y la espermidina, el ciclo de la urea, el metabolismo del triptófano y el ácido indol acético, la degradación de la lisina, la degradación de la leucina y la valina, y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

La identificación de los metabolitos bacterianos afectados diferencialmente por el tratamiento con el aceite esencial de *L. origanoides* ha permitido, por primera vez en un

estudio de actividad antimicrobiana contra *E. coli*, la detección de la posible presencia de productos degradados de componentes minoritarios de este aceite esencial. Estos resultados podrían servir como base para futuras investigaciones que busquen desarrollar nuevas estrategias destinadas a mejorar la efectividad antibiótica de dicho aceite esencial y, en consecuencia, fortalecer su uso como una fuente sostenible de fármacos.

La reconstrucción de las rutas metabólicas de *E. coli* afectadas por la acción antimicrobiana aceite esencial de *L. origanoides* permitió identificar que este último, no solamente comprometió procesos del metabolismo primario del microorganismo, como el metabolismo y degradación de aminoácidos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sino que también tuvo un impacto negativo en procesos metabólicos necesarios para la expresión de factores de virulencia del microorganismo, tales como la formación de biopelículas y la generación de exopolisacáridos estructurales.

Finalmente, se puede establecer que la investigación sobre el modo de acción antimicrobiano del aceite esencial de *L. origanoides* frente a *E. coli*, empleando concentraciones sub-inhedoras del aceite esencial; ha revelado un modo de acción secundario y alternativo a las ampliamente documentadas afectaciones causadas por estrés oxidativo y daño a la membrana plasmática en los patógenos afectados por estos fitofármacos. Estos hallazgos destacan la utilidad de las aproximaciones metabolómicas no dirigidas como valiosas herramientas para la investigación en el descubrimiento de nuevos fármacos y, en particular, para comprender sus modos de acción.

## 7. Recomendaciones

Dado que la identificación química de los metabolitos identificados como diferenciales en la presente investigación llegó hasta un nivel presuntivo, es recomendable que en futuras pesquisas se busque llegar a una identificación confirmatoria de los metabolitos que hicieron parte de las rutas reconstruidas. Para hacer esto posible, y teniendo en cuenta que la estructura del proyecto 11 del programa Bio-reto XXI 15-50 implicó la evaluación simultánea del modo de acción antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* con otros modelos bacterianos, sería recomendable realizar un estudio de confirmación en conjunto, de los metabolitos bacterianos hallados en las diferentes tesis, y así poder confirmar y unificar un mecanismo de acción antimicrobiano en general del aceite esencial de *L. origanoides* frente a bacterias Gram-negativas.

Para futuros proyectos de grado relacionados con el tema de estudio de esta investigación, se recomienda que dentro de las aproximaciones de metabolómica no dirigida se contemple la posibilidad de hacer más corridas cromatográficas en modo de monitoreo de iones seleccionados (SIMS) y (MS/MS), esto para facilitar el procesamiento de datos y aumentar la confiabilidad de los resultados.

Finalmente, se recomienda a la escuela de química, la posibilidad de evaluar la inclusión de una asignatura en los semestres superiores, o como parte de la asignatura en

estadística, en los que se familiarice más al estudiante con los métodos de análisis estadísticos multivariados y sus aplicaciones en diferentes contextos. Esta observación se hace teniendo la relevancia que está tomando en todas las áreas de la educación e investigación, el análisis de Big-data en estos últimos tiempos.

### **8. Financiamiento del proyecto de investigación**

Ministerio de Ciencias, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica y el Fondo Francisco José de Caldas en el marco del programa "BioReto XXI 15:50. Desarrollo de bioproductos para los sectores salud, agropecuario y cosmético, como resultados del estudio de la biodiversidad colombiana", dentro del proyecto titulado "Desarrollo de nuevos productos con actividades antimicrobiana, insecticida y repelente a partir de moléculas aisladas de plantas aromáticas colombianas" contrato " RC-FP44842-212-2018".

### **9. Divulgación de resultados y productos académicos derivados**

Acuña Luis, Hidalgo William, Ortíz Claudia, Cáceres Marlon. IV Meeting of the Latin-american Metabolic Profiling Society (LAMPS 2022). Untargeted metabolomics analysis for unravelling the mode of antibacterial action of essential oils from Colombian medicinal plants. Poster Cartagena, Colombia, 2-4 de noviembre de 2022.

Acuña Luis, Bacca Pula, Hidalgo William. 18th Annual Conference of the Metabolomics Society (Metabolomics 2022). LC-MS based metabolomics: a tool used for studying differences in high-quality Colombian cocoa beans. Modalidad Poster. Valencia, España, 18-23 de junio de 2022.

Bacca-Villota, P., Acuña-García, L., Sierra-Guevara, L., Cano, H., & Hidalgo, W. (2023). Untargeted Metabolomics Analysis for Studying Differences in High-Quality Colombian Cocoa Beans. *Molecules*, 28(11), 4467. Artículo publicado

### Referencias Bibliográficas

- Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity, and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial pathogenesis*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716>
- Barker, M., & Rayens, W. (2003). Partial least squares for discrimination. *Journal of chemometrics*, 17(3), 166–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cem.785>
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A., Carpentieri, A., Pucci, P., & Defez, R. (2006). Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defenses to stress. *Archives of microbiology*, 185(5), 373–382. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0103-y>

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 (Basel, Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>

Cavaliere, C., Corradini, E., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Roberto Samperi, & Laganà, A. (2011). From metabolic profiling to metabolomics: fifty years of instrumental and methodological improvements. In J. S. K. and W. L. Cabrera (Ed.), *Metabolomics: metabolites, metabonomics, and analytical technologies* (pp. 121–161). Nova Science Publishers, Inc. <https://doi.org/10.3167/gps.2013.31020>

Chatzimitakos, T., & Stalikas, C. (2016). Qualitative alterations of bacterial metabolome after exposure to metal nanoparticles with bactericidal properties: a comprehensive workflow based on H NMR , UHPLC-HRMS and metabolic databases qualitative alterations of bacterial metabolome after exposure. *Journal of proteome research*, 15(9), 3322–3330. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00489>

Chebbac, K., Moussaoui, A. E. L., Bourhia, M., Salamatullah, A. M., Alzahrani, A., & Guemmouh, R. (2021). Chemical analysis and antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from *Artemisia negrei* L. against drug-resistant microbes. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2021, 5902851. <https://doi.org/10.1155/2021/5902851>

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, Y., Li, E.-M., & Xu, L.-Y. (2022). Guide to metabolomics analysis: a bioinformatics workflow. *Metabolites*, 12(4), 357. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
- Choudhari, M. R. (2017). *Effect of essential oil Cinnamomum zylanicum on biofilm producing MDR clinical isolates of Pseudomonas Aeruginosa. 1*, 9–13.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- CLSI. (2015). *M07-A10* Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.
- Cox, D. G., Oh, J., Keasling, A., Colson, K. L., & Hamann, M. T. (2014). The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*, 1840(12), 3460–3474.
- Dai, J., Li, C., Cui, H., & Lin, L. (2021). Unraveling the anti-bacterial mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against *E. coli* O157:H7 and its application in vegetable juices. *International journal of food microbiology*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108989>
- de Oliveira, M. A. C., Borges, A. C., Brighenti, F. L., Salvador, M. J., Gontijo, A. V. L., & Koga-Ito, C. Y. (2017). *Cymbopogon citratus* essential oil: Effect on polymicrobial caries-related *biofilm* with low cytotoxicity. *Brazilian oral research*, 31, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0089>

- Díaz, Y. M., Laverde, G. V., Gamba, L. R., Wandurraga, H. M., Arévalo-Ferro, C., Rodríguez, F. R., Beltrán, C. D., & Hernández, L. C. (2015). *Biofilm* inhibition activity of compounds isolated from two *Eunicea* species collected at the Caribbean Sea. *Revista brasileira de farmacognosia*, 25(6), 605–611. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.007>
- Dolatabadi, S., Moghadam, H. N., & Mahdavi-Ourtakand, M. (2018). Evaluating the anti-*biofilm* and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 118(November 2017), 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.055>
- Ebbels, T. M. D., & De Iorio, M. (2011). Statistical data analysis in metabolomics. In M. P. H. Stumpf, D. J. B. Balding, & M. Girolami (Eds.), *Handbook of statistical systems biology* (pp. 163–180). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/doi:10.1002/9781119970606.ch8>
- Fan, T. W. M., Lane, A. N., & Higashi, R. M. (2011). Introduction to metabolomics. In J.S. Knapp and W.L. Cabrera (Ed.), *Metabolomics: metabolites, metabonomics, and analytical technologies* (pp. 229–241). Nova science publishers, Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-618-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-618-0_1)
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Greff, S., Pérez, T., Thomas, O. P., Martin, J.-C., & Culioli, G. (2017). Discrimination of four marine *biofilm*-forming bacteria by LC–MS metabolomics and influence of culture parameters. *Journal of proteome research*, 16(5), 1962–1975. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b01027>
- Frolkis, A., Knox, C., Lim, E., Jewison, T., Law, V., Hau, D. D., Liu, P., Gautam, B., Ly, S., Guo, A. C., Xia, J., Liang, Y., Shrivastava, S., & Wishart, D. S. (2010). SMPDB: The

Small Molecule Pathway Database. *Nucleic acids research*, 38(suppl\_1), D480–D487.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkp1002>

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>

Gómez-Duarte, O. G. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli*

enteropatógenas en Colombia. *Revista chilena de infectología*, 31(5), 577–586.

<https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010>

Guasco Herrera, C., Chávez Servín, J. L., Ferriz Martínez, R. A., de la Torre Carbot, K.,

Elton Puente, E., & García Gasca, T. (2014). Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(2), 51–57.

Gulik, W., Canelas, A., Seifar, R., & Heijnen, S. (2013). The sampling and sample

preparation problem in microbial metabolomics. In *Metabolomics in practice: successful strategies to generate and analyze metabolic data* (pp. 1–19).

<https://doi.org/10.1002/9783527655861.ch1>

Guo, R., & Lu, H. (2020). Targeted metabolomics revealed the regulatory role of manganese

on small-molecule metabolism of *biofilm* formation in *Escherichia coli*. *Journal of analysis and testing*, 4(3), 226–237. <https://doi.org/10.1007/s41664-020-00139-8>

Guo, R., Luo, X., Liu, J., & Lu, H. (2021). Mass spectrometry based targeted metabolomics

precisely characterized new functional metabolites that regulate *biofilm* formation in

*Escherichia coli*. *Analytica chimica acta*, 1145, 26–36.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.021>

Hao, Y., Guo, X., Zhang, W., Xia, F., Sun, M., Li, H., Bai, H., Cui, H., & Shi, L. (2023). 1H NMR-based metabolomics reveals the antimicrobial action of oregano essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in broth, milk, and beef. *LWT*, 114540. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114540>

Hopfgartner, G., Varesio, E., Theodoridis, G. A., Gika, H. G., & Wilson, I. D. (2013). Tandem mass spectrometry hyphenated with HPLC and UHPLC for targeted metabolomics. In *Metabolomics in practice* (pp. 21–37). <https://doi.org/doi:10.1002/9783527655861.ch2>

Instituto Nacional de Salud, R. de C. (2019). Infecciones asociadas a la atención en salud. *Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud*, 29–44.

Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. (2019). No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections. In *Artforum international* (Vol. 54, Issue April).

Kahl, G. (2015). Essential open reading frame (eORF). In *The dictionary of genomics, transcriptomics, and proteomics* (pp. 1–1). <https://doi.org/10.1002/9783527678679.dg04020>

Kang, J., Jin, W., Wang, J., Sun, Y., Wu, X., & Liu, L. (2019). Antibacterial and anti-*biofilm* activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *Lwt*, 101(August 2018), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.093>

- Kang, J., Liu, L., Wu, X., Sun, Y., & Liu, Z. (2018). Effect of thyme essential oil against *Bacillus cereus* planktonic growth and *biofilm* formation. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*(23), 10209–10218. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9401-y>
- Kuehnbaum, N. L., & Britz-McKibbin, P. (2013). New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chemical reviews*, *113*(4), 2437–2468. <https://doi.org/10.1021/cr300484s>
- Leggett, A., Li, D.-W., Sindeldecker, D., Staats, A., Rigel, N., Bruschweiler-Li, L., Brüscheweiler, R., & Stoodley, P. (2022). Cadaverine is a switch in the lysine degradation pathway in *Pseudomonas aeruginosa biofilm* identified by untargeted metabolomics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.833269>
- Lou, Z., Tang, Y., Song, X., & Wang, H. (2015). Metabolomics-based screening of *biofilm*-inhibitory compounds against *Pseudomonas aeruginosa* from burdock leaf. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(9), 16266–16277. <https://doi.org/10.3390/molecules200916266>
- Lu, H., Que, Y., Wu, X., Guan, T., & Guo, H. (2019). Metabolomics deciphered metabolic reprogramming required for *biofilm* formation. *Scientific reports*, *9*(1), 13160. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49603-1>
- Michael, A. J. (2016). Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea\*. *Journal of biological chemistry*, *291*(29), 14896–14903. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.R116.734780>

- Mikami, Y. (1988). Microbial conversion of terpenoids. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 6(1), 271–320. <https://doi.org/10.1080/02648725.1988.10647850>
- Miller, J., & Miller, J. C. (2018). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (7th Edition). Pearson education.
- Mohd Kamal, K., Mahamad Maifiah, M. H., Abdul Rahim, N., Hashim, Y. Z. H.-Y., Abdullah Sani, M. S., & Azizan, K. A. (2022). Bacterial metabolomics: sample preparation methods. *Biochemistry research international*, 2022, 9186536. <https://doi.org/10.1155/2022/9186536>
- Mueller, M., Tainter, C. R., & National Center for Biotechnology Information. (2022, October 17). *Escherichia coli*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Muz, M., Dann, J. P., Jäger, F., Brack, W., & Krauss, M. (2017). Identification of mutagenic aromatic amines in river samples with industrial wastewater impact. *Environmental science & technology*, 51(8), 4681–4688. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00426>
- National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (U.S.), & Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). (2016). *Escherichia coli* factsheet.
- Ortega-Cuadros, M., Tofiño-Rivera, A. P., Merini, L. J., & Martínez-Pabón, M. C. (2018). Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) on *Streptococcus mutans* biofilm and its cytotoxic effects. In *Revista de biología tropical* (Vol. 66, pp. 1519–1529). scielo .

- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in microbiology*, 7(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., & Xia, J. (2022). Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature protocols*, 17(8), 1735–1761. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w>
- Rempe, C. S. (2016). Metabolomics approaches to decipher the antibacterial mechanisms of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [PhD diss, University of Tennessee]. In *Trace Tennessee research and creative exchange*. [https://trace.tennessee.edu/utk\\_graddiss/3957](https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/3957)
- 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), 16. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1159-6>
- Roth, W., Zadeh, K., Vekariya, R., Ge, Y., & Mohamadzadeh, M. (2021). Tryptophan metabolism and gut-brain homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22062973>
- Saavedra, S., Arévalo, A., Ovalle, M., Montaña, L., Hidalgo, A., & Duarte, C. (2016). *Alerta por la primera detección de mcr-1 gen de resistencia a colistina en aislamientos de Salmonella entérica serovar Typhimurium y Escherichia coli de origen humano en Colombia.*

- Schillaci, D., Napoli, E. M., Cusimano, M. G., Vitale, M., & Ruberto, G. (2013). *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented *biofilm* formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of food protection*, 76(10), 1747–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-001>
- Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). World Health Organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - Journal of medical society*, 32(1), 76–77. [https://doi.org/10.4103/jms.jms\\_25\\_17](https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17)
- 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>
- Smilde, A. K., Hendriks, M. M. W. B., Westerhuis, J. A., & Hoefsloot, H. C. J. (2013). Data processing in metabolomics. *Metabolomics in practice: successful strategies to generate and analyze metabolic data*, 261–284.
- Smith, C. A., Want, E. J., O’Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., & Feo, V. De. (2015). *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant, and antibacterial activities against planktonic and *biofilm* cultures of *Vibrio spp.* strains. 14402–14424. <https://doi.org/10.3390/molecules200814402>

Stashenko, E. E. (2009). *Aceites esenciales* (1st ed.). Ediciones UIS.

Stashenko, Elena. E., Martínez, J. R., & CENIVAM. (2012). *Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones*. División de publicaciones UIS.

Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3(3), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>

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>

Takahashi, N., Washio, J., & Mayanagi, G. (2010). Metabolomics of supragingival plaque and oral bacteria. *Journal of dental research*, 89(12), 1383–1388. <https://doi.org/10.1177/0022034510377792>

Tang, J. (2011). Microbial metabolomics. In J. M. Walker & E. E. K. Baidoo (Eds.), *Current genomics* (Vol. 12, Issue 6). Humana Press. <https://doi.org/10.2174/138920211797248619>

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(June), 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>

- Tenover, F. C. (2009). Antibiotic susceptibility testing. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of microbiology (Third Edition)* (pp. 67–77). Academic press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00239-X>
- Theodoridis, G. A., Gika, H. G., & Wilson, I. D. (2013). LC-MS-Based nontargeted metabolomics. In *Metabolomics in practice* (pp. 93–115).  
<https://doi.org/doi:10.1002/9783527655861.ch5>
- Thomas, A., Matthäus, B., & Fiebig, H.-J. (2015). Fats and fatty oils. In *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry* (pp. 1–84).  
[https://doi.org/doi:10.1002/14356007.a10\\_173.pub2](https://doi.org/doi:10.1002/14356007.a10_173.pub2)
- Tuyiringire, N., Tusubira, D., Munyampundu, J.-P., Tolo, C. U., Muvunyi, C. M., & Ogwang, P. E. (2018). Application of metabolomics to drug discovery and understanding the mechanisms of action of medicinal plants with anti-tuberculosis activity. *Clinical and translational medicine*, 7(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0208-3>
- Ungvarsky, J. (2020). Essential oil. In *Salem press encyclopedia of science*. Salem press.  
<https://bibliotecavirtual.uis.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87322014&lang=es&site=eds-live>
- Van Der Werf, M. J., Jellema, R. H., & Hankemeier, T. (2005). Microbial metabolomics: Replacing trial-and-error by the unbiased selection and ranking of targets. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 32(6), 234–252.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-005-0231-4>
- Vasconcelos, S. E. C. B., Melo, H. M., Cavalcante, T. T. A., Júnior, F. E. A. C., de Carvalho, M. G., Menezes, F. G. R., de Sousa, O. V., & Costa, R. A. (2017). Plectranthus

amboinicus essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and *biofilm* of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC complementary and alternative medicine*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1968-9>

Wang, C., Delcros, J.-G., Cannon, L., Konate, F., Carias, H., Biggerstaff, J., Gardner, R. A., & Phanstiel. (2003). Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters. *Journal of medicinal chemistry*, *46*(24), 5129–5138. <https://doi.org/10.1021/jm030223a>

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>

Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2019). Herbal tea for the management of pharyngitis: Inhibition of *Streptococcus pyogenes* growth and *biofilm* formation by herbal infusions. *Biomedicines*, *7*(3), 63. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030063>

World Health Organization. (2022). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022. World Health Organization.

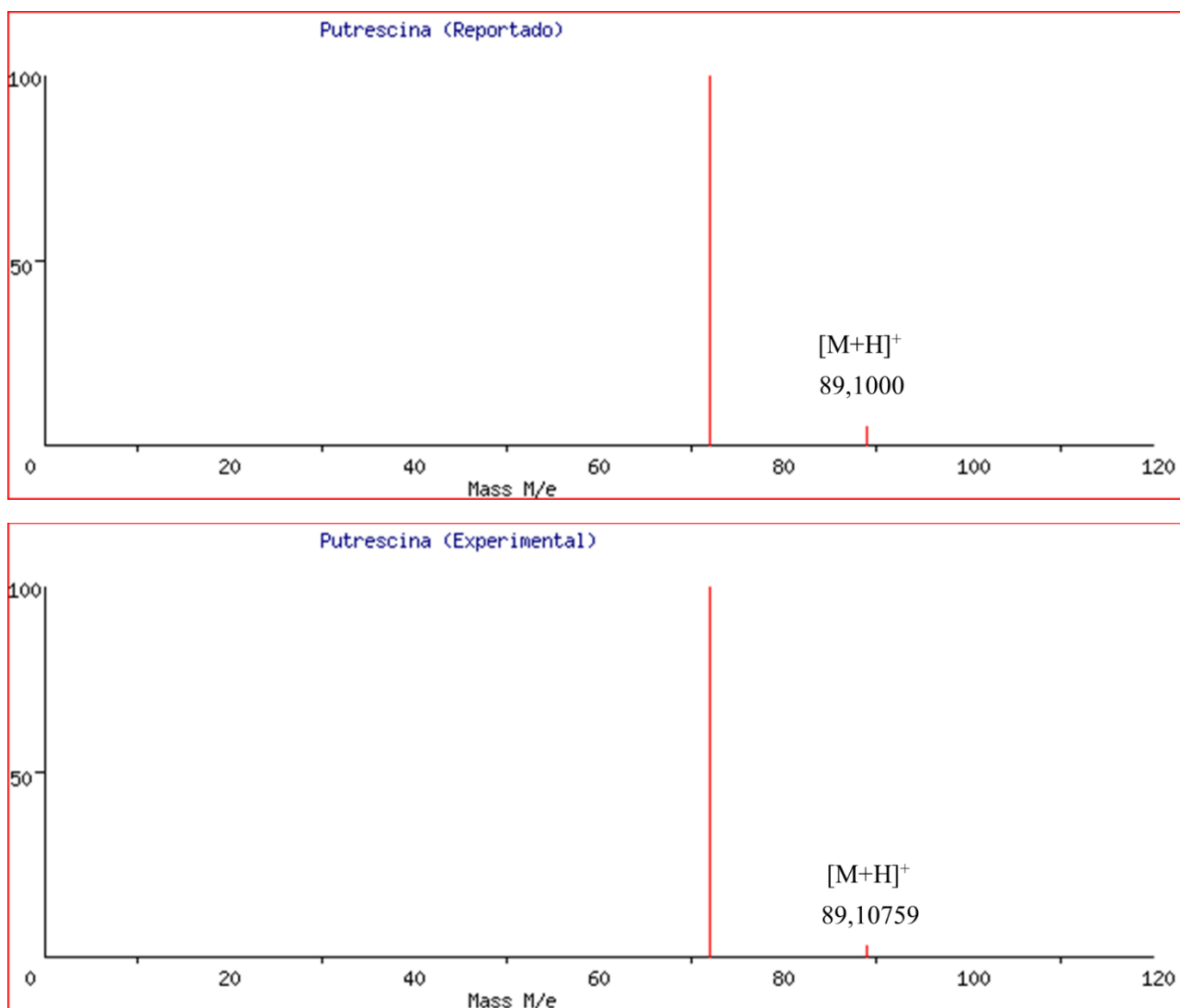
Zehetner, P., Höferl, M., & Buchbauer, G. (2019). Essential oil components and cytochrome P450 enzymes: a review. *Flavour and fragrance journal*, *34*(4), 223–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ffj.3496>

Zhou, J. W., Muhammad, J., Sun, B., Yang, R., Wadood, A., Wang, J. S., & Jia, A. Q. (2019). Metabolomic analysis of *quorum sensing* inhibitor hordenine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, *103*(15), 6271–6285. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09878-w>

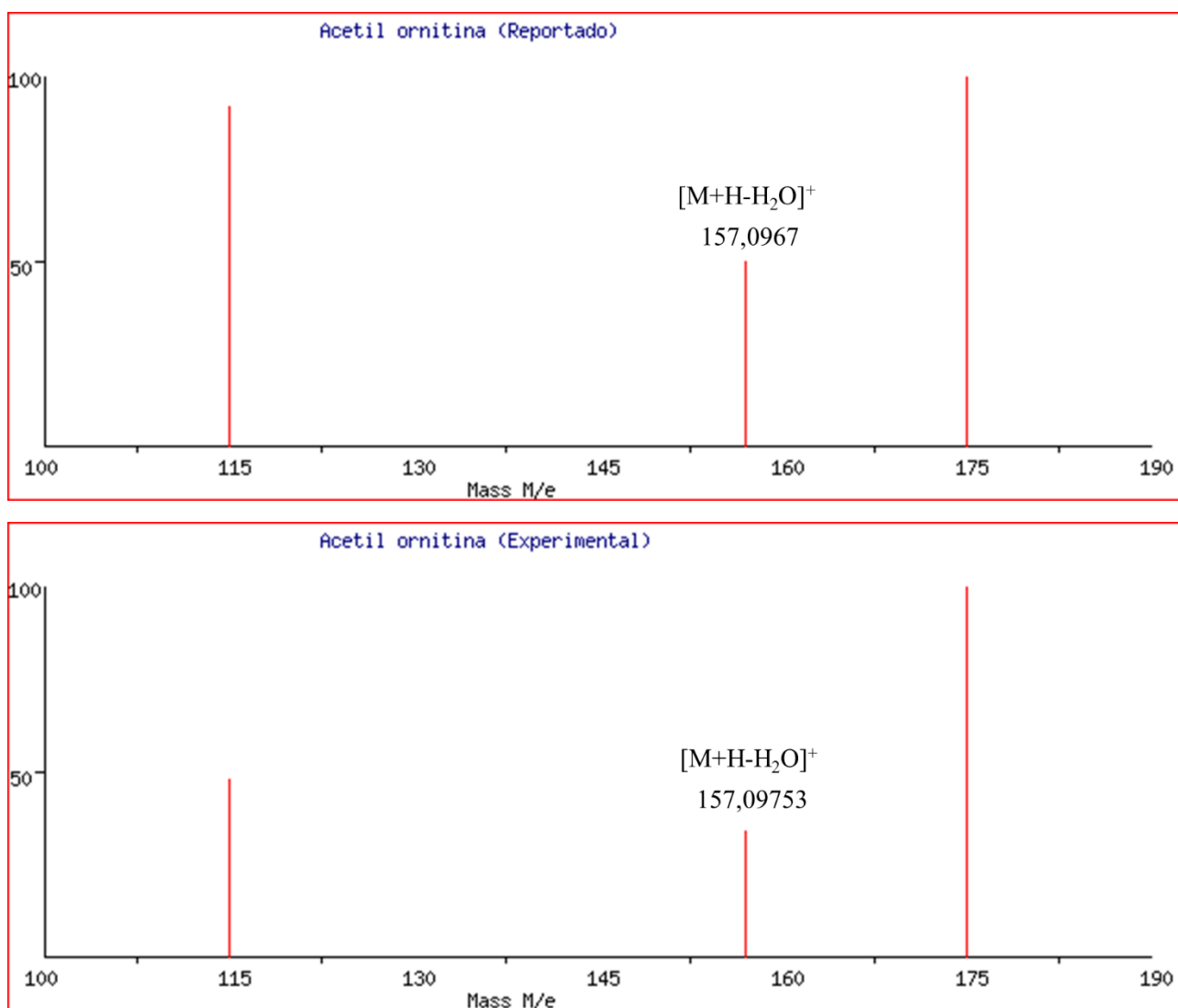
Análisis metabólico basado en espectrometría de masas del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre *Escherichia coli* ATCC 11775

### Material suplementario

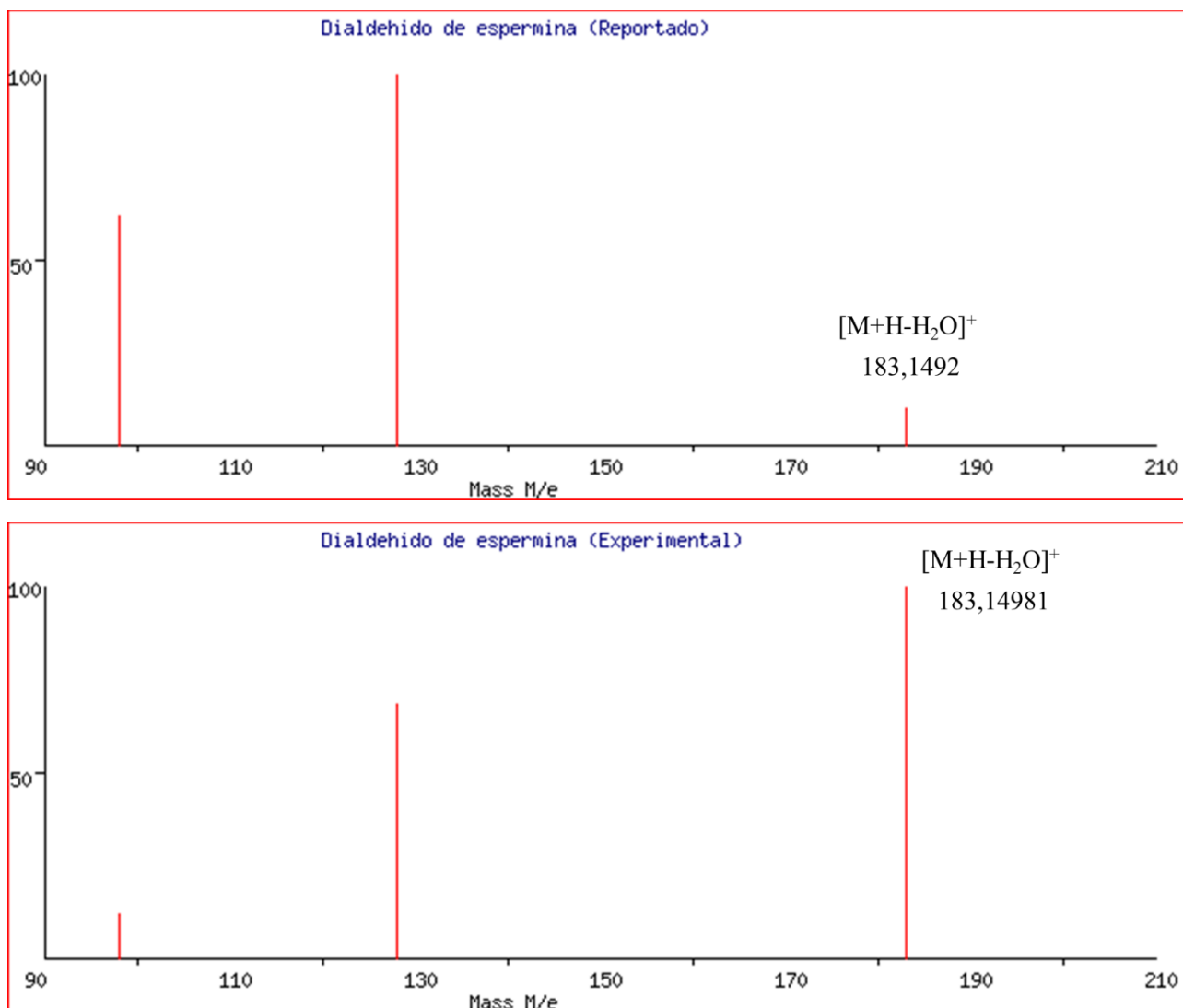
#### Representaciones gráficas de los iones característicos utilizados para realizar la identificación presuntiva de los metabolitos de interés



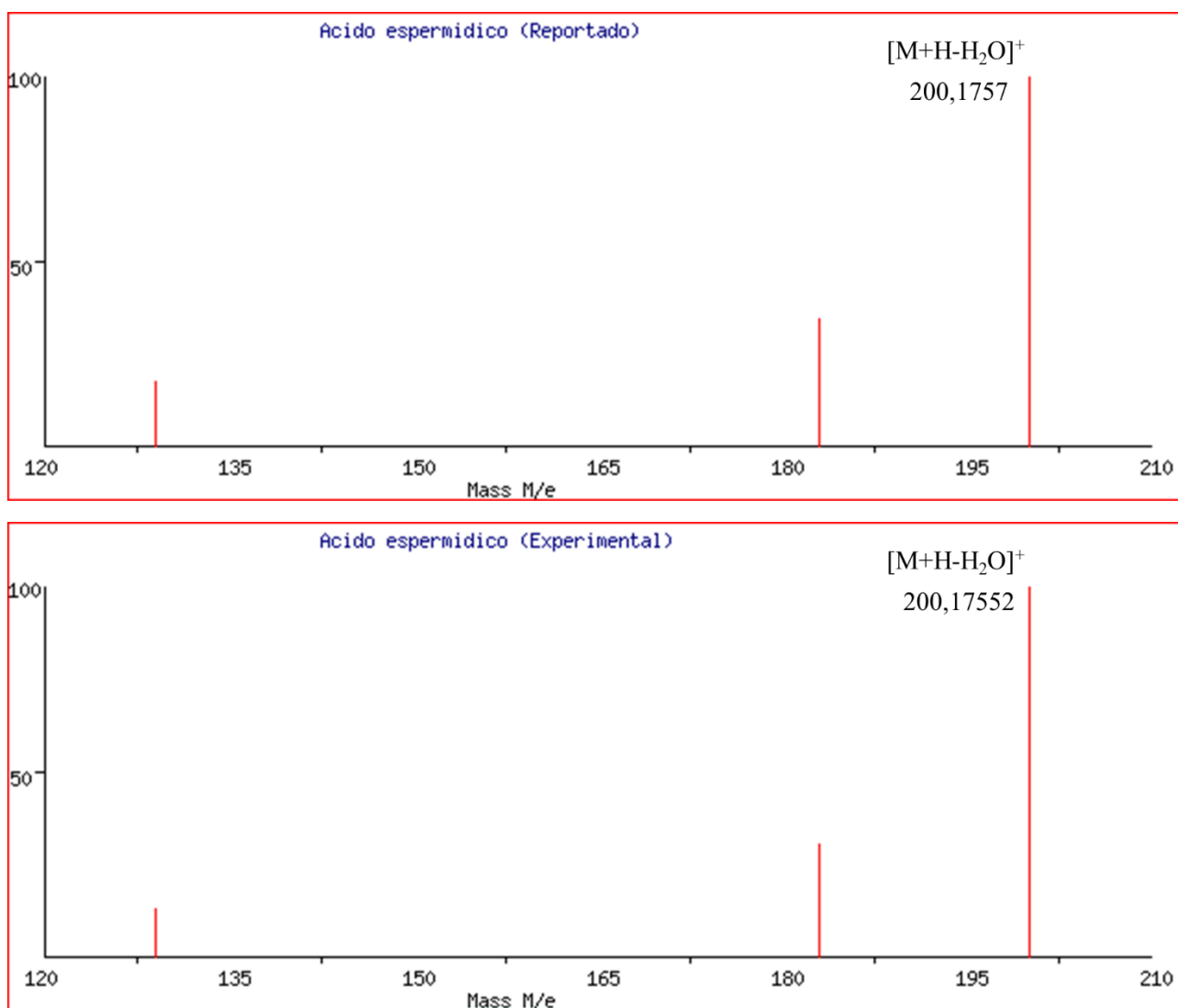
**Figura S1.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la Putrescina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



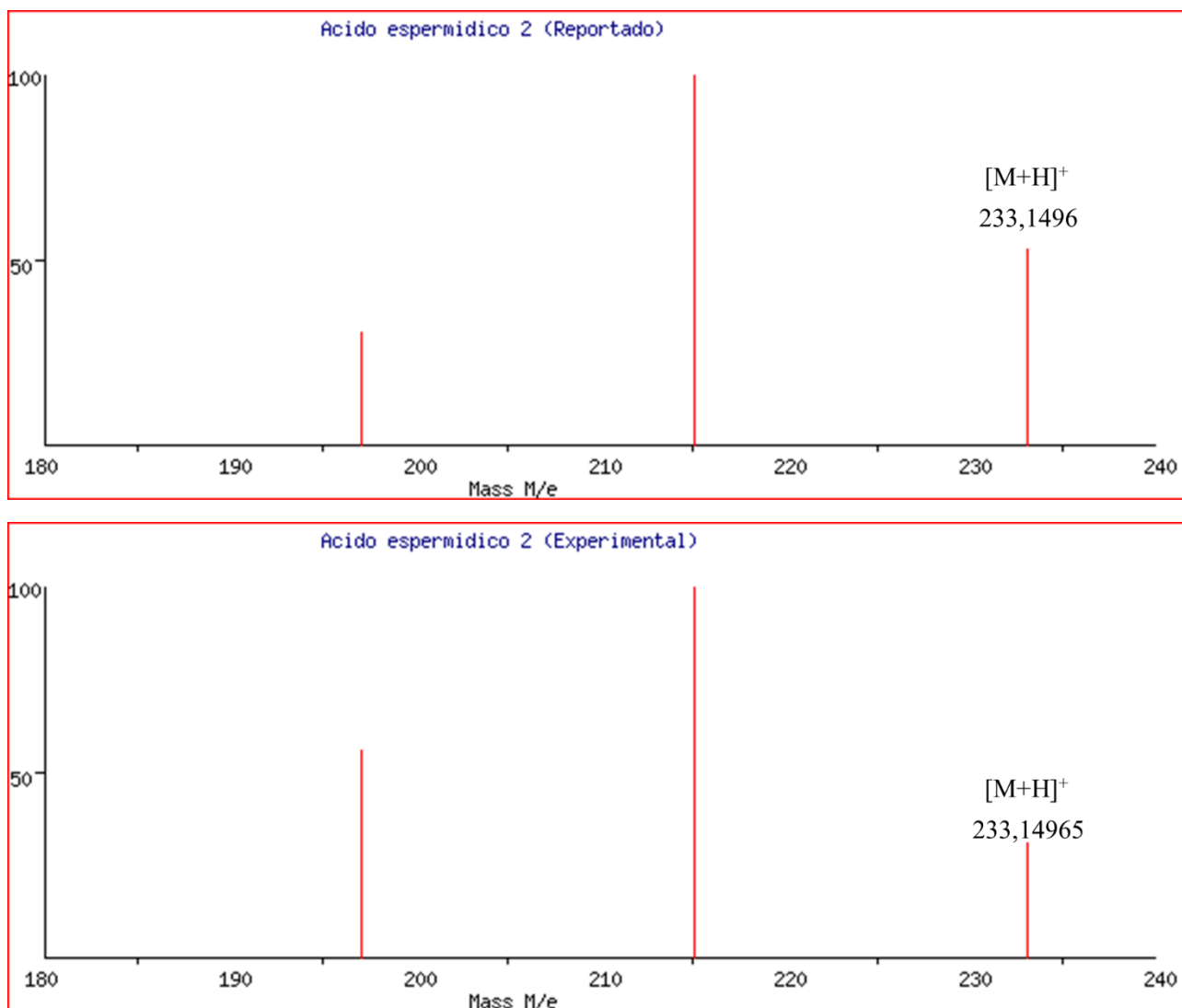
**Figura S2.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la Acetil ornitina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



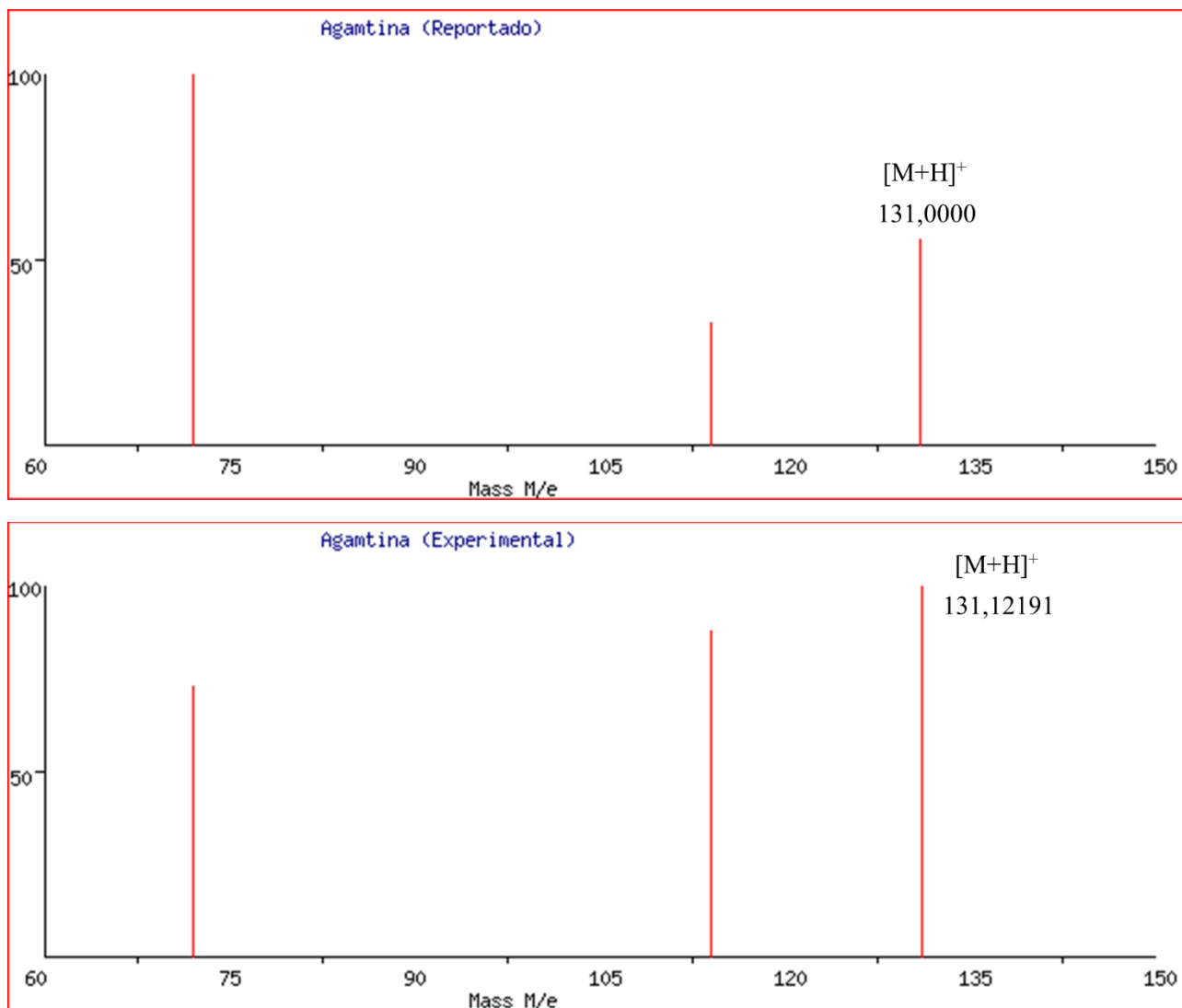
**Figura S3.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Dialdehído de espermina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



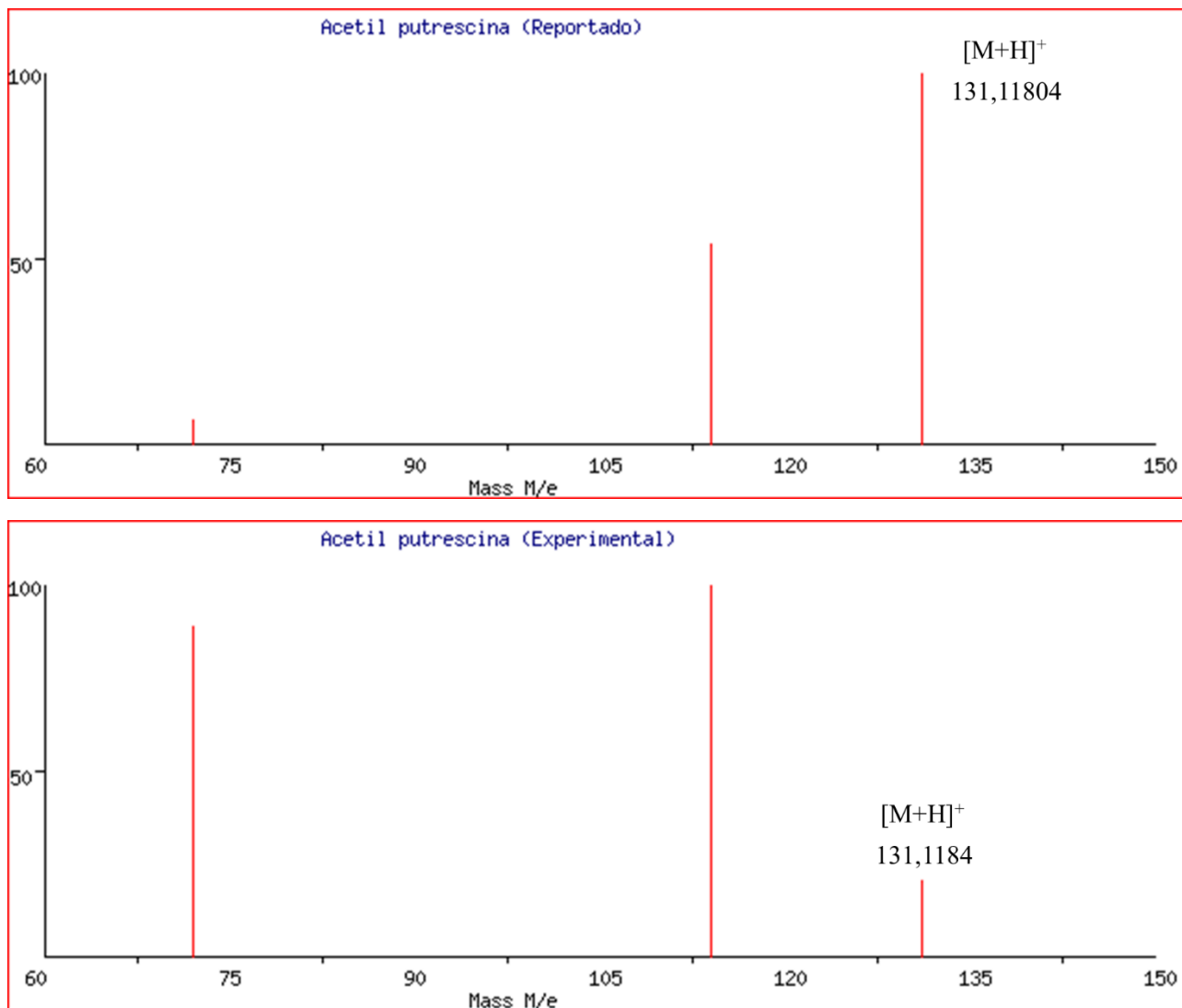
**Figura S4.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Ácido espermidico. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



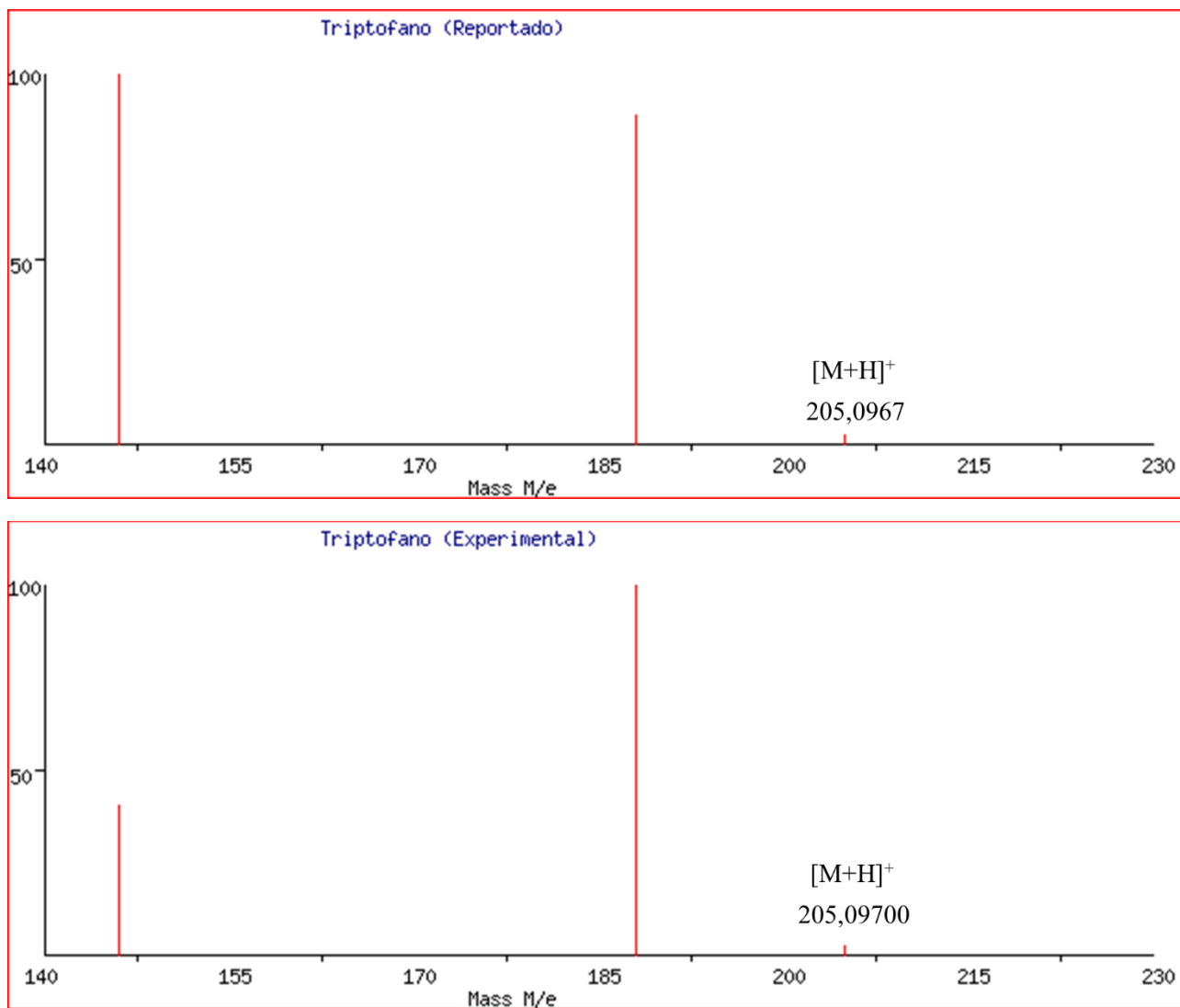
**Figura S5.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Ácido espermidico 2. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



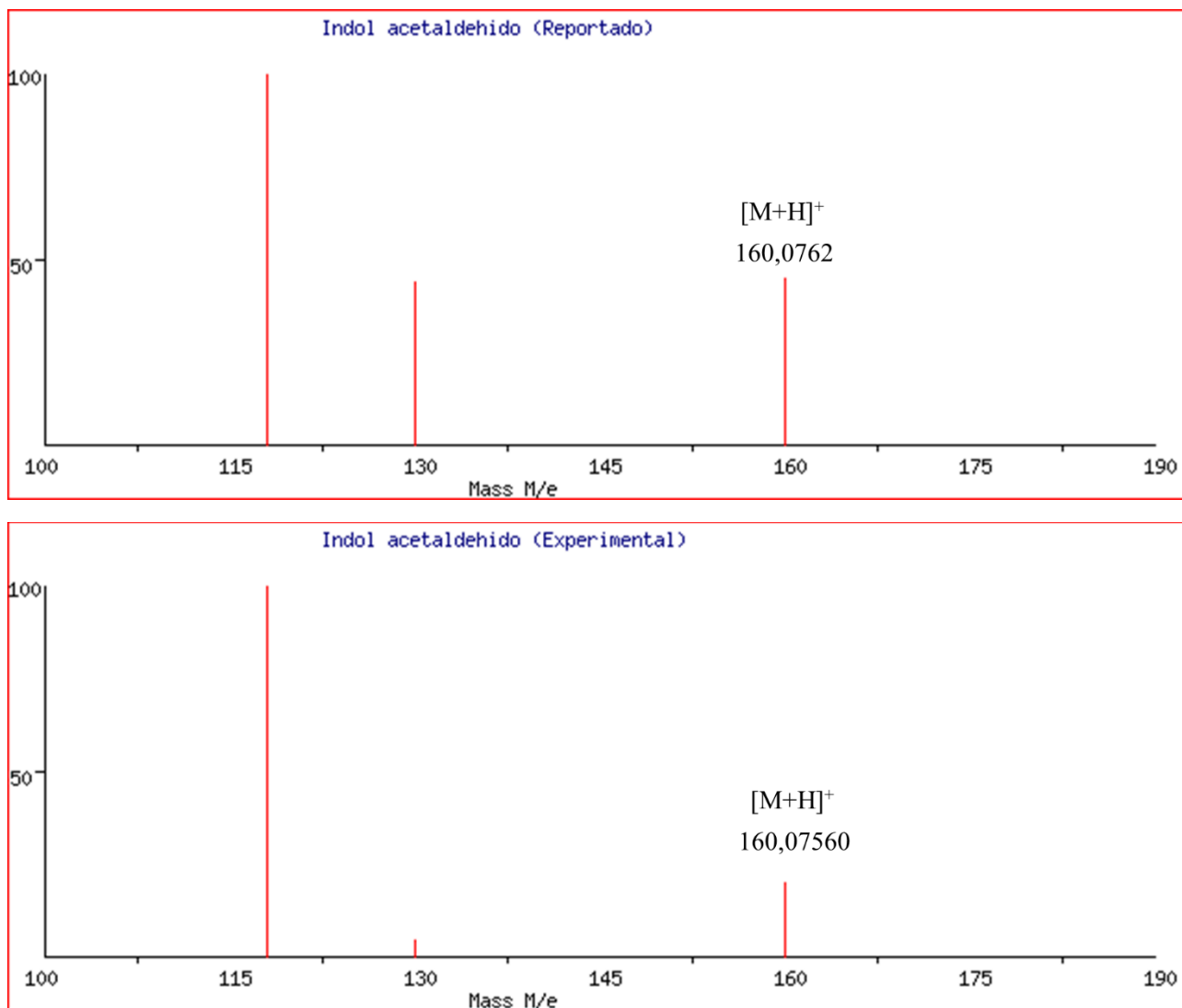
**Figura S6.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la agmatina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



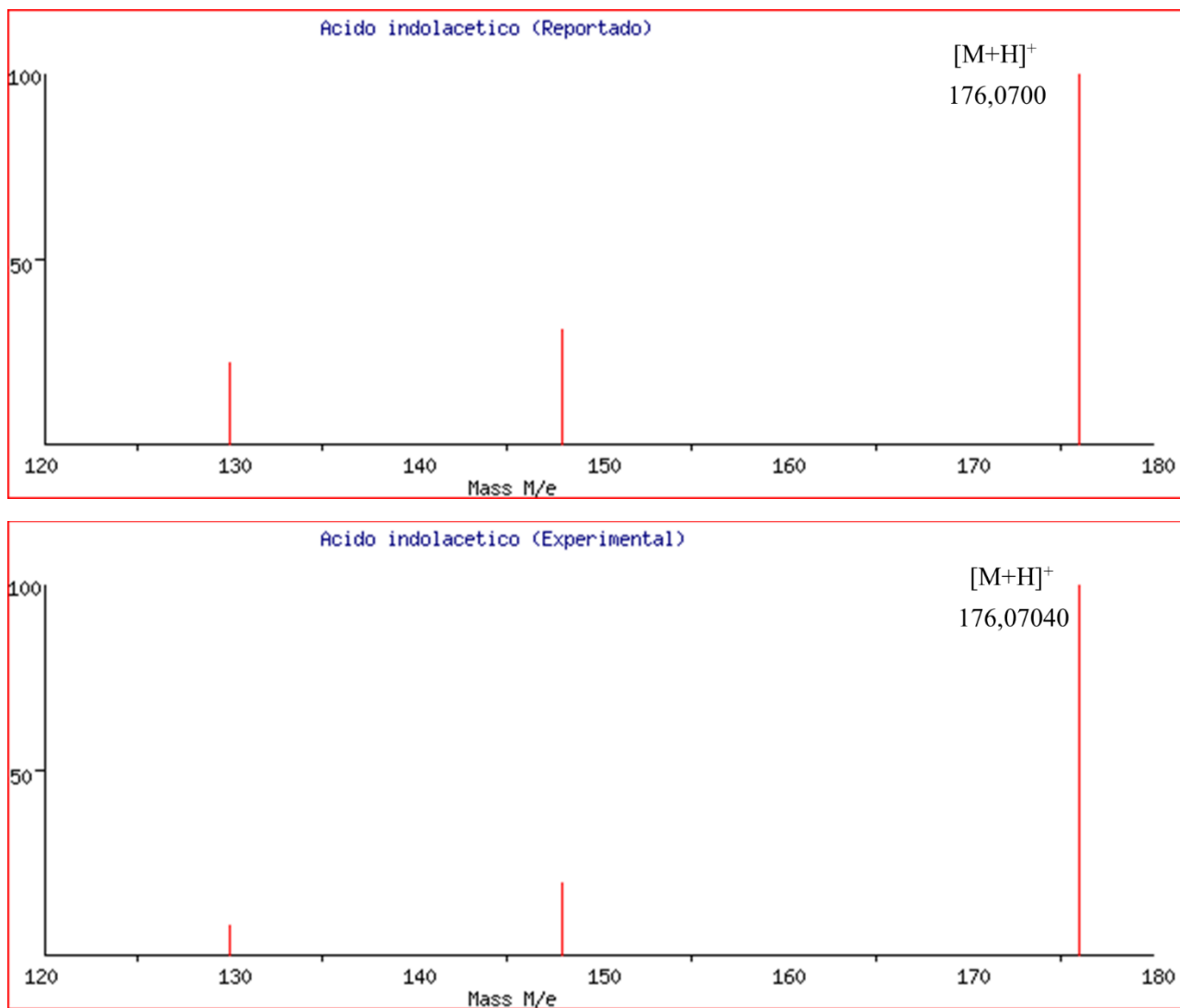
**Figura S7.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la Acetil putrescina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



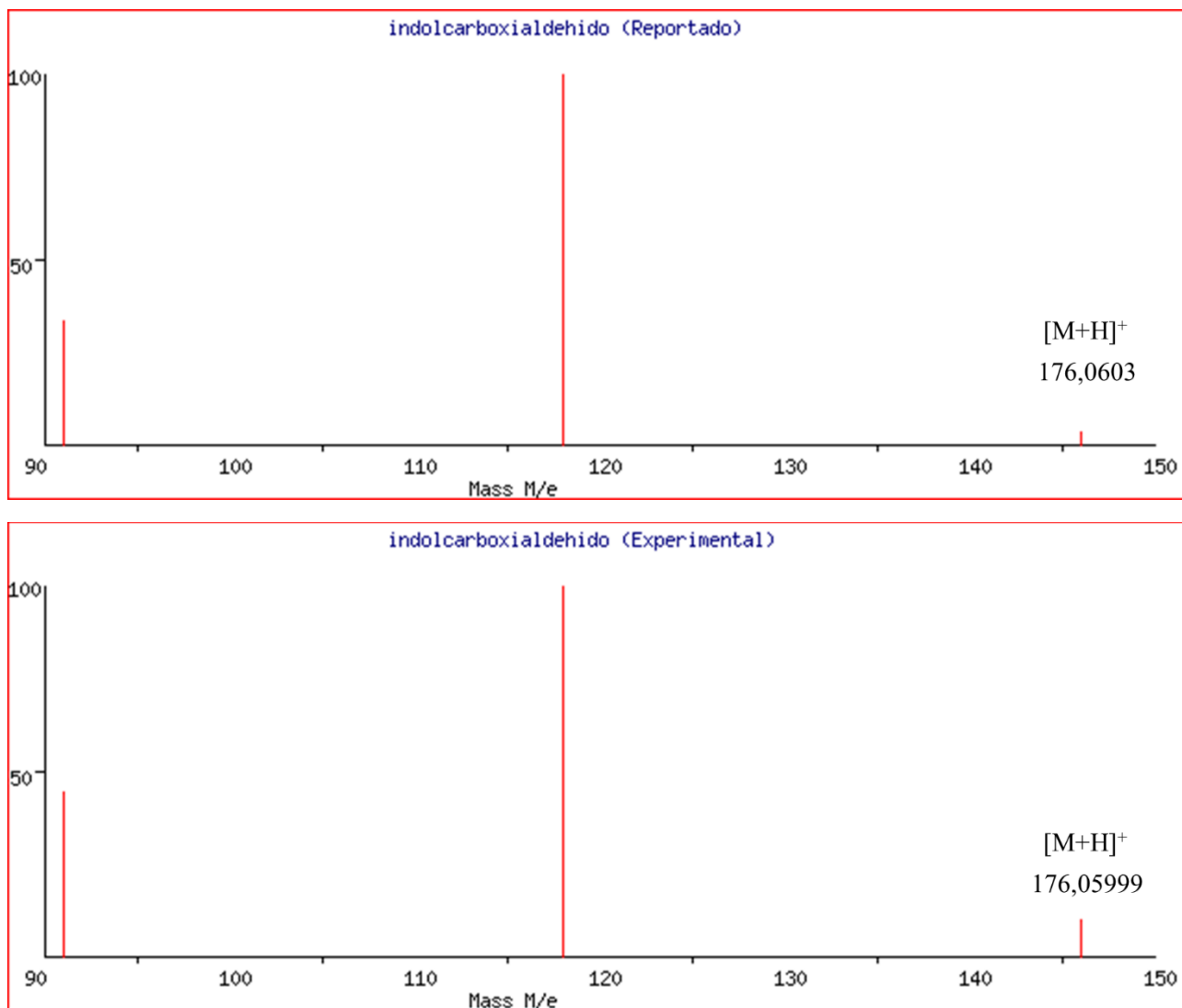
**Figura S8.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Triptófano. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



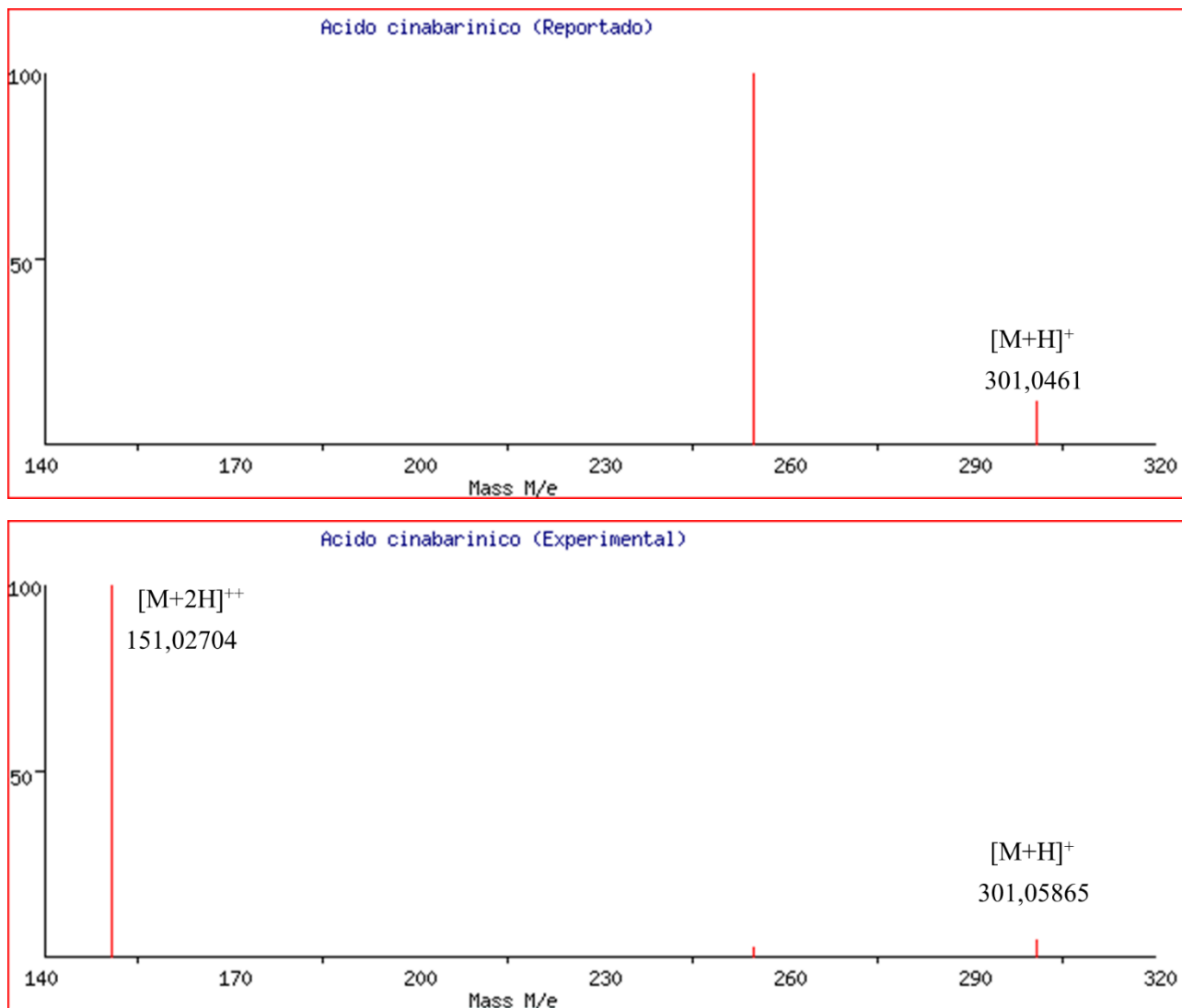
**Figura S9.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Indol acetaldehído. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



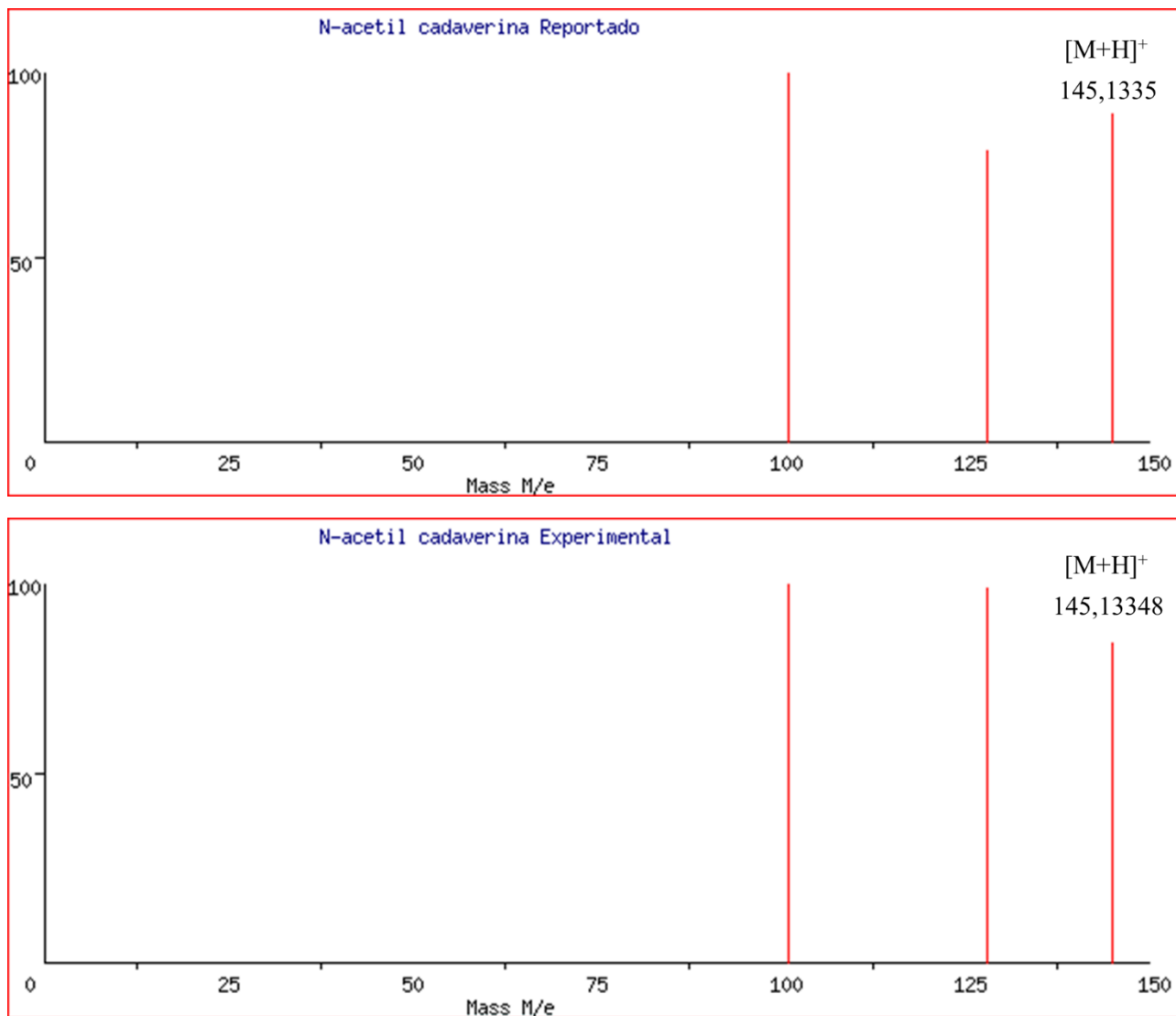
**Figura S10.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Ácido indolacético. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



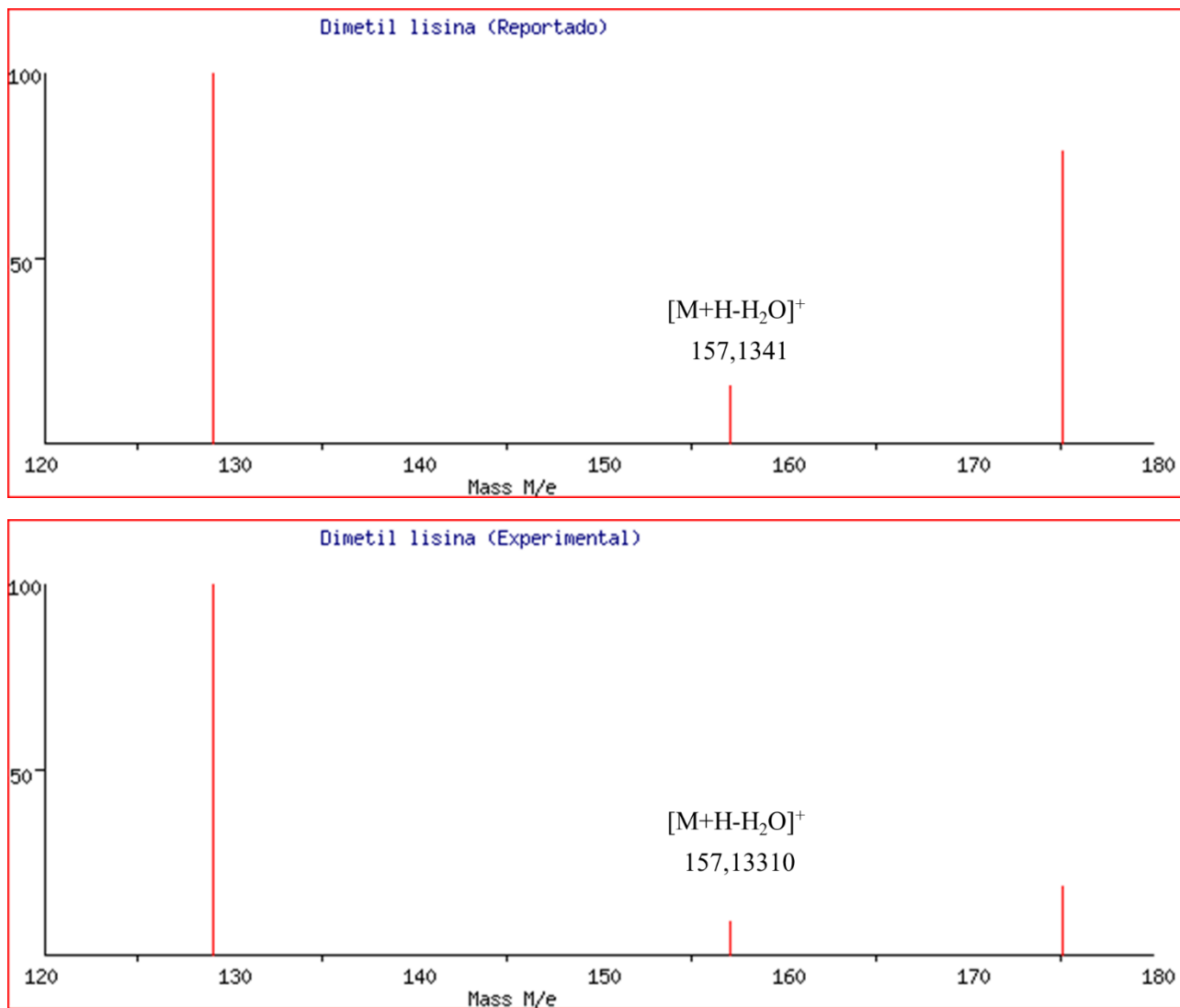
**Figura S11.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Indolcarboxialdehído. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



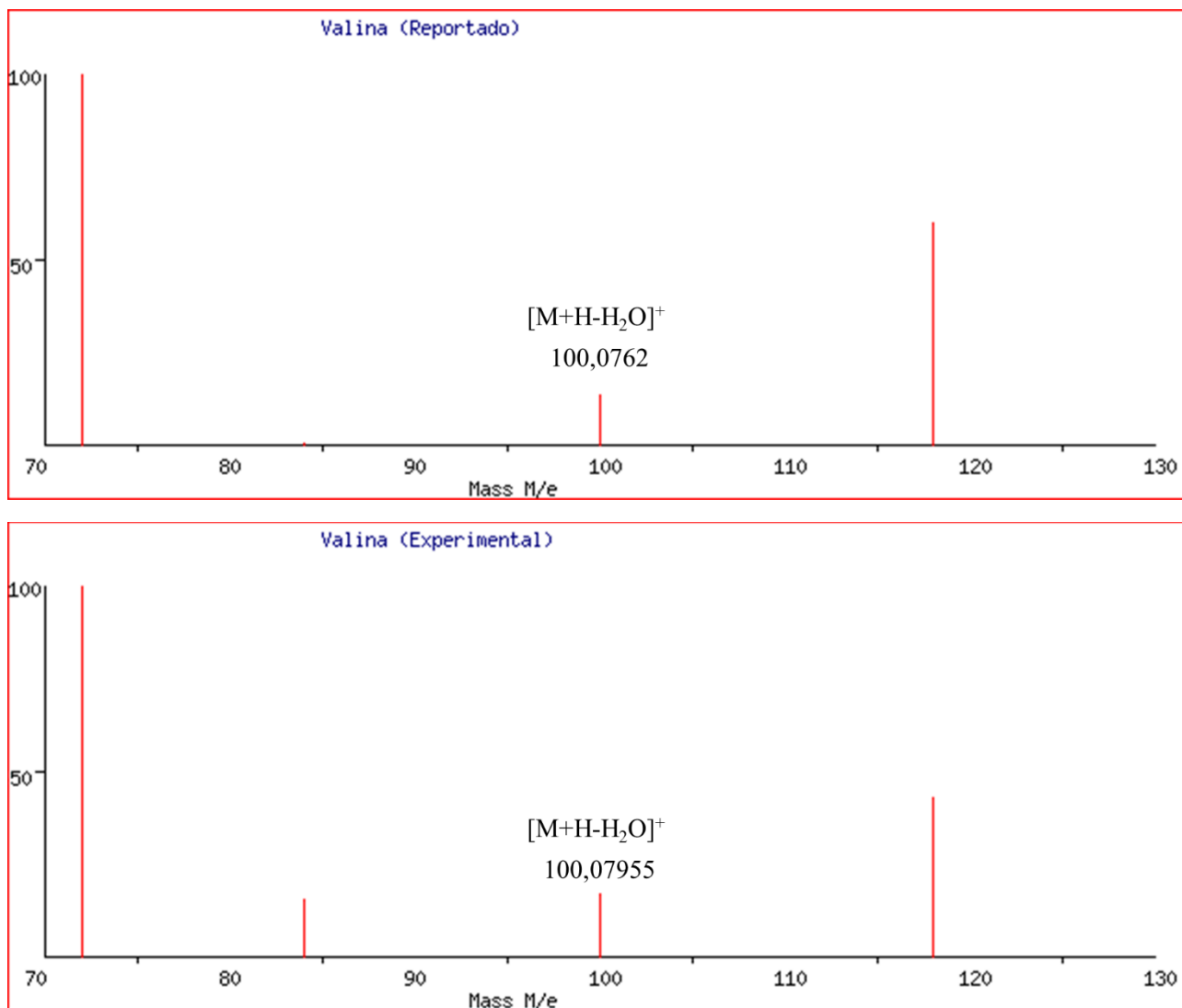
**Figura S12.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Ácido cinabarinico. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



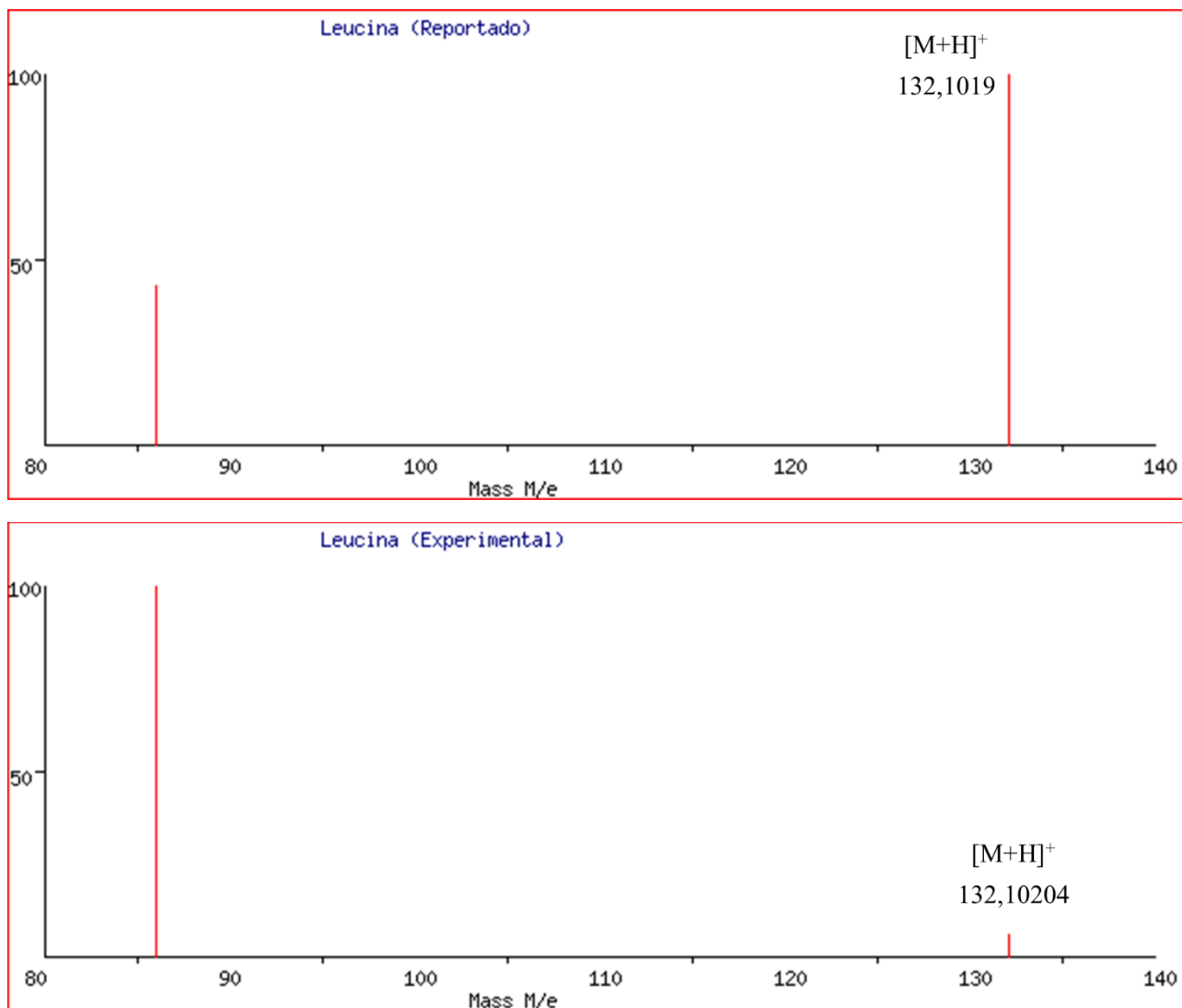
**Figura S13.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la N-acetil cadaverina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



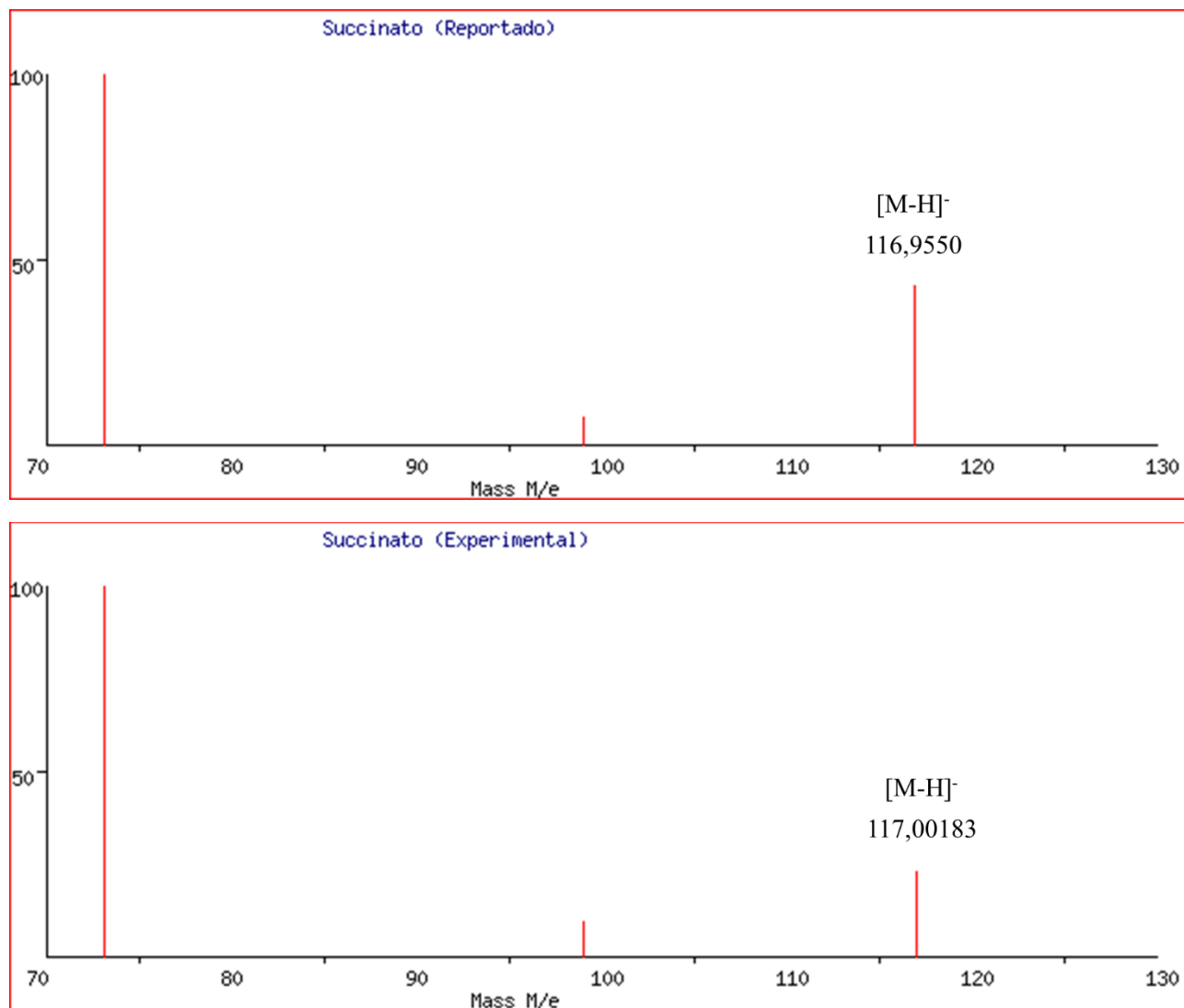
**Figura S14.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la Dimetil lisina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



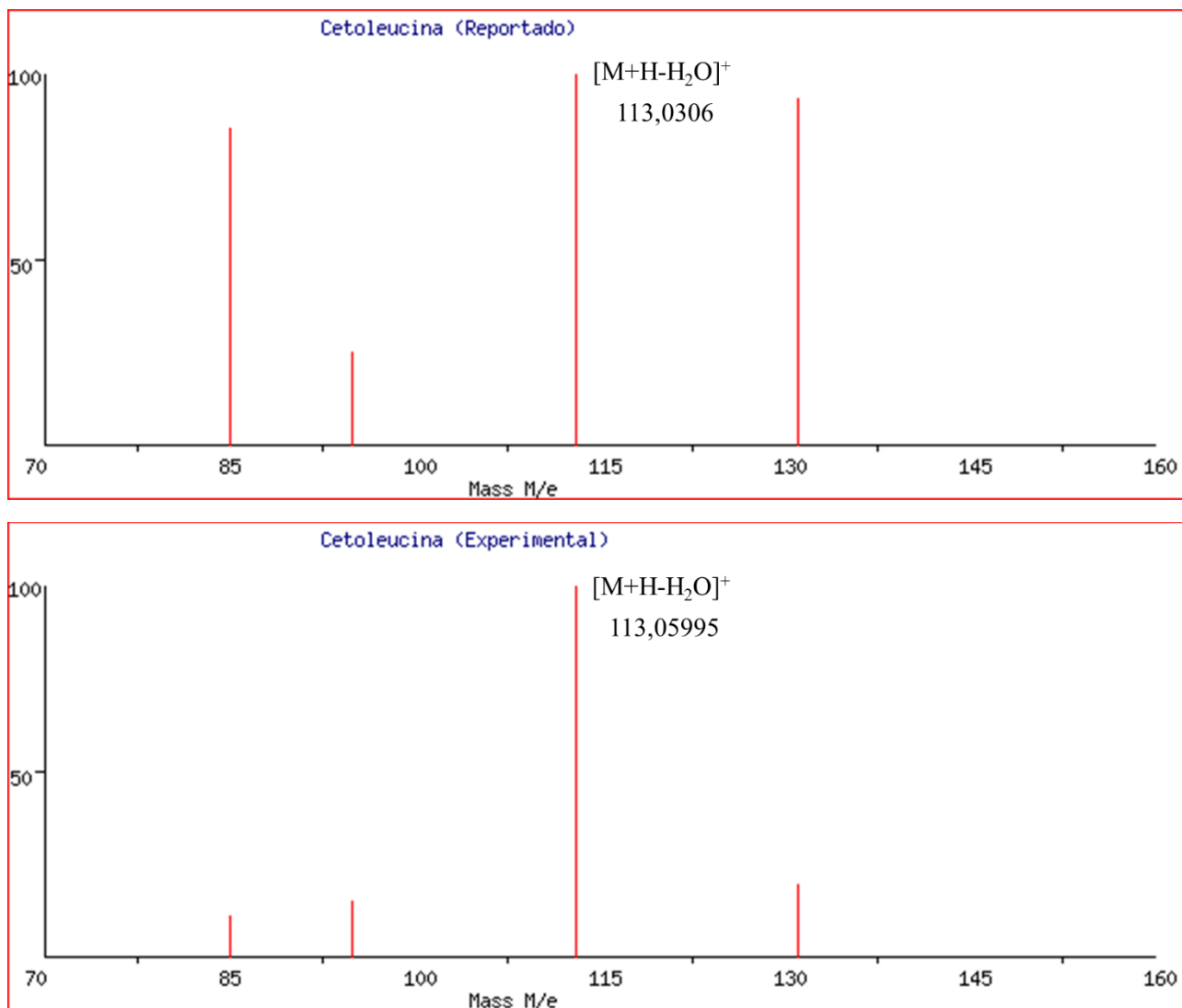
**Figura S15.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la Valina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



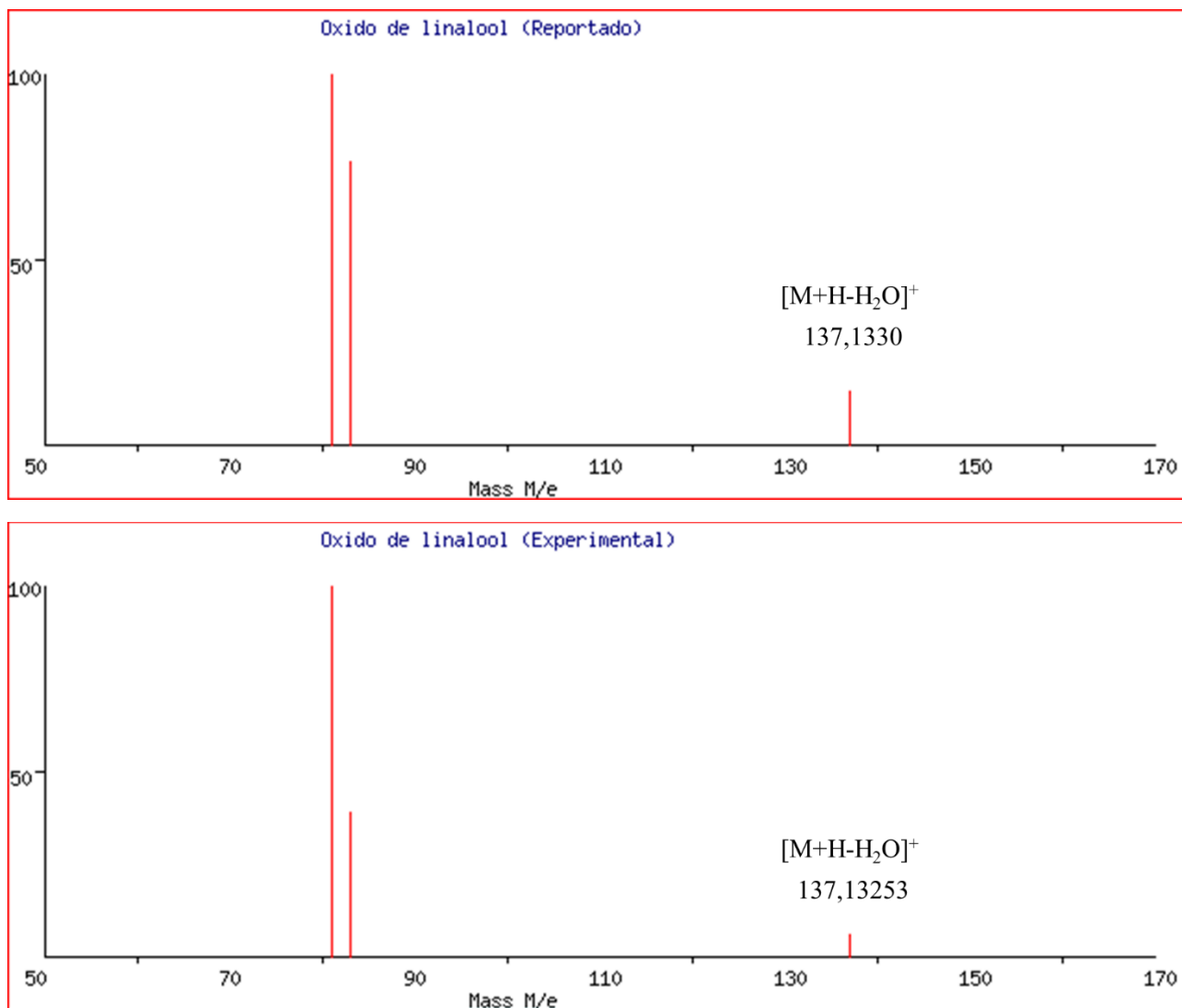
**Figura S16.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la Leucina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



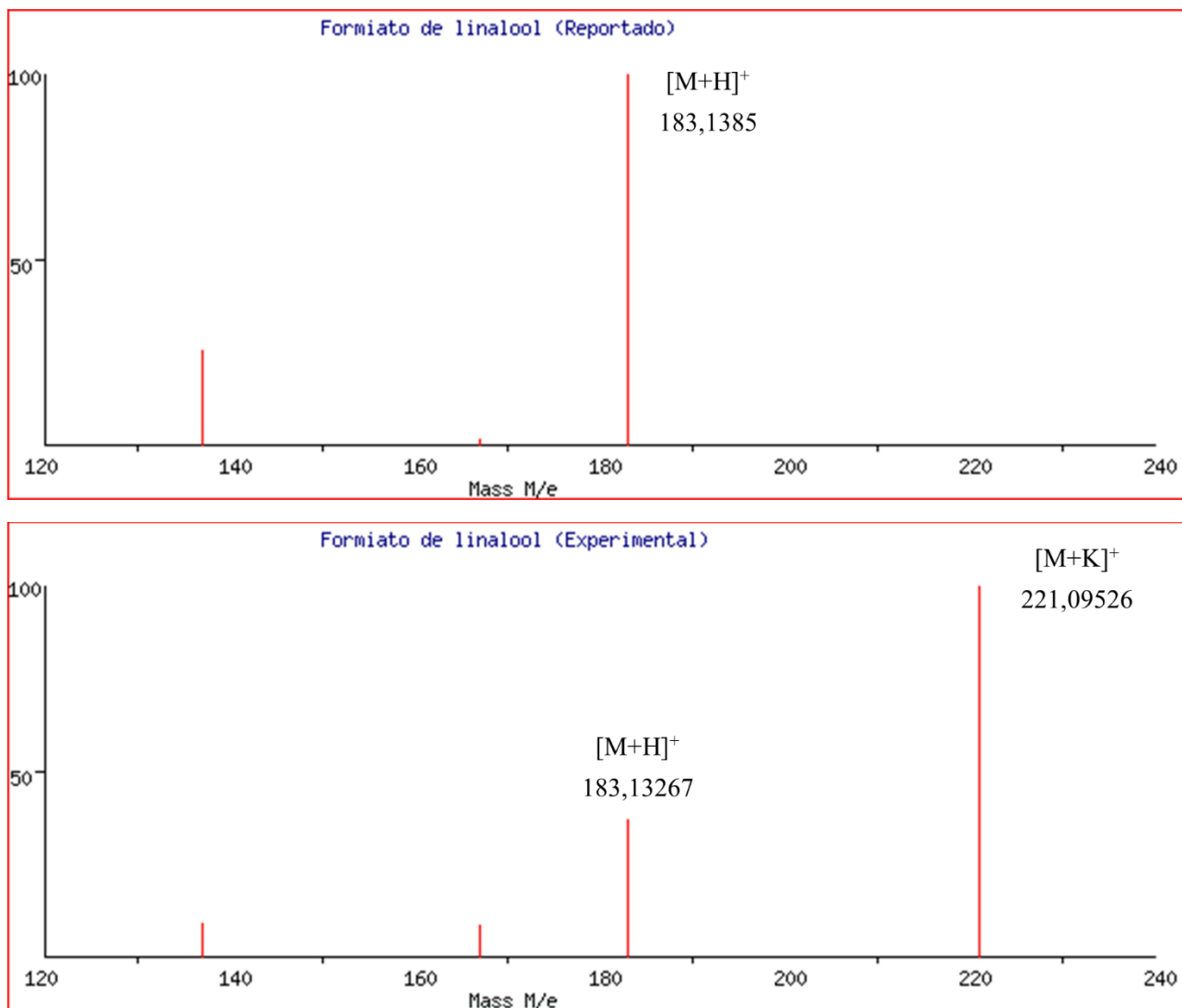
**Figura S17.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Succinato. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



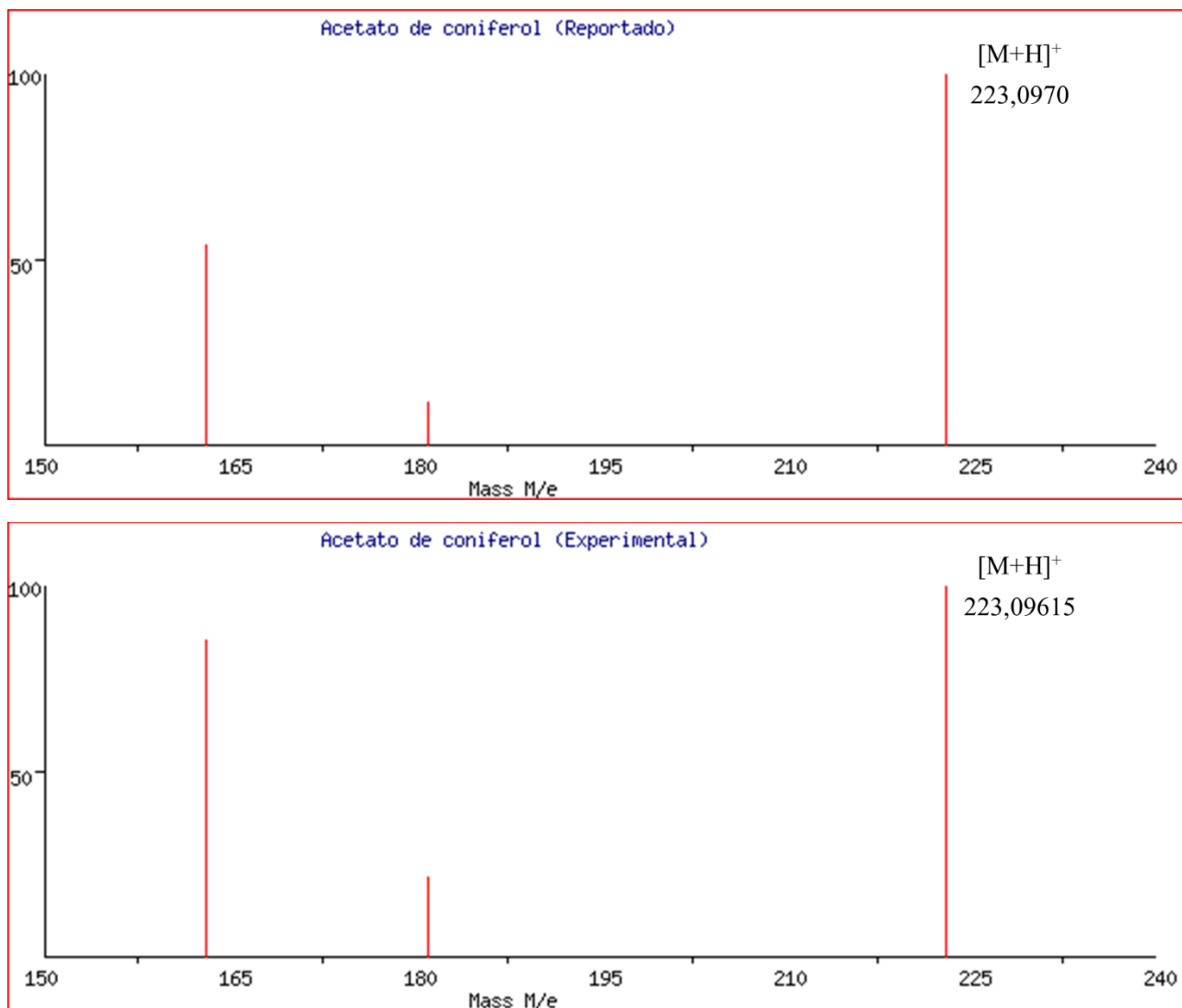
**Figura S18.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas de la Cetoleucina. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



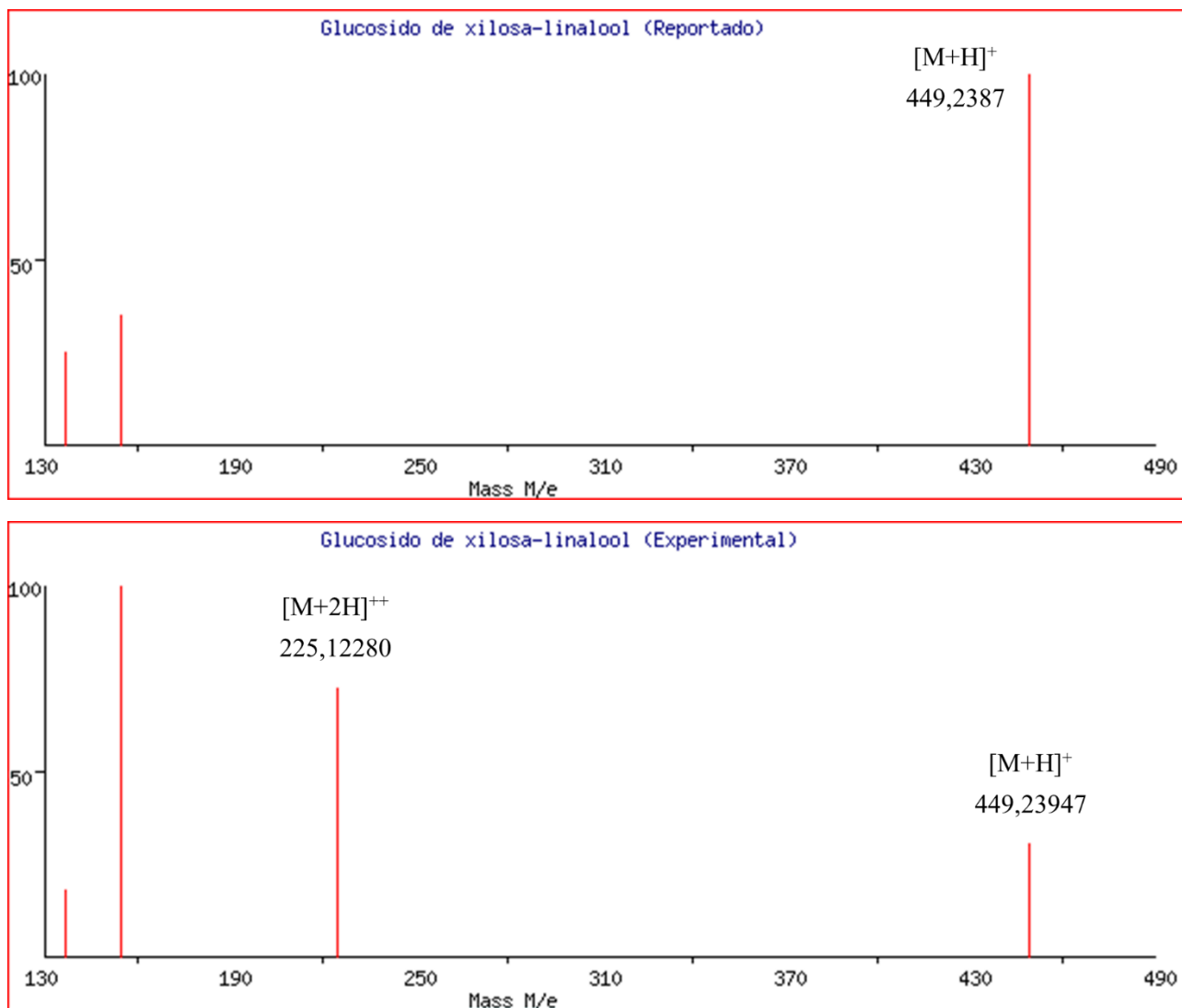
**Figura S19.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Óxido de linalool. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



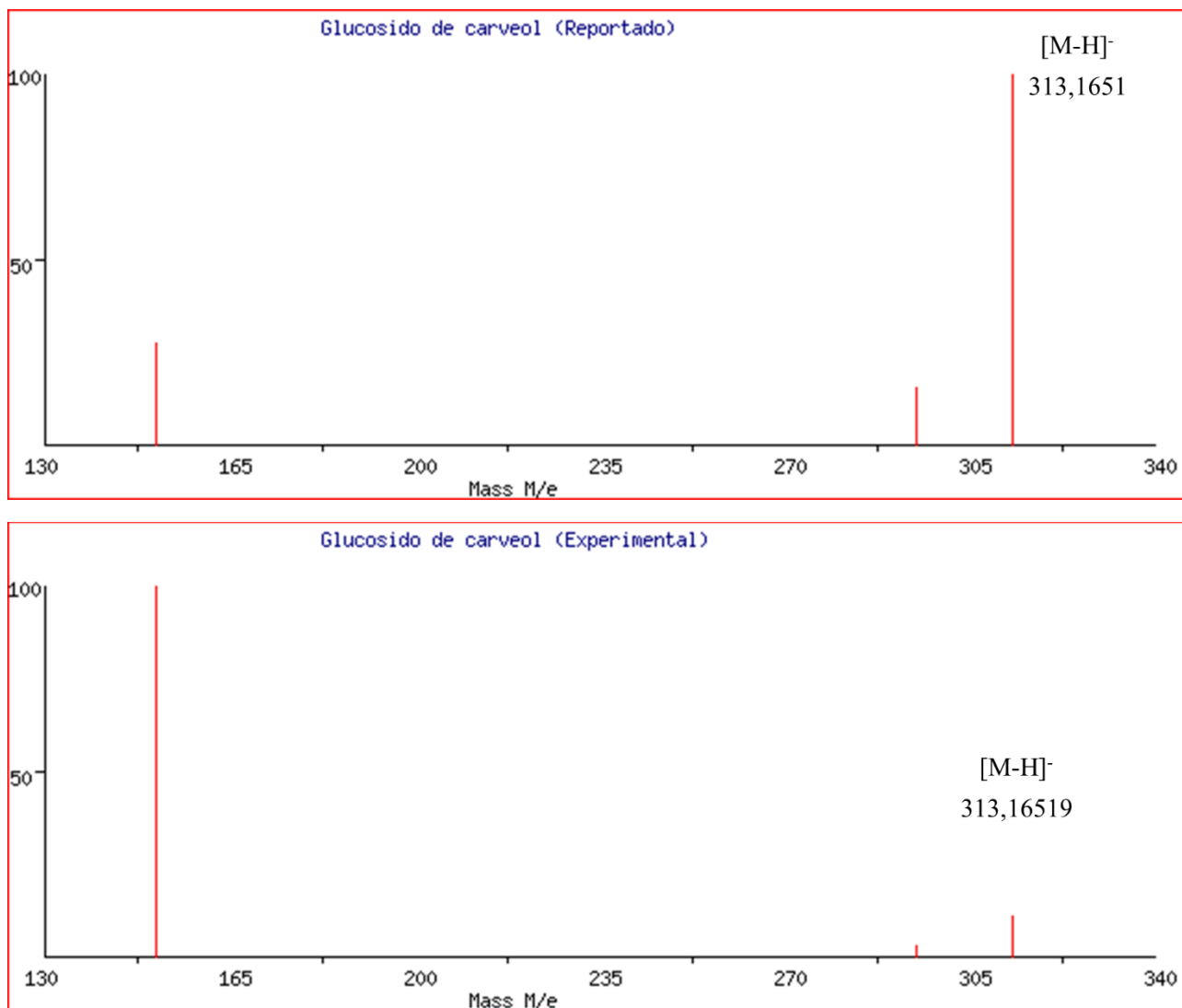
**Figura S20.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Formiato linalool. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



**Figura S21.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Acetato de coniferol. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



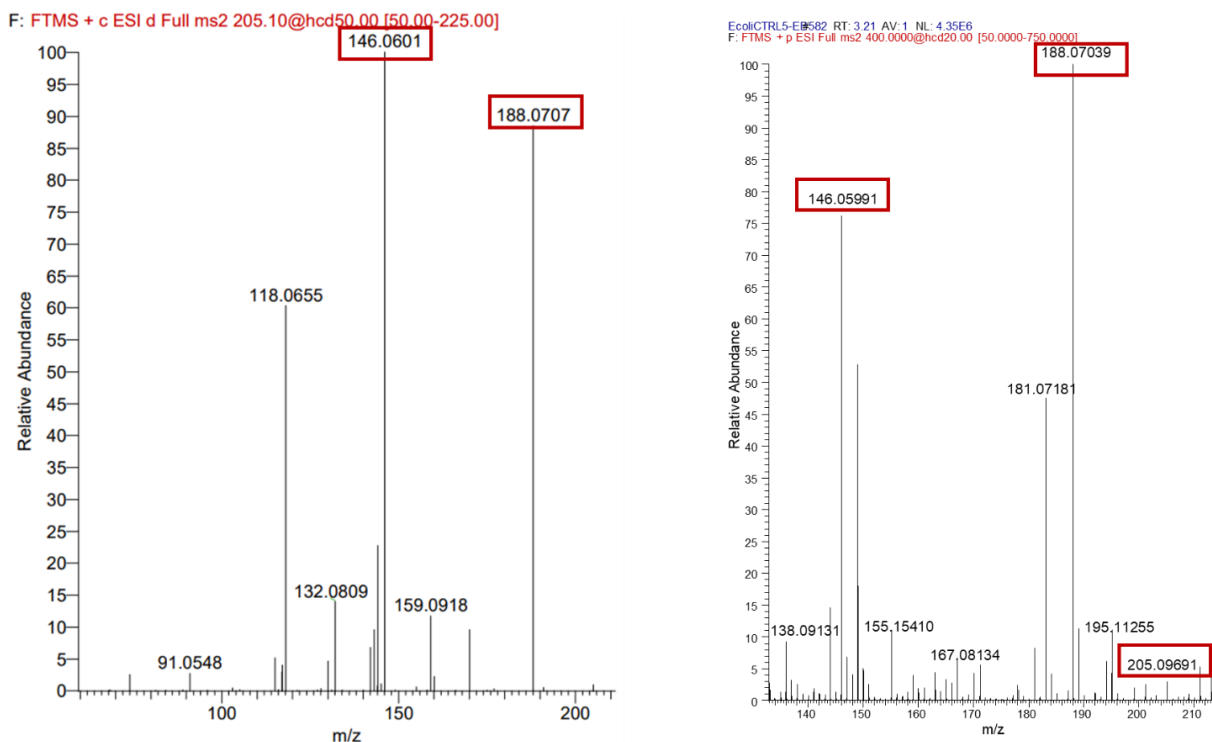
**Figura S22.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Glucósido de xilosa-linalool. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.



**Figura S23.** Iones característicos reportados en bases de datos (superior) y encontrados (inferior) del espectro de masas del Glucósido de carveol. Se resalta el aducto que fue utilizado para calcular el error de masas\*.

### Ejemplo del proceso de identificación presuntiva de los metabolitos de interés para el estudio

La identificación presuntiva de los metabolitos se realizó mediante la comparación de algunos iones característicos de los espectros de masas reportados en repositorios como MassBank, MONA, HMDB y demás. Como se registra en la tabla 5, los iones característicos de cada metabolito fueron documentados y comparados con aquellos reportados en la literatura. A manera de ejemplo, se presenta la comparación de los espectros de masas del triptófano, reportado en la literatura con aquel obtenido en el estudio.



**Figura S24.** Comparación del espectro de masas del triptófano, reportado en MONA por Muz y colaboradores a partir de un estándar de referencia (Izquierda); en comparación con aquel obtenido en el presente estudio (derecha). Se resaltan con un recuadro rojo los iones característicos que fueron empleados para realizar la identificación presuntiva del metabolito (Muz *et al.*, 2017)

