

Trabajo de grado

Análisis metabolómico del efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*

Maria Fernanda ARCINIEGAS GALEANO

Trabajo de grado para optar al título de Química

Director

William Fernando HIDALGO BUCHELI, Ph. D.

Codirector

Marlon Yesid CÁCERES ORTIZ, Ph. D.

Grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM)

Escuela de Química, Facultad de Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mi madre, Yurvy Galeano, mi amiga y compañera incondicional.

Este logro es gracias a ti, madre, gracias por todo tu esfuerzo y dedicación, por ser mi apoyo siempre, por acompañarme y guiarme. Gracias por tus enseñanzas y por tu ejemplo, todo lo que soy es gracias a ti, infinitas gracias, madre.

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar hasta aquí y cumplir mis metas.

A mis padres, por acompañarme, ser mi apoyo e impulsarme día a día a dar siempre lo mejor de mí, ayudándome a cumplir mis sueños.

A mi abuela, Vitelma Rios, por ser mi segunda madre. Gracias por todo tu amor y comprensión.

A mi familia, por acompañarme siempre, por ayudar en mi formación haciendo de mí una mejor persona, gracias por todo su amor y enseñanzas.

A mis amigos, por acompañarme en esos días de subidas y bajadas. Especialmente Camila y Karen, gracias por alegrar mis días y hacer de esos días difíciles más llevaderos, y mis futuros colegas, gracias por acompañarme, ayudarme y enseñarme en este proceso de formación. Deseo verlos a todos terminando esta etapa llenos de alegría y que nuestros caminos se sigan cruzando para compartir otros logros más.

A mi director, William Hidalgo, y codirector, Marlon Cáceres, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de grado, por la experiencia, orientación, enseñanza y guía durante el proceso motivándome siempre a dar lo mejor de mí y aportando a mis conocimientos para ser una mejor profesional.

Agradezco a mi alma mater, Universidad Industrial de Santander, por brindarme la oportunidad de ampliar mis conocimientos, por mi proceso de crecimiento personal para ser una persona integra como profesional en química, y por todos los amigos y compañeros que conocí durante este proceso. Gracias a la Escuela de Química, al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), al programa Bio Reto XXI y al programa Ser Pilo Paga, por el apoyo académico y económico brindado para culminar mis estudios. Igualmente, a mis compañeros conocidos gracias al grupo de investigación, por su apoyo.

Tabla de Contenido

	Pág.
Lista de Tablas	6
Lista de Figuras.....	7
Glosario.....	8
Resumen.....	9
1. Introducción	12
2. Objetivos.	15
2.1 Objetivos generales.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. Marco teórico	15
3.1 Antibióticos y resistencia de los microorganismos.....	15
3.2 Descripción general de la bacteria <i>P. aeruginosa</i>	18
3.3 Afectaciones causadas por <i>P. aeruginosa</i> en la salud mundial	20
3.4 Aceites esenciales (AE)	24
3.5 Metabolómica	27
4. Antecedentes	30
5. Metodología	36
5.1. Microorganismo y medios de cultivo	36
5.2 Caracterización química del AE de <i>L. origanoides</i>	36
5.3 Determinación de la actividad antimicrobiana	38
5.4 Extracción de metabolitos.....	39
5.5 Análisis químico de los extractos mediante UHPLC/HRMS	40

5.6 Identificación de los metabolitos y asociación con las rutas metabólicas afectadas por el aceite esencial.....	41
5.7 Análisis estadístico.....	43
6.Resultados	43
6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana	43
6.2 Análisis metabolómico del efecto antimicrobiano del AE de <i>L. origanoides</i> sobre células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i>	44
7.Discusión.....	55
8. Conclusiones	62
Referencias.....	64
Anexos	86

Lista de Tablas

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales frente al microorganismo <i>P. aeruginosa</i>	34
Tabla 2. Metabolitos identificados (tentativamente) como estadísticamente significativos entre el grupo control y grupo de tratamiento con el AE de <i>L. origanoides</i> sobre células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i> en modo de adquisición de iones positivos.....	48
Tabla 3. Metabolitos identificados (tentativamente) como estadísticamente significativos entre el grupo control y grupo de tratamiento con el AE de <i>L. origanoides</i> sobre células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i> en modo de adquisición de iones negativo.....	49
Tabla 4. Clasificación de los metabolitos identificados tentativamente en las vías metabólicas de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de las vías en KEGG.....	53

Lista de Figuras

Figura 1. Muertes atribuidas a infecciones causadas por resistencia antibacteriana.....	18
Figura 2. Frecuencia de microorganismos en UCI adulto.....	22
Figura 3. Resistencia de microorganismos Gram-negativos en UCI adulto y pediátrica, Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en IAAS.....	23
Figura 4. Aplicaciones de los aceites esenciales.....	25
Figura 5. Curva de crecimiento de la bacteria <i>P. aeruginosa</i> con y sin tratamiento del AE de <i>L. origanoides</i>	44
Figura 6. Gráficos de PCA y PLS-DA del conjunto de los datos obtenidos por LC/MS en <i>P. aeruginosa</i> con y sin tratamiento con el AE de <i>L. origanoides</i>	46
Figura 7. Gráfico de volcán de los datos obtenidos mediante LC/MS.	47
Figura 8. Gráficas de cajas y bigotes de algunos de los metabolitos identificados presuntivamente.....	51
Figura 9. Mapa de calor de los metabolitos más representativos que estuvieron afectados significativamente en <i>P. aeruginosa</i> después del tratamiento con <i>L. origanoides</i>	52
Figura 10. Ruta general de los metabolitos afectados por el AE de <i>L. origanoides</i> sobre las células de <i>P. aeruginosa</i>	54

Glosario

AE: aceite esencial.

EE. UU: Estados Unidos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

GC: gas chromatography (Cromatografía de gases).

LC: liquid chromatography (Cromatografía líquida).

MS: mass spectrometry (Espectrometría de masas).

PCA: Principal Component Analysis (Análisis por componentes principales).

PLS-DA: Partial Least Squares - Discriminant Analysis (Análisis de mínimos cuadrados discriminantes).

ESI: Electrospray Ionization (Ionización por Electrospray).

***m/z*:** relación masa/carga.

***t_R*:** tiempo de retención.

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos es un problema global que surgió desde el descubrimiento de los antibióticos y ha ido en aumento debido a la capacidad que tienen los microorganismos de desarrollar resistencia como un proceso natural de su crecimiento. El patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es una de las principales causas de las infecciones nosocomiales en la actualidad, ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza urgente para la salud pública (OMS, 2017). En consecuencia, la investigación de nuevas alternativas antimicrobianas para combatir la resistencia está en auge.

Aquí, se evaluó el efecto del aceite esencial (AE) de *Lippia origanoides* (*L. origanoides*) sobre el crecimiento y metabolismo de *P. aeruginosa* en estado planctónico. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de microdilución en caldo, y los análisis del perfil metabolómico se realizaron mediante análisis por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS). El AE inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* con una CMI₃₀ de 0,37 mg/mL. Los análisis estadísticos univariados y multivariados permitieron identificar cambios metabólicos significativos en la abundancia de múltiples metabolitos en el microorganismo, los cuales estuvieron asociados con diferentes rutas metabólicas, entre las que se encuentra el metabolismo central del carbono, el metabolismo y la biosíntesis de aminoácidos, el metabolismo de las purinas, entre otros. Teniendo en cuenta el rol que desempeñan estas rutas en diferentes procesos bioquímicos del microorganismo en estudio, se diseñó un mapa metabólico para proponer el posible mecanismo de acción causado por el AE de *L. origanoides* sobre *P. aeruginosa*. Esta investigación destacó el importante papel de los AE como alternativas terapéuticas, con el fin de

ampliar el conocimiento respecto al modo de acción para el desarrollo de nuevos productos antimicrobianos.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, estado planctónico, metabolitos secundarios, alternativas antimicrobianas, rutas metabólicas.

Abstract

Antimicrobial resistance is a global problem that has emerged since the discovery of antibiotics and has been increasing due to the ability of microorganisms to develop resistance as a natural process of their growth. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is one of the main causes of nosocomial infections today, has been classified by the World Health Organization (WHO) as an urgent threat to public health (WHO, 2017). Consequently, research into new antimicrobial alternatives to combat resistance is booming.

In here, the effect of essential oil (EO) of *Lippia origanoides* (*L. origanoides*) on the growth and metabolism of *P. aeruginosa* in planktonic state was evaluated. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method, and metabolomic profile analyses were performed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-performance mass spectrometry (UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS) analysis. AE inhibited the growth of *P. aeruginosa* with an MIC₅₀ of 0,37 mg/mL. Univariate and multivariate statistical analyses allowed the identification of significant metabolic changes in the abundance of multiple metabolites in the microorganism, which were associated with different metabolic pathways, including central carbon metabolism, amino acid metabolism and biosynthesis, purine metabolism, among others. Taking into account the role played by these pathways in different biochemical processes of the microorganism under study, a metabolic map was designed to propose the possible

mechanism of action caused by the EO of *L. origanoides* on *P. aeruginosa*. This research highlighted the important role of EOs as therapeutic alternatives, in order to expand the knowledge regarding the mode of action for the development of new antimicrobial products.

Keywords: antimicrobial resistance, planktonic state, secondary metabolites, antimicrobial alternatives, metabolic pathways.

1. Introducción

Los antibióticos han sido una revolución en la medicina, su descubrimiento se convirtió en una alternativa para el tratamiento de diferentes enfermedades producidas por agentes biológicos infecciosos, pero desde hace varios años se ha reportado la aparición de resistencia bacteriana a estos fármacos que ha deteriorado su eficacia (Gómez *et al.*, 2020). Los antibióticos se consideran como una alternativa para que el cuerpo humano se defienda de las bacterias, no obstante, los genes bacterianos generan una resistencia con el fin de defenderse de estos, por lo cual desarrollan diferentes mecanismos para contrarrestar el efecto de los fármacos a través de una expresión natural de la genética bacteriana, provocando que evolucionen y sean cada vez más resistentes (Cabrera *et al.*, 2007; Alós, 2015). Desde los inicios, el uso masivo y descontrolado de los antibióticos ha sido la causa del desarrollo de la resistencia bacteriana, y posteriormente el aumento en la prevalencia de la resistencia en el mundo, debido al uso inadecuado de antibióticos tanto en el campo médico como en el industrial, lo cual ha ocasionado una emergencia en la salud pública mundial (Belloso, 2009).

En la actualidad, uno de los problemas más importantes de la salud pública es la búsqueda de estrategias y control para contrarrestar la resistencia bacteriana. En el 2020 la OMS clasificó la resistencia antimicrobiana dentro de la lista de “problemas sanitarios urgentes de dimensión mundial” (Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2021). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en los Estados Unidos estimaron que en el mundo aproximadamente 2 millones de personas se infectan por algún tipo de patógeno y alrededor de 23.000 personas mueren por año a causa de patógenos resistentes a los antibióticos (Mir *et al.*, 2023). En el 2017 la OMS publicó su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los

antibióticos, en la cual se encuentra la bacteria *P. aeruginosa* con prioridad crítica debido a que presenta multirresistencia a diferentes fármacos (OMS, 2017).

P. aeruginosa es una bacteria patógena, Gram-negativa, que causa infecciones graves relacionadas con afectaciones del sistema respiratorio, infecciones oculares y del tracto urinario, neumonía y complicaciones en diferentes heridas quirúrgicas (Carroll *et al.*, 2016). Es un patógeno oportunista responsable del 10% de las infecciones hospitalarias, siendo clasificadas como infecciones graves y potencialmente mortales (Mehrad *et al.*, 2015), esto se debe al amplio espectro de resistencia que presenta a diferentes antibióticos, que es debido a que posee una membrana externa de permeabilidad limitada que, precisamente, limita el acceso de los antibióticos, incluidos aquellos a los que nunca ha estado expuesta (Castanheira *et al.*, 2022). Sus infecciones son difíciles de tratar debido a los sofisticados mecanismos de resistencia que genera usando antibióticos comunes, y en algunos casos genera resistencia durante el tratamiento, lo que ha reducido la eficacia de los tratamientos disponibles, por lo cual su tratamiento se realiza usando diferentes fármacos de amplio espectro para evitar el desarrollo acelerado de resistencia (Burrows, 2018; Otis *et al.*, 2019). Además, se ha evidenciado que *P. aeruginosa* presenta resistencia del 10% al 50 % hacia la actividad de los carbapenémicos en la mayoría de los países, los cuales son antibióticos de último recurso conocidos por su importancia en el uso de diferentes tratamientos, lo que ha convertido sus mecanismos de resistencia en los más estudiados (El-Sherbiny *et al.*, 2022; Feng *et al.*, 2017).

Debido a los diferentes reportes expuestos por la OMS y la preocupación de la comunidad médica y científica por el aumento en la resistencia antimicrobiana, se ha generado la necesidad de investigar nuevas alternativas antibacterianas, por lo cual, en la actualidad se está en la búsqueda

de diferentes estrategias alternativas para lograr disminuir o mitigar la probabilidad de encontrar multirresistencia microbiana.

Una de las alternativas más prometedoras es el uso de productos naturales, entre ellos, los aceites esenciales (AE), debido a que poseen una amplia cantidad de metabolitos secundarios que tienen la capacidad de inhibir o retrasar el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras (Nazzaro *et al.*, 2013). En los últimos años ha aumentado la utilización y consumo de los productos naturales en diferentes industrias, trayendo consigo un desarrollo importante a nivel mundial en la industria de plantas aromáticas y medicinales (Castañeda *et al.*, 2007). Los mecanismos de acción que ejercen los componentes de los AE no han sido identificados completamente, sin embargo, los componentes químicos mayoritarios de los AE se han estudiado por tener actividad contra una amplia gama de dianas farmacológicas; aunque cada aceite tiene composición química diferente, los AE han sido caracterizados por sus propiedades antiinflamatorias, antivirales y antibacterianas, y son considerados como una alternativa viable debido a sus diferentes modos de acción estudiados para afectar a las células bacterianas, logrando inhibir el crecimiento y disminuir la probabilidad de aparición de microorganismos resistentes (Gómez *et al.*, 2020).

En el presente estudio, se utilizó el AE de *L. origanoides* para explorar su efecto biológico a nivel metabólico sobre la bacteria *P. aeruginosa*, dado que Cáceres *et al.* (2020) reportaron que este AE presenta buena actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos. Por tanto, a través de una aproximación en metabolómica basada en análisis por espectrometría de masas de alta resolución (LC/MS) se determinó las posibles rutas metabólicas alteradas en el microorganismo durante el tratamiento con el AE y, con especial interés, en aquellas rutas involucradas en la formación del *biofilm*, siendo este un medio de barrera física por el cual el microorganismo contrarresta la efectividad de muchos fármacos. Los alcances de la investigación

permitieron ampliar el conocimiento sobre las vías metabólicas afectadas por el tratamiento con el AE de *L. origanoides* sobre *P. aeruginosa*, lo cual abre un campo importante para, a corto o mediano plazo, diseñar o formular nuevas estrategias terapéuticas a base de productos naturales para contrarrestar el desarrollo acelerado de resistencia microbiana por parte de microorganismos altamente patógenos y de gran interés clínico.

2. Objetivos

2.1 Objetivos generales

Determinar el efecto del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre las rutas metabólicas relacionadas con el crecimiento en estado planctónico de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *L. origanoides* frente a la bacteria *P. aeruginosa* mediante el estudio de la actividad antimicrobiana.
- Evaluar los perfiles metabólicos diferenciales de *P. aeruginosa* durante el tratamiento con el aceite esencial de *L. origanoides*
- Establecer las rutas metabólicas afectadas y el posible mecanismo de acción del aceite esencial de *L. origanoides* sobre la inhibición del crecimiento planctónico de *P. aeruginosa*.

3. Marco teórico

3.1 Antibióticos y resistencia de los microorganismos

La resistencia bacteriana a los antibióticos se define como la capacidad que tiene una bacteria para sobrevivir a concentraciones de antibiótico que inhiben o matan a otras bacterias

(Alós, 2015), estas pueden clasificarse como susceptibles o resistentes según la información cuantitativa determinada en términos de concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es la concentración mínima de agente antimicrobiano que en condiciones *in vitro* específicas impide completamente el crecimiento visible de un microorganismo (Kowalska & Dudek, 2021; Chen *et al.*, 2023)

La resistencia a los antimicrobianos es un importante problema global de salud pública que está en aumento desde el descubrimiento de los antibióticos a inicios del siglo XX, pero es muy probable que se usaran inadvertidamente desde mucho tiempo atrás. La penicilina marcó el inicio de la era de los antibióticos con su descubrimiento en 1928, aunque existen evidencias de que se usaban desde tiempos antiguos (Programa de Lugares Emblemáticos Internacionales de la Historia de la Química de la ACS, 1999). Los antibióticos son agentes químicos que previenen el crecimiento bacteriano, y pueden ser bacteriostáticos o bactericidas (Dugassa & Shukuri, 2017), su descubrimiento fue uno de los más importantes en la historia de la medicina, ya que son vitales para la prevención y tratamiento de infecciones, sin embargo, desde hace varios años ha surgido la habilidad en las bacterias para sobrevivir en ciertas concentraciones de antibióticos (Belloso, 2009).

El primer caso de resistencia antimicrobiana reportado fue en *Escherichia coli* en el año 1940 (Cabrera *et al.*, 2007), desde entonces, diferentes estrategias y modificaciones químicas se han realizado a los antibióticos para contrarrestar la resistencia de los microorganismos, siendo los últimos 50 años marcados por el desarrollo continuo de diferentes agentes antimicrobianos, y a su vez por el incremento de la resistencia en diferentes cepas bacterianas (Briones, 2006). Las principales causas responsables del desarrollo de resistencia y la propagación de patógenos son las prácticas médicas y agrícolas, su práctica errónea y uso indiscriminado ha causado que las

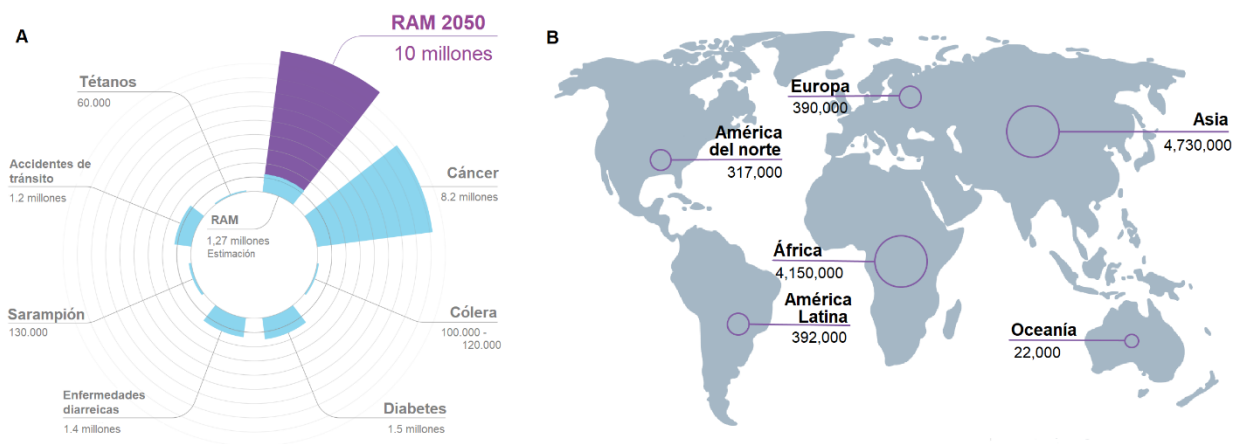
bacterias mediante diferentes mecanismos desarrollen estrategias que les permiten evadir los efectos de estos compuestos (Sultan *et al.*, 2018). Diferentes estudios han demostrado que existe una gran variedad de mecanismos de resistencia bioquímicos o fisiológicos que son responsables del desarrollo de resistencia hacia los fármacos (Dugassa & Shukuri, 2017), esta resistencia puede ser intrínseca del organismo, siendo dependiente de genes o propiedades de la célula, o adquirida, que se atribuye a mutaciones o intercambio de elementos genéticos de resistencia (plásmidos con genes de resistencia), permitiendo que adquieran características para mejorar su adaptabilidad (Hall & Mah, 2017).

La resistencia antimicrobiana sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del siglo XXI a pesar de los esfuerzos realizados para erradicar las enfermedades infecciosas (Lebeque *et al.*, 2006). El desarrollo de resistencia es un proceso natural que no puede detenerse, es cada vez más común en todo el mundo, ya que una vez introducido un antibiótico en el mercado es solo cuestión de tiempo para encontrar resistencia a este, y sus usos indiscriminados provocan que este proceso se acelere (Anooja & John, 2021; Cabrera *et al.*, 2007).

En 2019, Murray *et al.* (2022) realizaron un estudio sobre la carga mundial de resistencia a los antimicrobianos, en el cual determinaron un total de 4,95 millones de personas fallecidas en el 2019 por causa de enfermedades en las que participa la resistencia bacteriana, y 1,27 millones de muertes por causa directa a la resistencia, mientras que O'Neill (2016) mediante una revisión sobre la resistencia hacia los antimicrobianos estimó que para el 2050 las muertes causadas por resistencia lograrán ser 10 millones de muertes anuales, convirtiéndose en la mayor causa de muerte a nivel mundial, siendo Asia y África los lugares más afectados (Figura 1). También, se estimaron que una de cada cinco muertes relacionadas con la resistencia bacteriana corresponde a niños menores de cinco años, por lo cual esto ha generado una amenaza para la salud mundial,

donde los países en vía de desarrollo son los más afectados y los niños los más vulnerables (Murray *et al.*, 2022).

Figura 1. Muertes atribuidas a infecciones causadas por resistencia antibacteriana. A) Comparación de cifras anuales de diferentes causas de muertes. B) Muertes por resistencia antibacteriana estimadas a nivel mundial para el año 2050.



Nota. Adaptado de “Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Un problema de salud pública sin ESKAPE”, por Chávez, J. V., 2020, *Milenaria, Ciencia Y Arte*, (15), 6–8.

3.2 Descripción general de la bacteria *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno oportunista (los microorganismos oportunistas pueden causar enfermedades infecciosas graves en individuos) (Olmos *et al.*, 2015), es una bacteria aerobia con forma de bastoncillos, gram-negativa, invasora y toxígena, pertenece a la familia Pseudomonadaceae, que poseen un genoma relativamente grande y tiene una gran capacidad genética que le permite sobrevivir y crecer en una gran variedad de entornos y condiciones (Rashiya *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022). Es uno de los principales patógenos nosocomiales en el mundo que tiene la capacidad de adquirir diferentes mecanismos de resistencia promoviendo la sobrevivencia de la bacteria en una amplia gama de entornos naturales y hospitalarios, sus infecciones son difíciles de tratar por la resistencia que presenta a la mayoría de los antibióticos

usados en la actualidad (Burrows, 2018; Strateva & Yordanov, 2009), siendo un importante patógeno vegetal y humano que causa infecciones mediante un conjunto de factores de virulencia, los cuales le permite contrarrestar los mecanismo de defensa (Mahajan *et al.*, 1999).

La mortabilidad y morbilidad atribuible a *P. aeruginosa* es elevada en personas vulnerables, causando generalmente infecciones graves (Kerr & Snelling, 2009). En un informe publicado por la Red Nacional de Seguridad de la Atención Medica (NHSN) clasificaron a *P. aeruginosa* como el sexto patógeno más comúnmente asociado a las infecciones en los hospitales, sus infecciones más comunes son en heridas por quemaduras, en el torrente sanguíneo, en el tracto urinario, en el conducto auditivo, en la piel y en los tejidos blandos, además causa queratitis en pacientes con problemas oculares, pero las principales infecciones que causa es en el tracto respiratorio, comúnmente en personas con fibrosis quística, neumonía o bronquiectasias (Sathe *et al.*, 2023)

Las infecciones que causa *P. aeruginosa* son difíciles de tratar debido a su capacidad de resistencia a la acción de los agentes antimicrobianos, su resistencia intrínseca más su capacidad de desarrollar resistencia rápidamente han convertido su tratamiento en un desafío (Brakert *et al.*, 2023). Esto se debe a que la bacteria presenta una membrana externa poco permeable, múltiples sistemas de transporte y mecanismos de resistencia en los que están involucradas ciertas enzimas y mutaciones genéticas, como por ejemplo, bombas de eflujo sobreexpresadas, adquisición de un plásmido o gen de resistencia, proteínas de unión a penicilina y β -lactamasa cromosómica, entre otros (Madigan *et al.*, s. f.; Alshammari *et al.*, 2023). Los mecanismos que posee la bacteria son adquiridos cuando se encuentra en presencia de agentes antimicrobianos, lo que genera que realice mutaciones para sobrevivir que pueden dar lugar a la adquisición simultánea de varios mecanismos de resistencia que incitan al microorganismo a adquirir multiresistencia (Strateva & Yordanov,

2009). Por lo cual, *P. aeruginosa* es clasificada como un microorganismo multirresistente y extremadamente resistente, siendo sus infecciones difíciles de erradicar en comparación con otros patógenos (Lebreton *et al.*, 2021).

Además, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de formar *biofilm* (biopelículas), el cual es un modo de crecimiento en comunidades multicelulares encerradas en sustancias poliméricas extracelulares adheridas a una superficie (Verderosa *et al.*, 2019); esto le proporciona mejores condiciones para sobrevivir en diferentes nichos ambientales o en un huésped, ya que las biopelículas causan que aumente su patogenicidad e impiden la penetración de los antibióticos (Madigan *et al.*, s. f. & Kerr & Snelling, 2009). Actualmente, presenta resistencia a la mayoría de los antibióticos existentes incluidos los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas, los β -lactámicos, y los carbapenémicos, los cuales son antibióticos de último recurso (Breidenstein *et al.*, 2011).

3.3 Afectaciones causadas por *P. aeruginosa* en la salud mundial

En los últimos años las tasas de resistencia a los antibióticos que presentan las bacterias patógenas han aumentado drásticamente catalogándolas como una gran amenaza en el mundo, es muy común encontrar en los hospitales infecciones causadas por bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, que no pueden ser tratadas con antibióticos convencionales, esto se ha convertido en una gran preocupación en los hospitales debido a que es una de la principales causas de infecciones hospitalarias en especial en pacientes críticos e inmunocomprometidos (Bassetti *et al.*, 2018; Mehrad *et al.*, 2015). Este microorganismo es responsable del 57% de las infecciones nosocomiales (infecciones adquiridas en hospitales) (Rashiya *et al.*, 2021), su tasa de mortalidad nosocomial es del 5 – 54% (Golpayegani *et al.*, 2019), y en las unidades de cuidados intensivos (UCI) es el responsable del 13,2 - 22,6% de las infecciones encontradas (Driscoll *et al.*, 2007). En Estados Unidos es el principal patógeno encontrado entre 60 – 80% de los pacientes con fibrosis

quística, es la tercera causa más común entre infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres, y un estudio realizado con datos obtenidos por 35 años en este país estimó que *P. aeruginosa* es la causa de 1400 muertes por neumonía adquirida en el hospital, siendo la segunda causa más común asociada al ventilador (Sathe *et al.*, 2023; Golpayegani *et al.*, 2019).

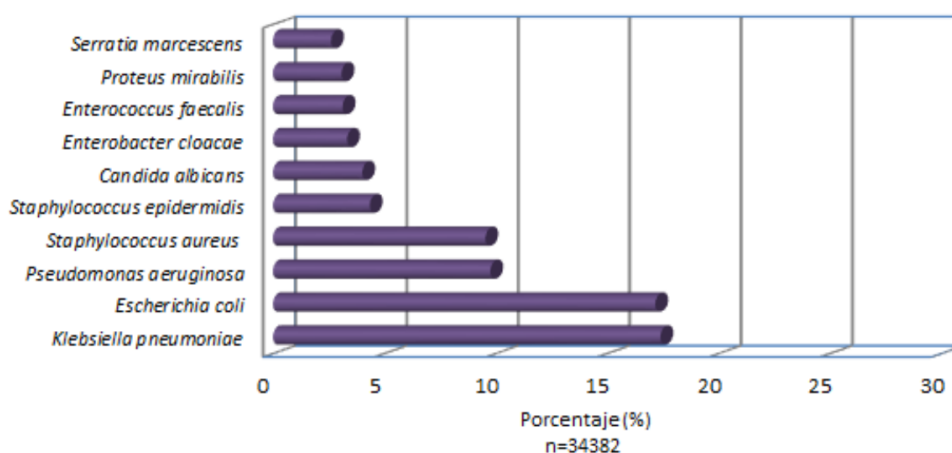
P. aeruginosa ha venido presentando resistencia a los carbapenémicos, los cuales son fármacos de último recurso antibiótico existentes para combatir las infecciones de bacterias gram-negativas (Anooja & John, 2021). En Estados Unidos el 60% de las infecciones resistentes a los carbapenémicos son causadas por este microorganismo, mientras que en Europa en el año 2015 el porcentaje de población de aislamientos invasivos resistentes a los carbapenémicos fue del 17,8% para *P. aeruginosa* (OMS, 2017a). Debido a lo anterior, la OMS clasificó a *P. aeruginosa* como un patógeno de prioridad crítica (Castanheira *et al.*, 2022), y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de E.E.U.U clasificaron al microorganismo como una amenaza para la salud pública que requiere atención y acción inmediata (Lebreton *et al.*, 2021).

P. aeruginosa posee una eficiente capacidad de desarrollo de resistencia que convierte a las infecciones causadas por esta especie en un problema clínico-epidemiológico de gran importancia (Gutiérrez *et al.*, 2019). Un estudio realizado en Estados Unidos analizó más de 28.000 infecciones adquiridas en 463 hospitales, del cual se determinó que *P. aeruginosa* es la séptima causa más frecuente de infecciones del torrente sanguíneo asociada con catéteres, y la segunda causa más común de neumonía asociada a ventiladores (Opperman *et al.*, 2022). Inclusive, se ha encontrado que es un patógeno coinfectante común en pacientes con COVID-19, de acuerdo con la investigación realizada por Noa Shafran (Shafran *et al.*, 2021) en 19 pacientes ingresados en una clínica demostró que es la coinfección más frecuente con un 25% de regularidad,

reconociendo a *P. aeruginosa* como el microorganismo gram-negativo más común en infecciones hospitalarias graves.

La resistencia a los antibióticos es una prioridad urgente en América Latina, un estudio realizado sobre la prevalencia de eventos adversos en hospitales de Latinoamérica determina que las infecciones nosocomiales son el evento más frecuente con un porcentaje de 37,14%, y en Colombia en el año 2013 la proporción de infecciones intrahospitalarias fue de 1,25 a nivel nacional, siendo Antioquia, Bogotá, Santander, Tolima y Valle del Cauca los departamentos con las tasas de infección más altas (Ministerio de Salud y Protección Social (MINSALUD), 2018). Un estudio realizado por la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá reveló que el 37,6% de las infecciones reportadas fue a causa de microorganismos resistentes y el 62,4% por microorganismos sensibles, donde *P. aeruginosa* representó el 55,9% de las infecciones causadas, siendo la segunda bacteria que más afectaciones provocó en los pacientes (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C., 2007).

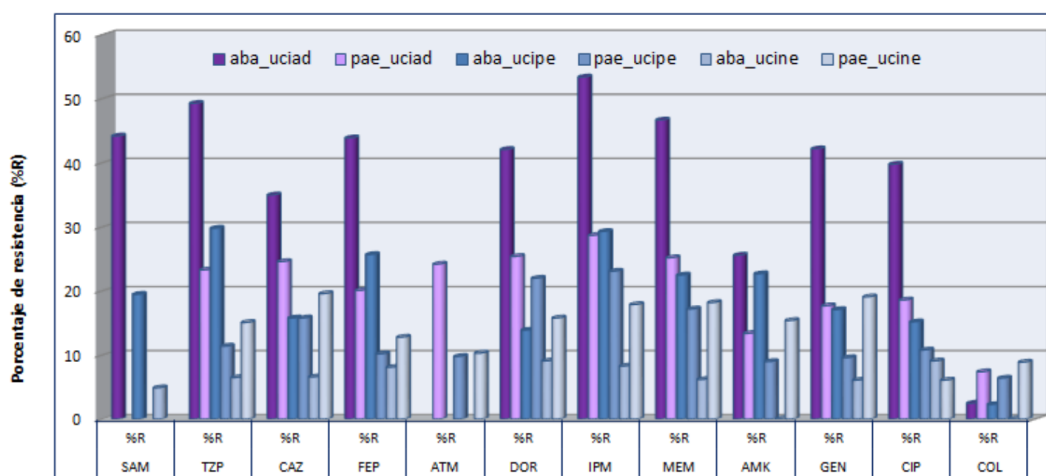
Figura 2. Frecuencia de microorganismos en UCI adulto.



Nota. Tomado del “Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en IAAS 2018”, por el Instituto Nacional de Salud, 2019.

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) representan uno de los mayores problemas para la seguridad de los pacientes que puede afectar su salud, la calidad de los servicios prestados y genera una carga económica significativa (MINSALUD), 2018). En un informe de vigilancia realizado por un laboratorio de resistencia antimicrobiana en Colombia sobre las IAAS en 2018 se estudiaron las afectaciones que causan diferentes bacterias en los hospitales de Colombia (Instituto Nacional de Salud (INS), 2019), donde se encontró que *P. aeruginosa* es el tercer microorganismo más frecuente en las UCI de adultos, (Figura 2), el cuarto en UCI pediátrica y en pacientes hospitalizados sin cuidados intensivos. Se determinó que esta bacteria ocupa el segundo lugar con mayores porcentajes de resistencia a los carbapenémicos, en el servicio de UCI adulto presentó un rango entre 25,2% - 28,7%, en hospitalización de adultos entre 19,5% - 23,3%, en UCI pediátrica entre 17,2% - 23,1% y en hospitalización pediátrica del 11,6% - 15,3% (Figura 3). Asimismo, reportaron las infecciones más comunes asociadas a dispositivos, estas fueron infección en el torrente sanguíneo asociadas al catéter, y neumonía asociada a ventilador.

Figura 3. Resistencia de microorganismos gram-negativos en UCI adulto y pediátrica, Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en IAAS.



Microorganismos: aba: *A. baumannii*, pae: *P. aeruginosa*. Antibióticos: SAM: ampicilina sulbactam, TZP: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, DOR:

doripenem, IPM: imipenem, MEM: meropenem, AMK: amikacina, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina y COL: colistina. Uciad: unidades de cuidados intensivos de adultos, ucipe: unidades de cuidados intensivos pediátricos, ucine: unidades de cuidados intensivos neonatales. Nota. Tomado de Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) 2018, por Instituto Nacional de Salud, 2019.

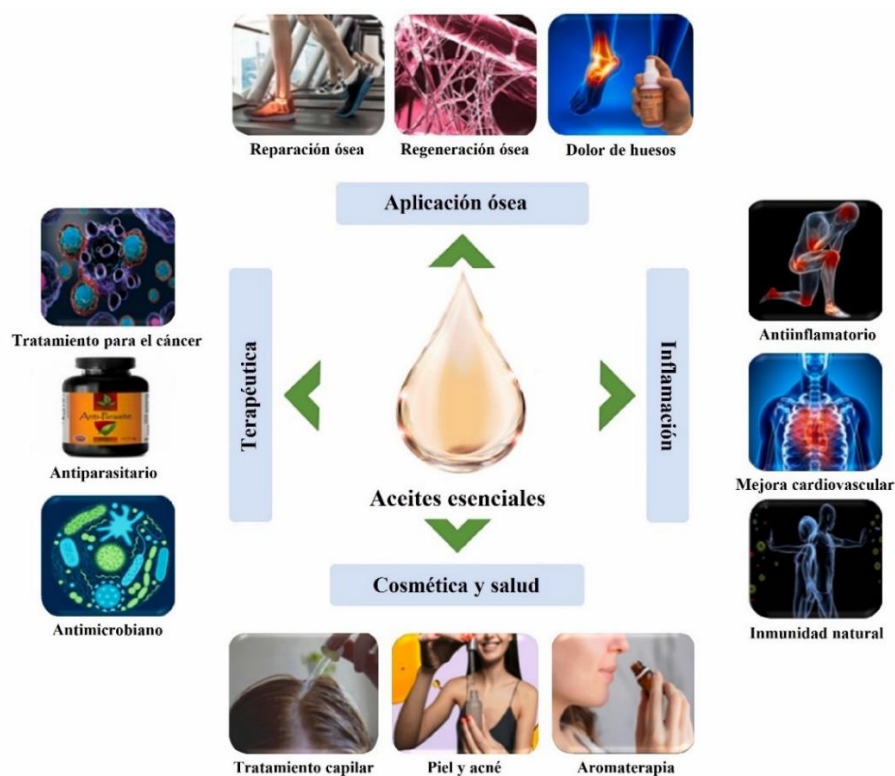
3.4 Aceites esenciales (AE)

Los productos naturales son una alternativa prometedora para el desarrollo de compuestos antimicrobianos y se han utilizado ampliamente durante milenios como alimentos, medicamentos, agentes conservantes, etc. (Castañeda *et al.*, 2007). Entre las diferentes estrategias para contrarrestar la resistencia emergente a los agentes antimicrobianos se encuentra en especial el uso de los AE obtenidos de diversas plantas aromáticas, los cuales son una alternativa terapéutica atractiva y potencial gracias a la amplia gama de actividad farmacológica reportada, por ejemplo, actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, insecticida, antiviral, anticancerígena, entre otras (Acero *et al.*, 2019). A lo largo de la historia los AE han sido utilizados en la medicina tradicional por su capacidad antimicrobiana, se han usado desde la antigüedad como agentes terapéuticos, en usos como bactericidas, virucidas, insecticidas y en la industria farmacéutica (Bakkali *et al.*, 2008). También han sido usados para otros propósitos como aditivos en bebidas y alimentos, para cosméticos y productos para el hogar, entre otros, y debido a las diversas características observadas en los AE, su uso se ha extendido y aumentado en diferentes industrias (Figura 4) (Wei & Shibamoto, 2007).

En el 2017 la OMS publicó una lista de "patógenos prioritarios" resistentes a los antibióticos disponibles en la actualidad, con el fin de impulsar la investigación y el desarrollo de tratamientos antibióticos nuevos y efectivos, aumentando la atención a la búsqueda de nuevas alternativas (Meschiari *et al.*, 2021). Se descubrió que los AE poseen propiedades antimicrobianas

que podrían reemplazar a los antibióticos convencionales, siendo destacados en los últimos años en diversos estudios como una prometedora alternativa contra la resistencia antimicrobiana que se presenta en diferentes bacterias patógenas que afecta humanos, plantas y animales (Hou *et al.*, 2022; Acero *et al.*, 2019). Debido a la variedad de características químicas y biológicas que poseen los AE tienen un amplio espectro de acción en diferentes microorganismos y múltiples efectos en ellos, como lo son la inhibición del crecimiento bacteriano y de los mecanismos de la comunicación celular (anti-quorum sensing), y la prevención de formación de *biofilm* (Guillín *et al.*, 2021).

Figura 4. Aplicaciones de los aceites esenciales.



Nota. Adaptado de Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: a review por Hou et al., 2022, *Bioscience*, 47. Elsevier.

Los AE son mezclas complejas de compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas, contienen entre 20 y 60 componentes distintos en concentraciones diferentes, entre

los cuales existen dos o tres que se encuentran en mayor proporción en comparación con los otros componentes (Bakkali *et al.*, 2008). Los AE son importantes en la naturaleza para la protección de las plantas, se encuentran almacenados principalmente en unas estructuras especializadas llamadas tricomas glandulares (Usano *et al.*, 2014), y su obtención según La Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés), es a partir principalmente de hojas, tallos y frutos de plantas aromáticas, mediante procesos de prensado o destilación, para lo cual existen diferentes métodos de obtención que pueden ser a nivel industrial o escala de laboratorio (Masyita *et al.*, 2022; Rojo & Barbas, 2015), por ejemplo, en procesos industriales la técnica más usada es la destilación por arrastre en corriente de vapor, y en el laboratorio es la hidrodestilación (Castellanos, 2020).

Una de las propiedades biológicas más significativas de los AE es su actividad antimicrobiana que se ha documentado frente a un amplio espectro de microorganismos patógenos, esta capacidad se debe a la presencia de compuesto como los terpenos, alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, entre otros (Ni *et al.*, 2021). Sus propiedades biológicas están determinadas por los componentes mayoritarios presentes, y a su vez sus mecanismos de acción dependen de su composición química y concentración de los compuestos bioactivos, por lo cual su actividad antimicrobiana es atribuible a las reacciones que ocurren en toda la célula (Álvarez *et al.*, 2021).

Hou *et al.* (2022) realizaron una revisión sobre los diferentes usos de los AE, donde reportan diferentes estudios realizados a variedad de aceites que causan inhibición en diferentes microorganismos, confirmando su actividad antibacteriana. Se han identificado diferentes mecanismos a través de los cuales los AE pueden inhibir el crecimiento bacteriano, como la descomposición de la pared celular, daño en la membrana, alteración en la biosíntesis de aminoácidos y en la producción de ATP, el cual es un nucleótido fundamental en la obtención de

energía celular; también tienen la capacidad de fracturar la membrana externa de bacterias Gram-negativas, induciendo la fuga de iones y del contenido citoplasmático, aumentando su permeabilidad y conduciendo a una muerte celular (Acero *et al.*, 2019). En resumen, los componentes de los AE pueden atravesar las membranas celulares generando modificaciones en la estructura, morfología, funciones y permeabilidad de los microorganismos.

En este estudio se utiliza el AE obtenido de *L. origanoides*, la cual es una planta utilizada para diferentes usos en el mundo, que ha demostrado tener propiedades medicinales como antiinflamatorias, antibacterianas, antimicrobiana, antifúngica, entre otras (Ribeiro *et al.*, 2021). El AE destilado de esta planta tiene diferentes aplicaciones debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro, como lo demuestra Hernandez (Hernandez *et al.*, 2017) donde estudiaron la toxicidad del AE determinando que es eficaz y seguro para conservar productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos.

Actualmente, el 80% de la población mundial utilizan los medicamentos tradicionales a base de plantas para abordar diversos problemas de la salud (Swamy *et al.*, 2016). Debido a la creciente resistencia a los antibióticos en el mundo, la investigación se ha centrado en el estudio de las actividades antimicrobianas de las plantas y sus extractos en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, por lo cual el desarrollo y uso de los AE ha experimentado un rápido crecimiento a nivel mundial, aumentando cada día las investigaciones realizadas para demostrar que son una alternativa favorable por sus características medicinales y propiedades naturales, siendo de gran interés para la comunidad médica y científica (Ni *et al.*, 2021, Horváth & Ács, 2015).

3.5 Metabolómica

A principios del siglo XX inició la era ómica, que se caracteriza por el estudio de las ciencias ómicas, entre las cuales se encuentra la proteómica, metabolómica, genómica y

transcriptómica, estas ciencias se basan en caracterizaciones bioquímicas y moleculares de una célula, tejido u organismo, aportando información sobre los procesos biológicos y el análisis de funcionalidad celular para posibles aplicaciones biotecnológicas (Burdisso *et al.*, 2016; Rojo & Barbas, 2015).

La metabolómica se encarga del estudio de los metabolitos, presentes en células tejidos, fluidos u organismos, que son el producto final o intermedio de los procesos celulares, y el conjunto de estos metabolitos se conoce como metaboloma, el cual origina la fisiología de un organismo (Méndez *et al.*, 2019). Aunque los primeros estudios realizados sobre metabolómica se publicaron a inicios de la década del 2000 (Barallobre *et al.*, 2013), desde 1970 se estaban realizando investigaciones sobre los metabolitos, pero fue hasta 1997 que se introdujo el término de metabolómica, que se considera fue por Oliver (1997) mediante un estudio realizado a los metabolitos en la levadura donde propuso este término (Sumner *et al.*, 2003). Desde los inicios de las investigaciones sobre metabolitos se han realizado múltiples adecuaciones a la aplicación logrando cada vez ser más precisa, como una versión mejorada de la bioquímica que nos proporciona una herramienta única para determinar las actividades bioquímicas por medio de la detección de sustratos y productos obtenidos durante el metabolismo celular (Yanes, s. f.).

Los metabolitos tienen una gran variedad de estructuras químicas, por lo cual tienen propiedades fisicoquímicas muy diferentes existiendo una extensa lista de metabolitos y catalogarlos es una tarea extenuante (Waris *et al.*, 2022). Debido a lo anterior, en una muestra es muy complejo medir todos los metabolitos presentes, sin embargo, se puede realizar un análisis que permita detectar los cambios en respuesta a estímulos como en el desarrollo de una enfermedad, la efectividad o resistencia ante un tratamiento, los beneficios de una dieta, etc. (Rojo & Barbas, 2015). Para el estudio de metabolómica, actualmente las técnicas analíticas más usadas

son resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas (MS), las cuales son técnicas de detección, pero de igual forma se usan las técnicas de separación como cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (GC), que se pueden acoplar a MS (Alarcon *et al.*, 2022). Mediante la combinación de estas técnicas es posible realizar un análisis que permita establecer patrones químicos, los cuales pueden revelar el estado metabólico de un individuo y facilitar el estudio de su metabolismo (Burdisso *et al.*, 2016).

El metaboloma tiene una gran complejidad química, por lo cual el estudio de la metabolómica ha sido complejo y ha tenido mayores limitaciones, es muy difícil realizar el estudio completo de todo el metaboloma simultáneamente, por las diferentes propiedades químicas que tienen los metabolitos entre sí, existiendo una gran diversidad química de estos, por lo cual explorar todo el metabolismo es una de las principales limitaciones en la metabolómica (Sumner *et al.*, 2003). Aunque la metabolómica fue una técnica poco utilizada en sus inicios, puesto que se centraron en el estudio principalmente de la proteómica y genómica, en la actualidad es ampliamente utilizada y ha ganado un amplio interés en diferentes áreas científicas para posibles futuras aplicaciones (Méndez *et al.*, 2019). Alarcon *et al.* (2022) realizó una revisión sobre la aplicación de esta técnica ómica en novedosos análisis metabólicos aplicados durante el desarrollo de fármacos. También, se encuentran diferentes investigaciones sobre el metabolismo de las plantas, Waris *et al.* (2022) y Shen *et al.* (2022) realizaron estudios sobre la diversidad metabolómica de las plantas, analizando la variedad de metabolitos obtenidos y las diferentes técnicas que se pueden usar, aunque todavía no se puede realizar un análisis completo del metaboloma, se espera una mejora continua en la aplicación de esta técnica, posiblemente convirtiéndose en un papel esencial en el descubrimiento de los mecanismos moleculares de los procesos biológicos.

Actualmente esta técnica se está utilizando para el estudio de las alteraciones en el metabolismo de microorganismos causadas por un AE, así fue realizado por Tang *et al.* (2021) quienes investigaron el mecanismo antibacteriano y la alteración del metaboloma causado por el AE de *Amomum villosum* en *Staphylococcus aureus*. Realizaron el análisis mediante metabolómica basada en GC/MS no dirigida, identificando 72 metabolitos y 10 vías metabólicas afectadas. Otro estudio aplicando análisis por GC/MS fue por Chen *et al.* (2022), utilizaron el aceite *Litsea cubeba* contra *Cutibacterium acnes*, en el cual concluyeron que el AE presenta actividad antimicrobiana y puede llegar a alterar significativamente la morfología de la bacteria inhibiendo su crecimiento, debido a la alteración de diferentes metabolitos presentes en vías metabólicas del microorganismo.

La metabolómica es una ciencia actualmente muy estudiada para conocer el metabolismo de diferentes organismos y tiene una gran variedad de aplicaciones en diferentes industrias. Sin duda alguna esta ciencia ómica está construyendo un gran camino en el área científica, tiene un futuro prometedor y es una gran herramienta para diferentes aplicaciones (Méndez *et al.*, 2019). Sin embargo, para poder seguir avanzando esta técnica debe estar en un continuo avance en las tecnologías analíticas y bioinformáticas utilizadas (Sumner *et al.*, 2003). Esta ciencia se encuentra aún en etapa de desarrollo y enfrenta problemas, como la finalización de registro de datos de metabolómica, el desarrollo de métodos de detección universales y la necesidad de mejorar la sensibilidad de detección (Shen *et al.*, 2022).

4. Antecedentes

En la actualidad existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas de antibióticos debido a la evolución continua de los agentes que provocan enfermedades infecciosas (bacterias, virus, hongos, etc.) los cuales logran eludir los fármacos diseñados para combatirlos (Wright, 2014).

Diferentes investigaciones han documentado la actividad antimicrobiana, antiviral, antifúngica e insecticida que presentan los AE, por lo cual son considerados como una alternativa viable para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Hou *et al.*, 2022).

En los últimos años los productos naturales más estudiados han sido los extractos vegetales y los AE, observándose un aumento en los últimos años de las investigaciones realizadas, como se puede evidenciar en la base de datos Scopus obteniendo entre el 2000 – 2023 con la palabra clave “esencial oils” un total de 95.452 investigaciones asociadas, por lo cual estos productos pueden llegar a liderar una nueva era en el descubrimiento de antibióticos (Wright, 2014). Álvarez *et al.* (2021) realizaron una revisión exhaustiva sobre los compuestos, extractos y AE de plantas aromáticas con actividad antibacteriana en el periodo 2016 al 2021, reportaron 17 AE diferentes con actividades antimicrobianas estudiadas frente a distintos microorganismos, siendo el aumento de la permeabilidad y la ruptura de la membrana plasmática, los principales mecanismos de acción por los cuales los AE ejercen su actividad antimicrobiana; y se atribuyó la actividad biológica al contenido de monoterpenos oxigenados no fenólicos e hidrocarburos sesquiterpénicos (Trujillo *et al.*, 2022).

Kim *et al.* (2021) realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana de 24 AE obtenidos de diferentes plantas contra la bacteria *Listeria monocytogenes*, presente comúnmente en los alimentos causando infecciones al ser consumidos, observaron la correcta inhibición del microorganismo con los aceites utilizados. Otro estudio sobre los AE fue realizado a destilados de plantas colombianas, en el cual estudiaron la capacidad antibacteriana de 15 AE frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en estado planctónico y en *biofilm*, demostrando que algunos de los AE utilizados tienen actividad antibacteriana y *antibiofilm* (Martínez *et al.*, 2021). Otro estudio realizado a aceites obtenidos de plantas medicinales fue en Brasil por Borges *et al.*

(2012), quienes estudiaron diferentes plantas entre las cuales se encuentra *Lippia origanoides* (*L. origanoides*), donde todos los AE utilizados demostraron tener un impacto inhibitorio sobre el crecimiento y la supervivencia de *Trypanosoma cruzi*, pero es importante destacar que el aceite *L. origanoides* fue de los más efectivos entre los que usaron. Otra investigación realizada al AE fue por Oliva *et al.* (2023) donde estudiaron diferentes derivados de *L. origanoides* en el *biofilm* de diferentes bacterias, encontrando que los diferentes AE tienen un efecto inhibitorio sobre las biopelículas microbianas de las bacterias estudiadas, confirmando su actividad antimicrobiana.

Se han determinado diferentes quimiotipos de los AE obtenidos de *L. origanoides*, los cuales han sido evidenciados. Vicuña *et al.* (2010) investigaron la composición química de los AE de *L. origanoides*, estudiaron dos especímenes del aceite encontrando una composición química principalmente de timol (60%) en una espécime, y en la otra una composición de timol (34%) y carvacrol (26%), concluyendo que estos son los principales compuestos del AE. Así mismo se ha estudiado la composición química de diferentes quimiotipos de los AE de *L. origanoides*, por diferentes investigadores como Santos *et al.* (2023) y Oliveira *et al.* (2007), entre otros, quienes encontraron los mismos compuestos presentes en los AE, pero en diferentes concentraciones. También, se ha comprobado la actividad antimicrobiana de los diferentes quimiotipos frente a múltiples microorganismos, Ruiz *et al.* (2023) estudiaron la actividad antifúngica y *antibiofilm* de AE colombianos contra diferentes cepas de *Candida*, donde exploraron la actividad inhibitoria de diferentes AE derivados de las plantas de *L. origanoides*, determinando que todos los aceites presentan efectos inhibitorios contras las cepas estudiadas. Asimismo, Cáceres *et al.* (2020) estudio la actividad antimicrobiana de este aceite frente a varios microorganismos patógenos concluyendo que este AE es un agente de control con posibles fines en la utilización para tratamientos terapéuticos.

Debido al aumento de patógenos resistentes a los productos farmacéuticos la sociedad científica y farmacéutica se ha interesado principalmente en las sustancias derivadas de las plantas (Ghaderi *et al.*, 2021). La OMS determinó que la atención de la salud de la población mundial depende de la medicina tradicional como plantas medicinales y aromáticas, ya que son una importante fuente de compuestos orgánicos naturales (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Por lo cual, en los últimos años han aumentado las investigaciones realizadas a las plantas medicinales, como por ejemplo las mencionadas anteriormente, siendo los AE productos altamente estudiados en la actualidad en diferentes sectores debido a las diversas características que presentan, teniendo una variedad de posibles aplicaciones (Araby & El-Tablawy, 2016). Se han registrado alrededor de 4000 AE de diferentes plantas estudiados, los cuales han tenido aplicaciones como agentes conservantes, en el campo de la industria alimentaria, antimicrobiana, biofarmacéutica, entre otras (Almanaa *et al.*, 2021).

P. aeruginosa es una bacteria ampliamente estudiada debido a la amenaza que representa para la salud mundial por su resistencia y supervivencia a diferentes antibióticos (Rather *et al.*, 2022), por lo cual se han propuesto diferentes estrategias para combatir y estudiar la multiresistencia que presenta (Laborda *et al.*, 2021), entre estas estrategias se encuentra el estudio de la actividad antimicrobiana mediante múltiples AE (*Tabla 1*), donde se ha encontrado una gran variedad de investigaciones que estudian la inhibición de la bacteria en estado planctónico o en *biofilm*, determinando la concentración mínima inhibitoria y en algunos casos el mecanismo de acción del AE.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales frente al microorganismo *P. aeruginosa*.

Aceite esencial	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/mL)	Referencias
<i>Rosemarinus officinalis</i>	5 – 25	(Araby & El-Tablawy, 2016)
<i>Eucalyptus globulus</i>	0,00625 – 0,1	(Pereira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pelargonium graveolens</i>	> 12,8	(Prabuseenivasan <i>et al.</i> , 2006)
<i>Ocimum basilicum</i>	5 – 20	(Pejčić <i>et al.</i> , 2020)
<i>Salvia officinalis</i>	5 – 20	(Pejčić <i>et al.</i> , 2020)
<i>Lippia berlandieri</i> Schauer	1,6	(Reyes <i>et al.</i> , 2020)
<i>Carum Carvi</i>	91	(Fekry <i>et al.</i> , 2022)
<i>Syzygium aromaticum</i>	3,26	(Costa <i>et al.</i> , 2022)
<i>Epilobium parviflorum</i>	0,01 – 0,04	(Marchese <i>et al.</i> , 2016)
<i>Cinnamomum verum</i>	0,5	(Wijesinghe <i>et al.</i> , 2021)

La metabolómica es una técnica emergente, en la que se ha observado en las últimas décadas un crecimiento exponencial de su utilización en diferentes campos, teniendo múltiples aplicaciones (Ding & Feng, 2023). En la actualidad se encuentran diversidad de estudios sobre la caracterización de las plantas y sus AE mediante metabolómica, por ejemplo, Cioni *et al.* (2022) realizaron un análisis químico de diversos AE destilados de diferentes variedades de la planta *Citrus australasica*, haciendo una comparación entre los aceites y caracterizándolos mediante estudios de sus metabolitos. También, está siendo muy utilizada para la detección de metabolitos en microorganismos patógenos, por ejemplo, Chen *et al.* (2020) llevaron a cabo el análisis metabolómico de *Staphylococcus aureus* para evaluar la actividad antimicrobiana del AE de

Cinnamomum camphora, donde encontraron 74 metabolitos diferenciales y concluyeron que fueron siete las rutas metabólicas afectadas, siendo el metabolismo de la alanina, del aspartato y del glutamato las que tuvieron mayor impacto. Asimismo, Oyedeji *et al.* (2021) realizaron una revisión exhaustiva sobre diferentes bacterias y hongos patógenos que han sido estudiados por medio de la metabolómica, concluyendo y demostrando que es una técnica precisa y eficaz para el estudio y análisis de las actividades de los microorganismos patógenos por medio del estudio de sus metabolitos.

También se han realizado estudios sobre el metabolismo de *P. aeruginosa* mediante metabolómica, Al-Saafin *et al.* (2023) realizaron una investigación sobre el efecto del probiótico *Lactobacillus plantarum* y fructooligosacáridos prebióticos sobre el metaboloma de *P. aeruginosa* mediante LC/MS, donde determinaron 50 metabolitos significativamente alterados con el uso del probiótico, y 24 metabolitos con el uso de los fructooligosacáridos, además observaron una disminución del *biofilm* y de los factores de virulencia de la bacteria. También, Leggett *et al.* (2022), estudiaron la diferencia entre el metabolismo en *biofilm* y en cultivos suspendidos en líquido sinovial bovino del microorganismo mediante resonancia magnética nuclear, encontrando que el metabolismo es afectado en las dos situaciones, pero se encontraron una mayor afectación en los cultivos suspendidos en comparación con el *biofilm*, pero se observaron metabolitos en común y las vías metabólicas afectadas fueron el metabolismo de la creatina, de la alanina, el glutatión y el ciclo del ácido cítrico.

Como se ha podido observar en la revisión bibliográfica los AE tienen un uso muy importante en las investigaciones de la actualidad por sus importantes características frente a los microorganismos, pero sus mecanismos de acción aún no son totalmente claros debido al poco estudio que se ha realizado. La metabolómica es una técnica que nos ofrece una alternativa de

estudio para poder determinar esos mecanismos, por lo cual es una ciencia ómica de gran importancia. Hasta el momento no se encontraron estudios publicados que utilicen la metabolómica para dilucidar los posibles mecanismos de acción del AE de *L. origanoides* frente a la bacteria patógena *P. aeruginosa* objeto de estudio de la presente investigación.

5. Metodología

5.1. Microorganismo y medios de cultivo

El microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fue obtenido del American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, EE. UU.).

Los medios de cultivo Luria Bertani (LB), Infusión Cerebro Corazón (BHI), peptona y agar bacteriológico fueron obtenidos de OXOID (Hampshire, UK). Dimetil sulfóxido (DMSO, grado microbiológico) fue utilizado como disolvente del AE y fue adquirido en Merck (Darmstadt, Alemania). Microplacas de 96 pozos de polipropileno de fondo plano con tapa fueron adquiridas por medio de la empresa Biologix (Kansas, EE. UU.). Todos los ensayos biológicos se realizaron empleando agua MilliQ de resistividad 18.2 Ω , obtenida del equipo Smart 2 Pure (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.).

5.2 Caracterización química del AE de *L. origanoides*

El AE utilizado fue caracterizado y suministrado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia), su destilación y caracterización se realizó de acuerdo con la metodología de Stashenko *et al.* (2010).

Brevemente, el AE fue obtenido mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas en un equipo tipo Clevenger, posteriormente fue secado con sulfato de sodio anhidro, se pesó y se almacenó a una temperatura de 4 °C. El análisis de la muestra fue realizado mediante

un equipo Agilent Technologies 6890N Series Network System (Palo Alto, California, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (AT, MSD 5975 Inert XL). Se utilizaron dos columnas capilares con las mismas dimensiones de 60 m de longitud, 0,255 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor, una columna polar DB-WAX con fase estacionaria de poli (etilenglicol), y otra apolar DB-5MS con fase estacionaria de 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano). El gas de arrastre utilizado fue el helio (99,995% gas AP, Linde, Bucaramanga, Colombia), su presión inicial fue de 113,5 kPa, la cual posteriormente se modificó automáticamente de acuerdo con la temperatura para mantener el flujo de la columna constante a 1mL/min. Las muestras se inyectaron con una temperatura de 250 °C con un sistema de inyección automático y en modo split. La temperatura del horno fue programada a 45 °C (5 min) hasta llegar a 150 °C (3 min) a 3 °C/min, después, hasta alcanzar 220 °C (5 min), a 4 °C/min (Stashenko *et al.*, 2010).

Los espectros de masas, las corrientes iónicas totales (TIC) y de iones extraídos (EIC) se obtuvieron mediante un analizador cuadrupolar, por medio de un barrido automático de radiofrecuencia (full scan) en el rango de masas de 40 – 350 m/z con tasa de adquisición de 5,5 espectros/s. La identificación de los componentes del AE se realizó por comparación de sus espectros de masas, los cuales fueron obtenidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), y por medio de sus índices de retención lineal (LRI) en las dos columnas (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.). La identificación de los compuestos se realizó utilizando criterios cromatográficos y de espectrometría de masas, por medio de los cuales los espectros obtenidos fueron comparados con diferentes bases de espectros disponibles (NIST, 2014 y Wiley, 2008) y con datos en la literatura científica. Los compuestos estándar utilizados para la identificación confirmatoria de los componentes del AE (p-cimeno, timol,

carvacrol, β -mirreno, óxido de cariofileno, entre otros) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

5.3 Determinación de la actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) causada por el AE de *L. origanoides* (quimiotipo timol) en la bacteria *P. aeruginosa*. Para determinar este efecto antimicrobiano causado por el AE se empleó el método de microdilución en caldo (CLSI, 2015), estandarizado en el laboratorio, y la determinación de los valores de CMI se realizaron utilizando placas de 96 pozos de polipropileno y fondo plano.

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite se preparó inicialmente un cultivo bacteriano en estado planctónico del microorganismo, el cual se incubó durante 24h. Posteriormente, a partir de este se realizó un preinóculo de la bacteria en caldo LB, colocándolo en reposo durante 12 h a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana adecuada que estuvo entre 10^5 y 10^6 UFC/mL. Se realizó la cinética de crecimiento del cultivo empleando microplacas añadiendo 100 μ L del inóculo bacteriano junto con 100 μ L de diluciones del AE disueltos en DMSO a concentraciones de 0,18 mg/mL, 0,37 mg/mL, 0,75 mg/mL, y 1,50 mg/mL; el porcentaje de DMSO utilizado en las concentraciones fue menor al 1% (v/v); en otros pozos se depositó 100 μ L del inóculo bacteriano junto con 100 μ L de agua peptonada para realizar los debidos controles. El microorganismo se dejó en incubación durante 8 horas a 37 °C y con una agitación de 200 rpm, realizando mediciones de absorbancia cada hora utilizando un espectrofotómetro tipo lector de microplaca ELISA (Biorad, Imarck, California, EE. UU.), monitoreado a una longitud de onda de 595 nm.

5.4 Extracción de metabolitos

La extracción de los metabolitos bacterianos se llevó a cabo por medio de la metodología reportada por Zhou *et al.* (2019) realizando algunas modificaciones. Se preparó un preinóculo de la bacteria como se describió en la sección 5.3, a partir de éste se prepararon nueve cultivos de la bacteria empleando tubos Eppendorf, añadiendo en cada uno 500 μ L del inóculo bacteriano junto con 500 μ L de dilución en DMSO del AE con concentración de 0,30 mg/mL; también se realizaron nueve controles respectivos añadiendo en cada tubo 500 μ L del inóculo bacteriano junto con 500 μ L de agua peptonada. Posteriormente, se colocaron los cultivos en reposo a 37 °C y 200 rpm, se realizó la extracción de los metabolitos de las células a la cuarta hora de la cinética de crecimiento microbiano, donde se encuentra la fase exponencial de crecimiento. Se retiraron los cultivos y se aisló el microorganismo de cada cultivo mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos. Seguidamente se extrajo el sobrenadante y se lavaron los cultivos adicionando 500 μ L de agua peptonada al 0,1% (v/v) a cada tubo para ser centrifugados nuevamente, luego se repitió una vez más el procedimiento anterior.

Después, se llevó a cabo la lisis química agregando el solvente de extracción que en este caso se usó 500 μ L metanol 75% (v/v) y 500 μ L acetonitrilo (grado HPLC), se realizó sonicación con un sonicador de punto mientras la muestra se encontraba en hielo en un homogeneizador ultrasónico, se utilizó una metodología de trabajo con pulsos de 10 s en ON y 45 s en OFF por triplicado. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo Eppendorf de fondo en U, cuidando de no ser arrastrados los desechos celulares precipitados, se evaporaron los solventes utilizando un equipo Savant Speed Vac SPD120 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC 28804, EE. UU.) y se almacenaron las muestras en un refrigerador a -80 °C para su posterior análisis por UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS.

Por último, el residuo fue reconstituido en 300µL de una solución en frío de metanol acuoso al 50% (v/v), que contenía los estándares internos Z-GlyTyr-OH (carbobenzoxiglicil-L-tirosina) y cafeína (98% pureza) a una concentración de 5 µM. Las muestras de control de calidad (QC por sus siglas en inglés, Quality Control) se prepararon agrupando 20 µL de cada extracto celular, con el objetivo de garantizar que las diferencias obtenidas entre las muestras de tratamiento y control ocurrieron por cambios biológicos y no debido a errores instrumentales (Sadiq et al., 2020; Witting, 2013).

5.5 Análisis químico de los extractos mediante UHPLC/HRMS

La identificación de metabolitos entre las muestras de control y tratamiento se llevó a cabo por medio de un análisis metabolómico no dirigido, en el cual los metabolitos extraídos fueron analizados mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con analizador Orbitrap (UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS) utilizando el equipo Orbitrap™ Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific Sunnyvale, CA, EE. UU.). Se empleó un UHPLC Dionex™ Ultimate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.), equipado con un inyector automático de muestras (WPS 300 TRS), una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un desgasificador (SRD-3400) y una columna Hypersil GOLD™ aQ (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.; 100 x 2,1 mm, 1,9 µm de tamaño de partícula) con una unidad termostataada para la columna (TCC 3000) que se mantuvo a 30 °C. El pH fue ajustado para llevar a cabo las corridas cromatográficas por separado para los modos de hola adquisición de iones positivos y negativos, con el fin de evitar fenómenos de ionización competitiva y supresión de iones. Se utilizó una fase móvil de ácido fórmico al 0,2 % en agua (A) y ácido fórmico al 0,2 % en acetonitrilo (B), aplicando una condición de gradiente de la siguiente forma: 100% de A se cambió linealmente a 100% de B en 8 min, se mantuvo constante durante 4 min, se regresó al

100% de A en 1 min y se mantuvo en equilibrio por 3 min. El caudal de fase móvil fue de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, y el volumen de inyección fue de 1 μL .

El UHPLC fue acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones tipo Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunny, CA, EE. UU.), equipado con una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), la cual fue operada en modo de iones positivos a 350 °C, temperatura del capilar a 320 °C y voltaje capilar de +3500 V. El analizador Orbitrap fue operado en modo de barrido completo (Full scan) con resolución de 70000. Los iones se enviaron para su fragmentación a la celda de disociación de colisiones activadas (HCD, High-Energy Collisional Dissociation), a diferentes energías de 10 y 20 eV, en modo de barrido escalonado (*Stepped-scan*). Para cada energía de colisión fue utilizada una resolución RFWHM de 35000, usando AGC de 3×10^6 y un tiempo de inyección en la cámara C-trap de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de 50-750 m/z y se utilizó una metodología similar para la adquisición de iones negativos.

5.6 Identificación de los metabolitos y asociación con las rutas metabólicas afectadas por el aceite esencial

Los datos sin procesar se obtuvieron en formato raw, se convirtieron en archivos de formato mzXML utilizando la herramienta MSconvert (software ProteoWizard 3.0x, consultado el 20 de marzo de 2023, <http://proteowizard.sourceforge.net/>) y se cargaron a la plataforma interactiva en línea XCMS, en la cual se realizaron correcciones del ruido de fondo, del tiempo de retención y de la alineación de los cromatogramas (Tautenhahn *et al.*, 2012). Se obtuvo una matriz de datos con las intensidades de las características detectadas, la cual se filtró de acuerdo con el coeficiente de variación (CV) de las muestras de control de calidad (QC), donde se eliminaron los datos con mayor dispersión en la media ($CV > 25\%$).

Luego, para determinar los cambios entre los perfiles metabólicos entre las células control y las tratadas con el AE, se analizó la matriz de datos mediante métodos estadísticos multivariados, los cuales fueron análisis por componentes principales (PCA) y análisis de mínimos cuadrados discriminantes (PLS-DA) por medio del software Metaboanalyst (versión 5.0, consultado el 15 de abril de 2023, <https://www.metaboanalyst.ca/>), estos son los análisis más utilizados en metabolómica que se realizan con el fin de discriminar grupos con diferencias entre sus perfiles metabólicos (Pang *et al.*, 2021; Saccenti & Timmerman, 2016). Las características (m/z) más significativas se identificaron mediante el score de la importancia de la variable en la proyección (VIP) del modelo PLS-DA generado, un valor de VIP mayor a 1,0 se considera importante para el modelo (Al-Saafin *et al.*, 2023), en este caso los resultados seleccionados fueron aquellos con un valor de VIP mayor a 1,5. Adicionalmente se realizaron análisis univariados, los cuales fueron gráfico de volcán el cual permite relacionar la significancia estadística (valor P) frente a la magnitud del cambio (FC) y un mapa de calor (heatmap) para determinar patrones o grupos (clúster).

Finalmente, las características (m/z) procesadas que fueron estadísticamente significativas se identificaron presuntivamente por medio de las bases de datos: CEU Mass Mediator (versión 3.0, consultado el 3 de mayo de 2023, <http://ceumass.eps.uspceu.es/>), PubChem (consultado el 3 de mayo de 2023, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), Human Metabolome Database (HMDB, consultado el 3 de mayo de 2023, <https://hmdb.ca/>), Mass Bank (consultado el 28 de mayo de 2023, <https://massbank.eu/MassBank/>) y CFM-ID (versión 3.0 y 4.0, consultado el 28 de mayo de 2023, <https://cfmid.wishartlab.com/>). Luego de realizar la identificación de los metabolitos, se llevó a cabo su correlación metabólica con las diferentes rutas metabólicas del microorganismo que posiblemente fueron afectadas por el AE, y se realizó la reconstrucción de las rutas afectadas

con ayuda del software MetaboAnalyst (versión 5.0, consultado el 15 de julio de 2023, <https://www.metaboanalyst.ca/>) y Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, consultado el 15 de julio de 2023). Todas las bases de datos utilizadas en este estudio son de acceso libre.

5.7 Análisis estadístico

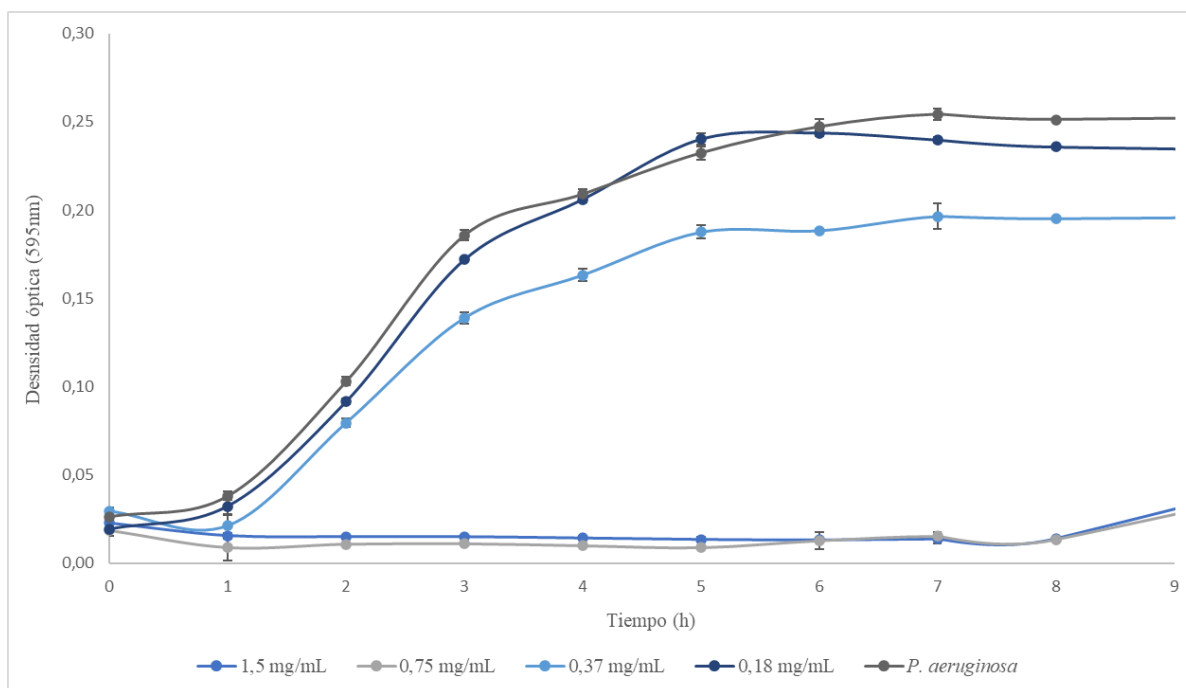
Todos los experimentos se realizaron con un mínimo de tres réplicas biológicas, cuyos datos fueron expresados con la media \pm desviación estándar. Para el análisis metabolómico se utilizaron nueve réplicas biológicas. La significancia estadística fue establecida en $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana

Para determinar los efectos del AE de *L. origanoides* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* se estudió la actividad antimicrobiana mediante una curva de crecimiento, los resultados obtenidos se encuentran registrados en la Figura 5, en la cual se determinó el efecto de los tratamientos (con AE) sobre el crecimiento del microorganismo (comparado con el control). A partir de los resultados obtenidos, se determinó CMI₃₀ del AE la cual fue de 0,37 mg/mL y la CMI₉₉ fue de 0,75 mg/mL.

Figura 5. Curva de crecimiento de la bacteria *P. aeruginosa* con y sin tratamiento con el AE De *L. origanoides*.



6.2 Análisis metabólico del efecto antimicrobiano del AE de *L. origanoides* sobre células planctónicas de *P. aeruginosa*

El análisis metabólico del microorganismo se realizó mediante metabolómica no dirigida utilizando UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS operada en modos de adquisición de iones positivo y negativo (sección 5.5). Los cambios significativos en el metaboloma celular del microorganismo se determinaron por medio de diferentes análisis univariados y multivariados (Sección 5.6) de los resultados obtenidos. La matriz de datos obtenida, luego de procesar los datos mediante la plataforma en línea XCMS, contenía 2921 características (o *features*, *m/z*, que corresponden a la detección y extracción de variables metabólicas) para modo de adquisición de iones positivo y, 2934 características para el modo de adquisición de iones negativo;

posteriormente se realizó un filtrado de los datos obtenidos mediante el coeficiente de variación reduciendo la matriz de datos a 1293 y 1034 características, respectivamente.

Los gráficos de análisis de componentes principales (PCA) (Figura 6A y 6B) no mostraron una separación definida entre los grupos de muestras control (sin tratamiento con AE) y el grupo tratamiento (con AE de *L. origanoides*), pero los valores de los componentes principales PC1 y PC2 representan la diferenciación que se encuentra entre las características significativas procesadas (Al-Saafin *et al.*, 2023). Además, se observó una buena agrupación de las muestras de control de calidad (QC) lo que demuestra un buen rendimiento del método analítico utilizado debido a la precisión y exactitud de los resultados. Para respaldar los resultados obtenidos del PCA y estudiarlos con más detalle, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) (Figura 6C y 6D), el cual es un análisis supervisado del análisis de componentes principales para determinar los valores de proyección VIP significativos, en el que se maximiza la covarianza entre los datos para reducir su dimensionalidad permitiendo obtener una mejor separación entre las muestras para confirmar su diferencia (Worley *et al.*, 2013). En los resultados obtenidos se observó una separación entre el grupo de muestras control *versus* el grupo tratado con el AE, permitiendo extraer información química asociada con los cambios significativos a nivel metabólico causado por el AE sobre *P. aeruginosa*.

Adicional a lo anterior, se realizó un gráfico de volcán con todas las señales obtenidas usando un umbral de veces de cambio mayor a dos ($FC > 2$), este permite relacionar la significancia estadística (valor P) con la magnitud de las veces de cambio (FC) (Peña *et al.*, 2020). Los gráficos obtenidos (Figura 7) mediante la comparación de tratamiento frente al control, revelaron que para el modo de adquisición de iones positivos se obtuvieron 32 características (m/z) moduladas positivamente y 20 modulados negativamente, mientras que para el modo de adquisición de iones

negativos se encontraron 31 características (m/z) modulados positivamente y 27 modulados negativamente.

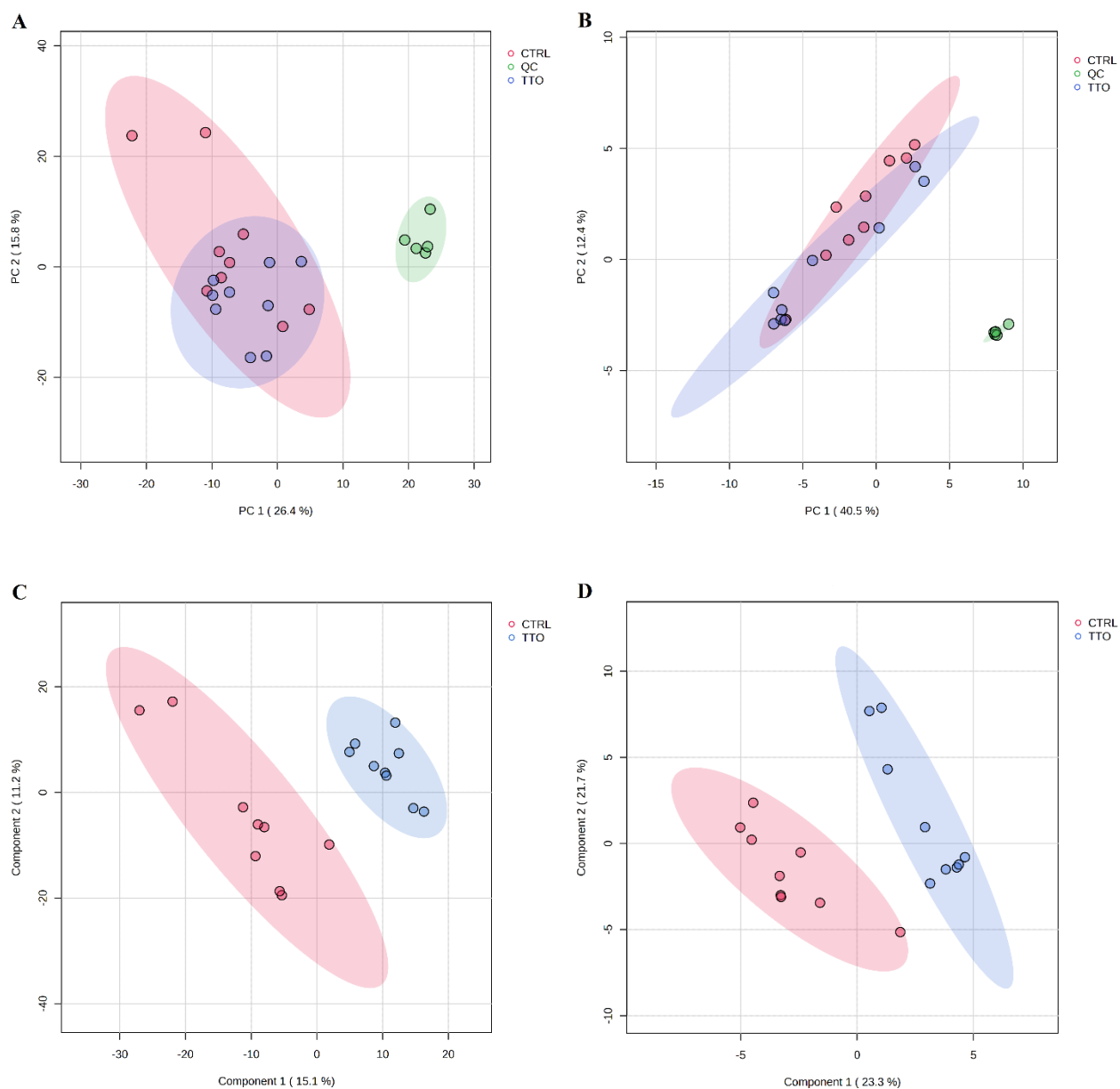


Figura 6. Gráficos de PCA y PLS-DA del conjunto de los datos obtenidos por LC/MS en *P. aeruginosa* con y sin tratamiento con el AE de *L. origanoides*. A, B) PCA de los datos obtenidos en modos de adquisición de iones positivos y negativos, respectivamente. C, D) PLS-DA de los

datos obtenidos en modo de adquisición de iones positivos y negativos, respectivamente. Control de calidad (QC; color verde), control (CTRL; color rojo) y tratamiento con AE (TTO; color azul).

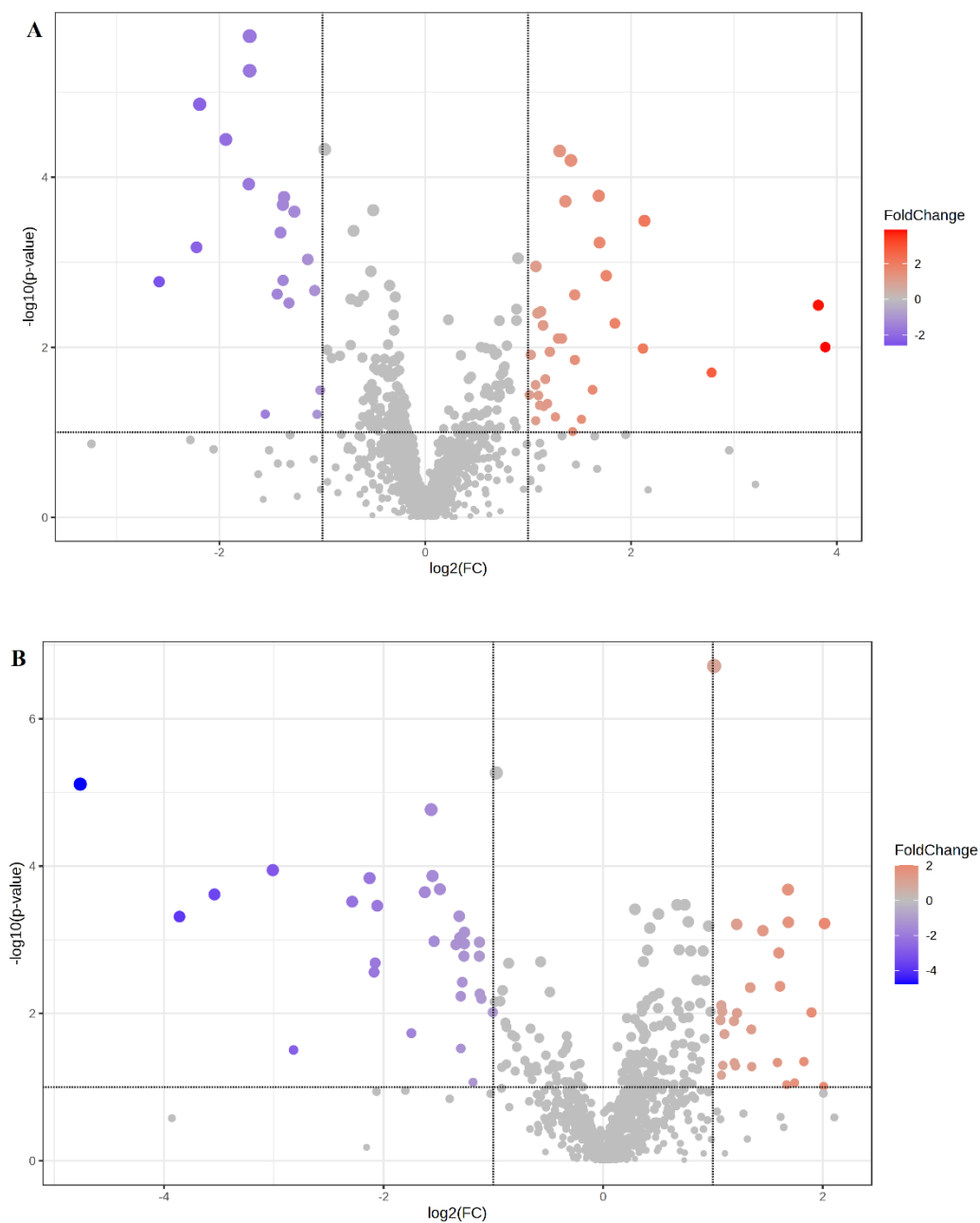


Figura 7. Gráfico de volcán de datos obtenidos mediante LC/MS. (A) Modo de adquisición de iones positivos. (B) Modo de adquisición de iones negativos. Color azul indica las

características (variables metabólicas) reguladas negativamente y color rojo características reguladas positivamente en comparación del tratamiento (con AE) frente a control.

El análisis del score de las variables de importancia en la proyección (VIP), permitieron identificar 160 características significativas (60 iones en modo de adquisición de iones positivos y 100 en modo de adquisición de iones negativos), con un valor umbral de VIP establecido $> 1,5$, las cuales están asociadas con las diferencias estadísticamente significativas a nivel metabólico, entre el grupo control y tratamiento, cuyas variables diferenciales corresponden a la covarianza explicada en el análisis de PLS-DA. Del total de características (features) significativas, se identificaron un total de 31 metabolitos (identificación tentativa, nivel 2 con base en la iniciativa de estándares en metabolómica (Guillín *et al.*, 2023)), de los cuales 21 iones corresponden al modo de adquisición de iones positivos (Tabla 2) y 10 iones al modo de adquisición de iones negativos (Tabla 3). La presuntiva identificación de los metabolitos se realizó mediante la comparación de espectros de masas y sus iones de fragmentación obtenidos (Anexos A - G), con los reportados en la literatura y en las bases de datos de espectrometría de masas utilizadas (Mass Bank, CFM-ID, HMDB, PubChem).

Tabla 2. Metabolitos identificados (tentativamente) como estadísticamente significativos entre el grupo control y grupo de tratamiento con el AE de *L. origanoides* sobre células planctónicas de *P. aeruginosa* en modo de adquisición de iones positivos.

Metabolito identificado	Fórmula molecular	Molécula con aducto	m/z	Δ ppm	t_R (min)	M
Adenina	C ₅ H ₅ N ₅	(M+H) ⁺	136,0618	3,93	2,70	↓
Dihidrotimina	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	(M+Na) ⁺	151,0477	3,82	0,88	↑
Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	(M+Na) ⁺	187,0366	2,37	1,40	↓
(L/D)-Aspartato	C ₄ H ₇ NO ₄	(2M+H) ⁺	267,0809	6,95	2,11	↑

1,3-Dimetilurea	$C_3H_8N_2O$	$(2M+H)^+$	177,1345	3,76	1,01	↓
N-Carbamoilsarcosin	$C_4H_8N_2O_3$	$(M+H)^+$	133,0608	4,00	4,01	↑
Inosina	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	$(M+NH_4-H_2O)^+$	268,1037	0,18	2,71	↓
Pterin	$C_6H_5N_5O$	$(M+H)^+$	164,0566	3,96	2,26	↓
L-4-hidroxi glutamato semialdehído	$C_5H_9NO_4$	$(M+H)^+$	148,0604	4,04	0,88	↓
S-(3-oxo-3-carboxi-n-propil)cisteína	$C_7H_{11}NO_5S$	$(3M+H)^+$	664,1155	0,42	2,23	↓
Valil-seril-arginina	$C_{14}H_{28}N_6O_5$	$(M+H)^+$	361,2189	2,93	0,98	↑
Ácido pirrolidonacarboxílico	$C_5H_7NO_3$	$(M+H)^+$	130,0499	4,09	0,89	↓
Glutamato	$C_5H_9NO_4$	$(M+Na)^+$	170,0422	3,87	0,92	↓
Heptano-1,2,3-triol	$C_7H_{16}O_3$	$(M+Na)^+$	171,0995	0,84	0,62	↑
Homoserina	$C_4H_9NO_3$	$(M+2Na-H)^+$	164,0293	3,07	0,94	↑
Xantina	$C_5H_4N_4O_2$	$(M+NH_4-H_2O)^+$	152,0567	2,59	2,60	↑
Hidroxiectoína	$C_6H_{10}N_2O_3$	$(3M+Na)^+$	497,1967	0,86	2,23	↓
Alanilvalina	$C_8H_{16}N_2O_3$	$(M+2Na-H)^+$	233,0871	2,37	0,99	↑
4-O-(beta-L-Arabinofuranosil)-(2S,4S)-4-hidroxiprolina	$C_{10}H_{17}NO_7$	$(M+H)^+$	264,1075	3,19	1,13	↑
L-Prolinamida	$C_5H_{10}N_2O$	$(M+Na)^+$	137,0685	3,74	0,96	↑
Ácido glicerofosfórico	$C_3H_9O_6P$	$(M+Na)^+$	195,0029	2,94	0,83	↑

M: modulación metabólica ↑ positiva, ↓ negativa

Modulación metabólica positiva corresponde a aquellos metabolitos que se encontraron en mayor concentración en las muestras de tratamiento con el AE en comparación con las de control (sin tratamiento), mientras la modulación metabólica negativa corresponde a los metabolitos encontrados con mayor concentración en las muestras control.

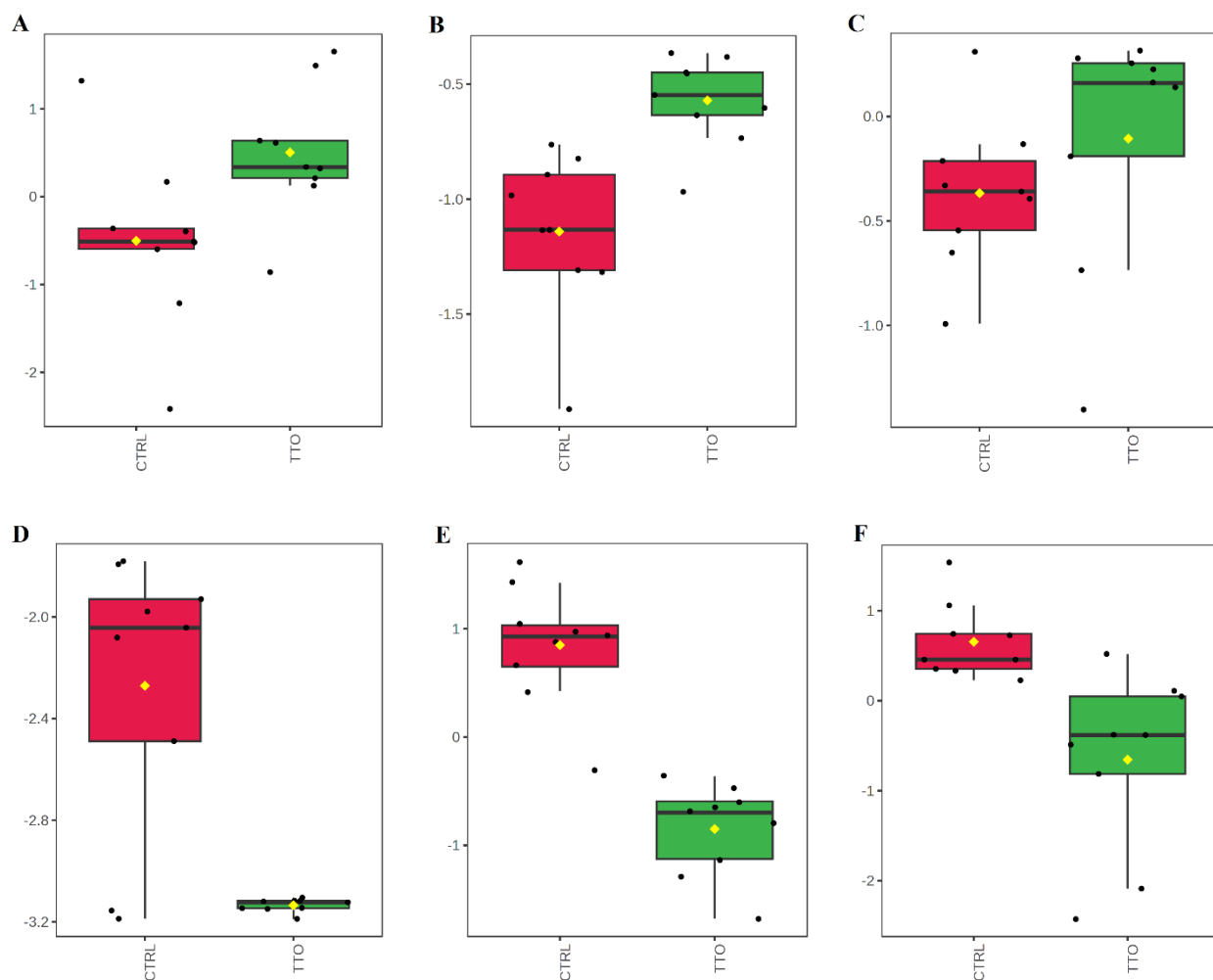
Tabla 3. Metabolitos identificados (tentativamente) como estadísticamente significativos entre el grupo control y grupo de tratamiento con el AE de *L. origanoides* sobre células planctónicas de *P. aeruginosa* en modo de adquisición de iones negativos.

Metabolito identificado	Fórmula molecular	Molécula con aducto	<i>m/z</i>	Δ ppm	<i>t_R</i>	M
CDP-Glicerol	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₁₃ P ₂	(M-H) ⁻	476,0467	0,85	0,86	↓
Hidroxitreonina	C ₄ H ₉ NO ₄	(M-H) ⁻	134,0461	5,64	2,68	↓
Citrato	C ₆ H ₈ O ₇	(M+Na-2H) ⁻	213,0007	1,78	1,20	↑
Coenzima F420-0	C ₁₉ H ₂₂ N ₃ O ₁₂ P	(M+Na-2H) ⁻	536,0676	0,80	0,96	↓
Asparaginil-cisteinil-cisteína	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₅ S ₂	(M-H-H ₂ O) ⁻	319,0522	9,89	2,13	↑
(S)-malil alfa-D-glucosaminida	C ₁₀ H ₁₇ NO ₉	(M-H) ⁻	294,0825	0,03	0,92	↓
L-arabinitol 5-fosfato	C ₅ H ₁₃ O ₈ P	(M-H) ⁻	231,0271	1,45	0,81	↓
ADP-ribosa	C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₄ P ₂	(M-H-H ₂ O) ⁻	540,0529	7,67	2,25	↓
Ácido 4-hidroxi-L-glutámico	C ₅ H ₉ NO ₅	(M-H) ⁻	162,0410	4,74	2,24	↓
Asparaginil-lisina	C ₁₀ H ₂₀ N ₄ O ₄	(M-H) ⁻	259,1405	0,44	0,86	↑

M: modulación metabólica ↑ positiva, ↓ negativa.

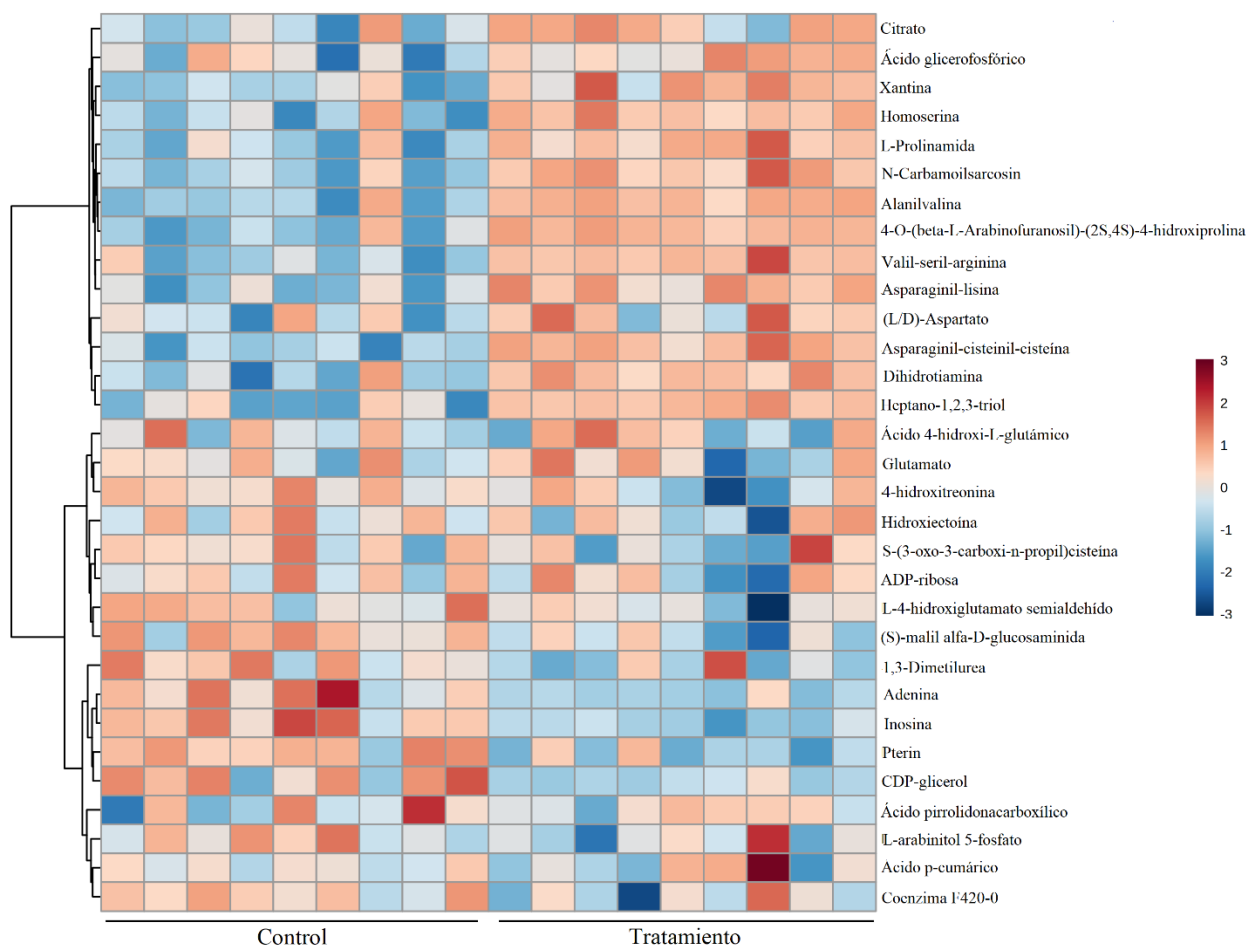
Entre los metabolitos identificados se encontraron un total de 14 modulados positivamente y 20 modulados negativamente. En los gráficos de cajas y bigotes (Figura 8), se muestran la relación en abundancia de algunos metabolitos identificados como diferenciales, entre los que se encuentran dihidrotimina, asparaginil-cisteinil-cisteína y citrato modulados positivamente (Figura 8A, 8B y 8C, respectivamente), mientras CDP-glicerol, adenina y glutamato fueron modulados negativamente (Figura 8D, 8E y 8F, respectivamente).

Figura 8. Gráficas de cajas y bigotes de algunos de los metabolitos identificados presuntamente. A, B, C) Adenina, (L/D)-Aspartato y citrato identificados con modulación positiva, respectivamente. D, E, F) (R/S)-Carnitinamida, dihidrotimina y CDP-glicerol identificados con modulación negativa, respectivamente.



Adicionalmente, con los metabolitos diferenciales identificados como los más representativos, se realizó un mapa de calor, el cual permite visualizar las cantidades relativas de los metabolitos diferenciales entre control y tratamiento de las células bacterianas (Figura 9) (Leggett *et al.*, 2022).

Figura 9. Mapa de calor de los metabolitos más representativos que estuvieron afectados significativamente en *P. aeruginosa* después del tratamiento con el AE de *L. origanoides*.



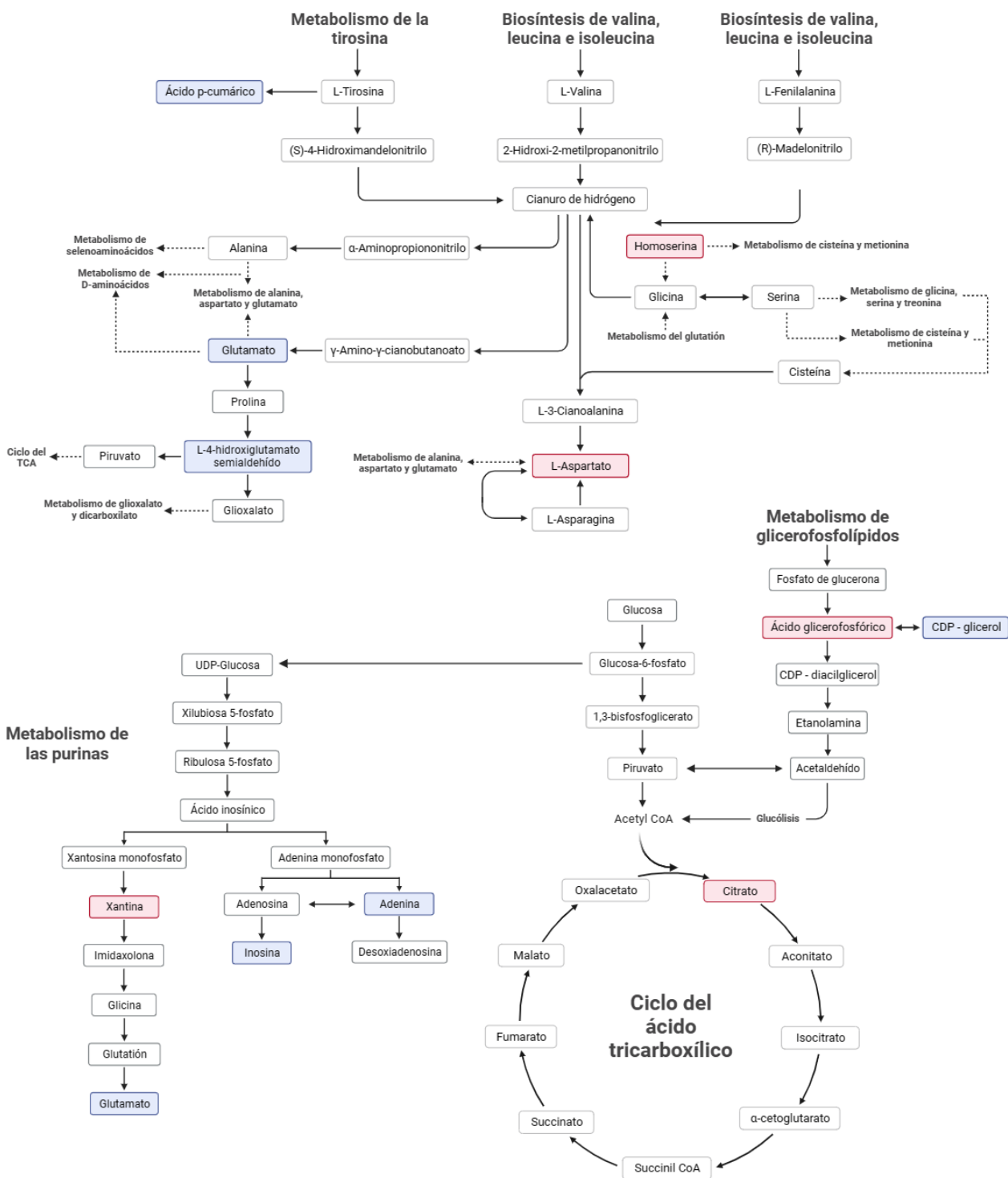
Finalmente, con el fin de comprender las diferentes alteraciones en las rutas metabólicas del microorganismo, se llevo a cabo un análisis de enriquecimiento de rutas mediante la base de datos KEGG, mediante la cual se identificaron las principales rutas afectadas entre las que se encuentran el metabolismo y síntesis de aminoácidos, metabolismo central del carbono, metabolismo de las purinas, metabolismo de nucleótidos, entre otras (Tabla 4). Además, se encontro la alteración de péptidos como el Leu-Val-Asn y el Ciclo (L-pro-L-tyr). También, se

realizó un mapa metabólico que representa un resumen general de algunas de las rutas metabólicas identificadas (Figura 10), las cuales son las rutas alteradas por una mayor cantidad de metabolitos.

Tabla 4. Clasificación de los metabolitos identificados tentativamente en las rutas metabólicas de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de las vías en KEGG.

Rutas metabólicas	Hits	Metabolitos alterados
Metabolismo de ciaminoácidos	2	(L/D)-Aspartato – Glutamato
Biosíntesis de aminoácidos	4	(L/D)-Aspartato – Homoserina – Citrato – Glutamato
Biosíntesis de aminoacil - ARNt	2	(L/D)-Aspartato – Glutamato
Metabolismo de D-aminoácidos	1	(L/D)-Aspartato
Metabolismo de purinas	4	Adenina – Inosina – Xantina – Glutamato
Biosíntesis de arginina	1	Glutamato
Metabolismo de la tirosina	1	Ácido p-cumárico
Metabolismo de la arginina y la prolina	2	L-4-hidroxi glutamato semialdehído – Glutamato
Metabolismo del carbono	3	Glutamato – Citrato – (L/D)-Aspartato
Metabolismo de glicina, serina y treonina	3	Hidroxiectoína – (L/D)-Aspartato – Homoserina
Metabolismo de nucleótidos	4	Adenina – Dihidrotimina – Inosina – Xantina
Metabolismo de los glicerofosfolípidos	2	CDP-glicerol – Ácido glicerofosfórico
Metabolismo de la taurina y hipotaurina	1	Glutamato
Metabolismo de las pirimidinas	1	Dihidrotimina
Metabolismo de la alanina, el aspartato y el glutamato	1	Glutamato

Figura 10. Ruta general de los metabolitos afectados por el AE de *L. origanoides* sobre las células de *P. aeruginosa*. Recuadros rojos: metabolitos modulados positivamente, recuadros azules: metabolitos modulados negativamente.



7. Discusión

En el presente estudio, además de determinar la actividad antimicrobiana del AE de *L. origanoides* frente a *P. aeruginosa*, también se investigó las vías metabólicas alteradas en el microorganismo con el tratamiento del AE mediante metabolómica no dirigida. Los resultados obtenidos indicaron que el AE utilizado presentó efecto antimicrobiano sobre el microorganismo, demostrando que el microorganismo es susceptible al aceite por la afectación de su crecimiento y de rutas metabólicas indispensables para su sobrevivencia.

Diferentes investigaciones afirman que la acción antimicrobiana de los AE es debido a la presencia de diferentes componentes químicos, como fenilpropanoides, terpenoides, alcaloides y policétidos, que afectan la viabilidad del microorganismo (Araby & El-Tablawy, 2016). Asimismo, depende de la composición química del aceite, ya que es común encontrar variaciones en su composición, lo cual depende de factores genéticos, del clima y las condiciones del suelo donde se encuentre la planta, método de destilación, etapa fenológica de la planta, entre otras (Reyes *et al.*, 2020; Viuda *et al.*, 2011). Adicional, se han reportado diferentes quimiotipos para ciertos AE, cada uno con diferentes propiedades antimicrobianas determinadas por los grupos funcionales presentes, sus interacciones sinérgicas y su composición química (Chouhan *et al.*, 2017).

La caracterización química del AE de *L. origanoides* empleado y reportado por el CENIVAM contiene timol 71,7%, *p*-cimeno 10,5%, carvacrol 4,4%, β -mirceno 2,1%, γ -terpineno 2,0%, óxido de cariofileno 1,6%, éter metílico de timol 0,9%, *trans*- β -cariofileno 0,9%, epóxido de humuleno II 0,7% y terpinen-4-ol 0,7%. Lo anterior permite catalogar al AE utilizado como quimiotipo timol de *L. origanoides*, el cual hizo parte de la investigación realizada por Cáceres *et al.* (2023).

El timol, *p*-cimeno y carvacrol han sido reportados en la literatura por exhibir actividad antimicrobiana y actividad *antibiofilm*, los cuales se encuentran en diferentes investigaciones realizadas (Helander *et al.*, 1998; Marchese *et al.*, 2016; Marchese *et al.*, 2017). Por ejemplo, Kachur y Suntres (2019) realizaron una revisión sobre las propiedades antimicrobianas del carvacrol y el timol, donde los reportan como compuestos mayoritarios bioactivos de diferentes AE, atribuyendo su actividad antibacteriana a estos compuestos, con propiedades como daños en la membrana, inhibición de motilidad y de las bombas de eflujo, entre otras; además inhiben el crecimiento bacteriano y aumentan la permeabilidad de la membrana celular, por lo cual estos compuestos se han catalogado con capacidades de penetrar la membrana de bacterias Gram-negativas.

Los AE tienen una variedad de moléculas presentes, por lo cual su actividad antimicrobiana no se puede atribuir a un solo compuesto, además presenta múltiples mecanismos de acción que afectan a diferentes partes de la célula, siendo entre otras, efectos causados sobre la composición de los ácidos grasos de la membrana celular, sobre las proteínas, biosíntesis de ATP y ATPasas, modificaciones del metaboloma y morfología celular, y actividad anti-quórum sensing (Nazzaro *et al.*, 2013), algunos de estos efectos fueron observados en el metabolismo de *P. aeruginosa*. Una investigación realizada por Cáceres *et al.* (2023) con el AE de *L. origanoides* quimiotipo timol, confirmó las propiedades antimicrobianas del aceite, ya que inhibió el crecimiento microbiano de *Chromobacterium violaceum*, y a su vez afectó el metabolismo de la bacteria, inhibiendo los mecanismos de quorum sensing y la formación de *biofilm*.

Algunas investigaciones han determinado que la acción antimicrobiana del AE se debe principalmente a la penetración de la membrana celular, lo cual logra mediante la interacción con la membrana debido a que está compuesta por fosfolípidos que interaccionan con los AE cuando

entran en contacto por sus compuestos con propiedades hidrofóbicas, conduciendo a una mayor permeabilidad (Mutlu *et al.*, 2020). La permeabilidad de la membrana es indispensable para múltiples funciones celulares, incluida la regulación metabólica y el mantenimiento del estado energético de la célula (Nazzaro *et al.*, 2013), además, causando la ruptura de la membrana se genera una fuga del contenido celular y un deterioro en las vías metabólicas y sistemas enzimáticos, lo cual conduce a una lisis o muerte celular, logrando prevenir o interrumpir la formación de *biofilm* (Fekry *et al.*, 2022; Bouyahya *et al.*, 2019). La integridad de la membrana celular es esencial para la supervivencia y las actividades biológicas que ocurren dentro de la célula, la exportación e importación de metabolitos y iones esenciales para las actividades de la célula ocurren a través de su membrana, por lo cual representa una barrera importante entre el citoplasma y el ambiente externo (Mrozik *et al.*, 2004).

Múltiples estudios han demostrado que los AE no solo causan daños en la membrana y a la integridad de la célula, sino también generan una alteración metabólica que puede conducir a una muerte celular (Guillín *et al.*, 2023). La detección de metabolitos bacterianos se puede emplear como un indicador que refleja la inhibición o activación de las rutas metabólicas. En este contexto, la metabolómica microbiana ha ofrecido una nueva alternativa de estudio para comprender los mecanismos de acción que presentan los compuestos naturales utilizados en la medicina natural, pero hasta el momento son pocas las investigaciones reportadas en este enfoque (Chen *et al.*, 2020; Miao *et al.*, 2020). Como se muestra en las tablas 2 y 3, en el presente estudio se detectaron e identificaron 31 metabolitos significativamente alterados, lo cual se logra evidenciar mediante los diagramas de PLS-DA (Figura 6) debido a que los grupos control y tratamiento están separados y agrupados entre sí, mostrando la existencia de una alteración del metabolismo fisiológico del microorganismo a causa del tratamiento con el AE. Además, se identificaron las principales vías

metabólicas afectadas asociadas a los metabolitos diferenciales, siendo las principales, las rutas del metabolismo central del carbono, metabolismo y biosíntesis de aminoácidos, metabolismo de las purinas y metabolismo de los nucleótidos (Tabla 4 y Figura 10).

Se puede evidenciar la alteración del metabolismo del carbono por los diferentes metabolitos encontrados alterados, entre los cuales se afecta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés) que es indispensable para el crecimiento celular y para cualquier evento celular que pueda ocurrir, como la respuesta rápida a estímulos ambientales (Miao et al., 2020). Se observó una alteración modulada positivamente del citrato (Figura 10), esta ruta es central para el metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos, además es una de las fuentes más importantes de producción de energía en *P. aeruginosa* (Al-Saafin et al., 2023). Este aumento en el citrato puede estar relacionado con su acumulación, generando un bloqueo del ciclo de TCA, lo cual afecta la producción de energía del microorganismo. En general, el metabolismo del carbono está siendo alterado por metabolitos modulados positiva y negativamente (Tabla 4), lo cual indica una afectación en el metabolismo que puede estar generando un bloqueo e interrumpen la producción de energía, ya que su catabolismo proporciona energía a la célula bacteriana en forma de ATP y precursores biosintéticos esenciales, además los microorganismos patógenos buscando sobrevivir adaptan su metabolismo a los nutrientes disponibles en las células dependiendo de sus capacidades metabólicas (Muñoz & McKinney, 2006; Eisenreich et al., 2010).

El metabolismo y biosíntesis de diferentes aminoácidos fueron unas de las rutas mayormente afectadas por el AE, este metabolismo está muy relacionado con el ciclo de TCA, ya que el metabolismo de las bacterias es muy flexible y ellas no se limitan a una única fuente de carbono, sino que pueden cambiar de sustratos cuando la fuente de carbono principal se encuentra afectada, es por esto que los aminoácidos proporcionan energía a las células por medio de la

introducción de sus esqueletos de carbonos al ciclo de TCA, esto sería una causa de la alteración de la expresión del metabolismo de diferentes aminoácidos (Eisenreich *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2022). La biosíntesis de los aminoácidos está siendo afectada por dos metabolitos modulados positivamente y dos modulados negativamente (Tabla 4), las bacterias son capaces de sintetizar aminoácidos por diferentes vías, lo cual les permite sobrevivir en ambientes limitados de aminoácidos (Li *et al.*, 2019; Franco & Blanchard, 2017); al observarse una alteración en diferentes metabolitos involucrados en estas vías se puede deducir que la bacteria presenta una afectación en la síntesis de aminoácidos y se puede ver interrumpida. Esto afectará el crecimiento celular del microorganismo y a su vez provocará un estrés celular debido a que los aminoácidos son un papel esencial para el crecimiento y supervivencia de las células, ya que son importantes en el metabolismo celular, en las respuestas al estrés, afectan las actividades y síntesis de enzimas, la homeostasis celular y la expresión génica (Li *et al.*, 2019; Awadh *et al.*, 2021).

La biosíntesis de aminoacil-ARNt desempeñan un papel central en la biosíntesis de proteínas, debido a que son la unión de un aminoácido con sus ARNt afines, además están involucrados en varias reacciones químicas, como en la biosíntesis de la envoltura celular bacteriana, la cual afecta la forma en que la célula interactúa con los antibióticos y los péptidos antimicrobianos (RajBhandary & Söll, 2008; Giegé & Springer, 2016). Esta vía metabólica está siendo alterada (Tabla 4) y probablemente está afectando la biosíntesis de las proteínas en el microorganismo, disminuyendo la replicación de las bacterias, y a su vez afectando la membrana y la pared celular. Además, RajBhandary y Söll (2008) sugieren que los inhibidores de esta vía metabólica aumentarían la sensibilidad del patógeno bacteriano y ampliarían el rango de acción de los antimicrobianos utilizados en la actualidad.

Otra ruta de aminoácidos alterada fue el metabolismo de la glicina, serina y treonina, el cual fue alterado por metabolitos modulados negativa y positivamente (Tabla 4). Estos aminoácidos son importantes para el crecimiento y la supervivencia de las células, por ejemplo, la glicina se acumula en altas concentraciones en el citoplasma desempeñando un papel importante en la construcción de una fuerza osmótica interna que previene la difusión del agua fuera de las células para mantener el contenido de agua celular (Awadh *et al.*, 2021). Además, estos aminoácidos se encuentran asociados en la biosíntesis de otros aminoácidos esenciales, y son componentes básicos en la síntesis de proteínas y de otros compuestos celulares necesarios para el crecimiento bacteriano y su adaptación.

El metabolismo de la tirosina fue afectado negativamente (Figura 10), la tirosina es un aminoácido aromático que las bacterias pueden usar para su crecimiento y supervivencia, es un componente básico de las proteínas que es sintetizado por los mismos microorganismos para producir proteínas (Han *et al.*, 2019); la alteración de este metabolismo indica nuevamente la afectación que se está generando en el microorganismo en la biosíntesis de proteínas, lo cual afecta directamente su crecimiento celular. Otras rutas metabólicas de los aminoácidos que han sido alteradas son el metabolismo de la arginina y la prolina, modulado negativamente por L-4-hidroxiglutamato semialdehído y glutamato, el metabolismo de la alanina, el aspartato y el glutamato y la biosíntesis de arginina, modulados negativamente por el glutamato. Los aminoácidos son esenciales para la estructura y función de las células, promueven el crecimiento celular y la capacidad de adaptación, además hacen parte de la modulación de la biosíntesis del peptidoglicano el cual es un componente principal de la pared celular bacteriana (Aliashkevich *et al.*, 2018).

El metabolismo de los nucleótidos y de las purinas fueron otras rutas alteradas por diferentes metabolitos (Tabla 4). En las bacterias, el metabolismo de los nucleótidos tiene un papel central en su fisiología bacteriana, sus productos se utilizan en múltiples funciones celulares, como el almacenamiento de energía, la replicación del ADN y como moléculas de señalización (Goncheva *et al.*, 2022), además los microorganismos enfocan sus recursos celulares en la biosíntesis de nucleótidos para llevar a cabo la respuesta estricta, el cual es uno de los mecanismos adaptativos que usan para lograr sobrevivir en condiciones de estrés o inanición de nutrientes (Lopatkin & Yang, 2021; Sivapragasam & Grove, 2019). La adenina se encuentra modulada negativamente en el metabolismo de los nucleótidos, y su síntesis es un proceso energéticamente caro para la célula debido a que le cuesta ocho moléculas de ATP sintetizar una molécula de adenina, lo cual explica la disminución de su expresión, además afecta la producción de ATP y nos indica que la bacteria se encuentra en un estado de estrés metabólico debido a la limitación de nutrientes, por lo cual su respuesta es enfocar los recursos celulares en la supervivencia con la síntesis de nucleótidos, para lo que requiere la presencia de las purinas que ayudan a mantener la síntesis de nucleótidos en condiciones de estrés (Sivapragasam & Grove, 2019).

Además, en el metabolismo de las purinas se encontraron principalmente metabolitos modulados negativamente (Tabla 4 y Figura 10). Las purinas desempeñan un papel importante en múltiples procesos celulares como el metabolismo energético, la codificación de la composición genética y la señalización celular (Chua & Fraser, 2020), por lo tanto, se observa una alteración en su equilibrio metabólico, que junto con la alteración obtenida en el metabolismo de las pirimidinas (Tabla 4) se observa una afectación sobre las actividades fisiológicas, como en la síntesis y metabolismo del ADN del microorganismo (Schwendner *et al.*, 2022; Franco & Blanchard, 2017).

Los conocimientos del metabolismo de las bacterias patógenas, su multirresistencia y adaptabilidad a agentes antimicrobianos se encuentra aún en fase de estudio en la actualidad, con fines de posibles descubrimientos de fármacos en el ámbito práctico por las propiedades beneficiosas de los AE y la necesidad de encontrar soluciones antimicrobianas efectivas, el futuro es prometedor y se define por los avances científicos y su aplicación práctica (Muñoz & McKinney, 2006). Este estudio radica en el uso de la metabolómica microbiana no dirigida y una estrategia de análisis de vías metabólicas para revelar las afectaciones que sufrió *P. aeruginosa* durante el tratamiento con el AE, logrando identificar múltiples alteraciones en las rutas del microorganismo, lo que proporciona información valiosa sobre las afectaciones causadas y sus respuestas metabólicas, brindando nueva información sobre los mecanismos de acción del AE.

8. Conclusiones

La ineficacia presente en los tratamientos médicos en los últimos años ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos productos antimicrobianos, siendo los AE, uno de los productos más prometedores por sus diferentes propiedades biológicas reportadas, entre ellas propiedades antimicrobianas. El AE de *L. origanoides* (quimiotipo timol) exhibió actividad antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853 con una CMI₃₀ de 0,37 mg/mL. Los análisis por metabolómica no dirigida, permitió determinar que el AE de *L. origanoides*, generó cambios en el metabolismo del microorganismo relacionados principalmente el metabolismo y síntesis de diferentes aminoácidos, biosíntesis de aminoacil – ARNt, los cuales están asociados con la síntesis de proteínas; a su vez estuvo alterado el metabolismo del carbono con una acumulación del citrato y disminución de otros metabolitos que pueden estar interrumpiendo esta vía metabólica de producción de energía. Adicionalmente, se detectaron cambios en diferentes metabolitos presentes en el metabolismo de las purinas y de los nucleótidos, y así mismo, cambios en el metabolismo de

las pirimidinas y de los glicerofosfolípidos. Estos hallazgos brindan nuevos conocimientos sobre los posibles mecanismos antimicrobianos que ejerce el AE de *L. origanoides* y promueven la intensificación de la investigación de los AE para posibles usos como agentes antibacterianos naturales.

Referencias

- Acero, G. J., Guzmán-Hernández, T., & Muñoz-Ruíz, C. (2019). Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (Verbenaceae), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Tecnología en Marcha*, 32, 3-11. <https://doi.org/10.8845/tm.v32.i1.4114>
- Alarcon, B. J. C., Kostidis, S., Ondo, M. A., & Giera, M. (2022). Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. *Drug Discovery Today*, 27(6), 1763–1773. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.018>
- Aliashkevich, A., Álvarez, L., & Cava, F. (2018). New insights into the mechanisms and biological roles of D-Amino acids in complex Eco-Systems. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00683>
- Almanaa, T. N., Alharbi, N. S., Ramachandran, G., Kanisha Chelliah, C., Rajivgandhi, G., Manoharan, N., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., & Alanzi, K. F. (2021). Anti-biofilm effect of *Nerium oleander* essential oils against biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa* on urinary tract infections. *Journal of King Saud University - Science*, 33(2). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101340>
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Al-Saafin, B. A., Al-Bakri, A. G., Abdelrazig, S., & Dahabiyeh, L. A. (2023). Investigating the effect of the probiotic *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic fructooligosaccharides on *Pseudomonas aeruginosa* metabolome, virulence factors and biofilm formation as potential quorum sensing inhibitors. *Microbial Pathogenesis*, 177, 106057. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106057>
- Alshammari, H. O., Somily, A. M., Qattan, M. Y., Alsubki, R. A., & Moussa, I. M. (2023). Susceptibility pattern of multi-drug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Tertiary

Care Hospital in Riyadh, KSA. *Journal of King Saud University - Science*, 35(5), 102702.

<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102702>

Álvarez, M. F. J., Barrajón, C. E., Herranz, L. M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action.

Phytomedicine, 90, 153626. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>

Anooja, P. M., & John, A. P. (2021). Antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens from a tertiary care centre in central Kerala with special reference to carbapenemase detection. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(4), 2117-2124.

<https://doi.org/10.22207/JPAM.15.4.34>

Araby, E., & El-Tablawy, S. Y. (2016). Inhibitory effects of rosemary (*Rosemarinus officinalis L.*) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 24-32.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.024>

Awadh, A. A., Gresley, A. L., Forster-Wilkins, G., Kelly, A. F., & Fielder, M. D. (2021). Determination of metabolic activity in planktonic and *biofilm* cells of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma pneumoniae* by nuclear magnetic resonance. *Scientific Reports*, 11(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84326-2>

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Barallobre Barreiro, J., Chung, Y.-L., & Mayr, M. (2013). Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 66(8), 657-661. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2013.04.009>

- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7, 1-18. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29(2), 102 – 111. https://www1.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachments/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf
- Borges, A. R., Aires, J. R. de A., Higino, T. M. M., Medeiros, M. das G. F. de, Citó, A. M. das G. L., Lopes, J. A. D., & Figueiredo, R. C. B. Q. de. (2012). Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, 132(2), 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>
- Bouyahya, A., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.03.001>
- Brakert, L., Berneking, L., Both, A., Berinson, B., Huang, J., Aepfelbacher, M., Wolschke, C., Wichmann, D., & Rohde, H. (2023). Rapid development of cefiderocol resistance in a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate associated with mutations in the pyoverdine biosynthesis pathway. *Journal of global antimicrobial resistance*, 34, 59-62. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.06.003>
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Briones, L. E. (2006). La resistencia bacteriana y el mal uso de antibióticos en hospitales. Una historia sin fin. *Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 19.20(76), 112-120.

- Burdisso, P., Rasia, R. M. & Vila, A. J. (2016). Metabolómica y medicina de precisión. *Revista Médica de Rosario*, 82, 75-76.
- Burrows, L. L. (2018). The therapeutic pipeline for *Pseudomonas aeruginosa* infections. En *ACS Infectious Diseases*, 4(7), 1041-1047. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00112>
- Cabrera, CE, Gómez, RF y Zúñiga, AE. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 149-158.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, *anti-biofilm* and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E. E., Torres, R., & Ortiz, C. (2023). Metabolomic analysis of the effect of *Lippia origanoides* essential oil on the inhibition of Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Antibiotics*, 12(5), 814. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050814>
- Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., McKerrow, J. H., Sakanari, J. A. (2016). *Microbiología médica*, 27e. McGraw Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1837§ionid=128954408>
- Castanheira, M., Doyle, T. B., Hubler, C. M., Collingsworth, T. D., DeVries, S., & Mendes, R. E. (2022). The plethora of resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: transcriptome analysis reveals a potential role of lipopolysaccharide pathway proteins to novel β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 31, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.07.021>

- Castañeda, M. I., Muñoz, A., Martínez, J. R., & Stanschenko, E. E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia Et Technica*, 1(33). <https://doi.org/10.22517/23447214.5845>
- Castellanos, A. N. (2020). *Instalación de una planta de producción de aceites esenciales*. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/25027>
- Chávez, J. V. M. (2020). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Un problema de salud pública sin ESKAPE. *Milenaria, Ciencia Y Arte*, (15), 6–8. <http://milenaria.umich.mx/ojs/index.php/milenaria/article/view/84>
- 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, J., Zhang, J., Zhu, L., Qian, C., Tian, H., Zhao, Z., Jin, L., & Yang, D. (2022). Antibacterial activity of the essential oil from *Litsea cubeba* against *Cutibacterium acnes* and the investigations of its potential mechanism by Gas Chromatography-Mass Spectrometry metabolomics. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.823845>
- Chen, S., Li, Z., Gu, Z., Ban, X., Hong, Y., Cheng, L., & Li, C. (2023). A new micro-agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentration of essential oils against microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 211, 106791. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106791>
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>

- Chua, S. M., & Fraser, J. A. (2020). Surveying purine biosynthesis across the domains of life unveils promising drug targets in pathogens. *Immunology & Cell Biology*, 98(10), 819-831. <https://doi.org/10.1111/imcb.12389>
- CLSI. (2015). M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial (Issue January).
- Cioni, E., Migone, C., Ascrizzi, R., Muscatello, B., de Leo, M., Piras, A. M., Zambito, Y., Flamini, G., & Pistelli, L. (2022). Comparing metabolomic and essential oil fingerprints of *Citrus australasica* F. Muell (Finger Lime) varieties and their *in vitro* antioxidant activity. *Antioxidants*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/antiox11102047>
- Costa, L. V., Moreira, J. M. A. R., de Godoy Menezes, I., Dutra, V., & de Almeida, A. do B. P. F. (2022). Antibiotic resistance profiles and activity of clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) against *Pseudomonas aeruginosa* isolated of canine otitis. *Veterinary World*, 2499-2505. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2499-2505>
- Ding, J., & Feng, Y. Q. (2023). Mass spectrometry-based metabolomics for clinical study: Recent progresses and applications. En *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116896>
- Dugassa, J., & Shukuri, N. (2017). Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. *Journal of Health, Medicine and Nursing*, 1(3), 1–17. Obtenido de <https://iprjb.org/journals/index.php/JHMN/article/view/560>
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., & Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 401-412. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2351>
- El-Sherbiny, G. M., Basha, A. M., & Mabrouk, M. I. (2022). Control of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* co-harboring metallo- β -lactamase enzymes with *oprD* gene

downregulation. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40(1), 51-56.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.11.002>

Fekry, M., Yahya, G., Osman, A., Al-Rabia, M. W., Mostafa, I., & Abbas, H. A. (2022). GC-MS analysis and microbiological evaluation of caraway essential oil as a virulence attenuating agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 27(23). <https://doi.org/10.3390/molecules27238532>

Feng, W., Sun, F., Wang, Q., Xiong, W., Qiu, X., Dai, X., & Xia, P. (2017). Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 142-147.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.11.012>

Franco, T. M. A., & Blanchard, J. S. (2017). Bacterial branched-chain amino acid biosynthesis: structures, mechanisms, and drugability. *Biochemistry*, 56(44), 5849-5865.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00849>

Ghaderi, L., Aliahmadi, A., Ebrahimi, S. N., & Rafati, H. (2021). Effective inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by Satureja khuzistanica essential oil nanoemulsion. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102260>

Giegé, R., & Springer, M. (2016). Aminoacyl-tRNA synthetases in the bacterial world. *Ecosal plus*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0002-2016>

Golpayegani, A., Nodehi, R. N., Rezaei, F., Alimohammadi, M., & Douraghi, M. (2019). Real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and virulence evaluation of the environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Molecular Biology Reports*, 46(4), 4049-4061.
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04855-y>

Gómez, N., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activities of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (MRSA). *Antibiotics*, 9(11), 1-18.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9110730>

Goncheva, M. I., Chin, D., & Heinrichs, D. E. (2022). Nucleotide biosynthesis: the base of bacterial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 30(8), 793-804. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.12.007>

Guillín, Y., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., & Ortiz, C. (2023). Untargeted metabolomics for unraveling the metabolic changes in planktonic and sessile cells of *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 after treatment with *Lippia origanoides* essential oil. *Antibiotics*, 12(5), 899. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050899>

Guillín, Y., Cáceres, M., Torres, R., Stashenko, E., & Ortiz, C. (2021). Effect of essential oils on the inhibition of biofilm and quorum sensing in *Salmonella enteritidis* 13076 and *Salmonella typhimurium* 14028. *Antibiotics*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101191>

Gutiérrez, S., Correa, A., Hernández-Gómez, C., de La Cadena, E., Pallares, C., & Villegas, M. V. (2019). Detection of carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(10), 648-651. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.02.004>

Hall, C. W., & Mah, T. (2017). Molecular mechanisms of *biofilm*-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *Fems Microbiology Reviews*, 41(3), 276-301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>

Han, Q., Phillips, R. S., & Li, J. (2019). Aromatic amino acid metabolism. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00022>

Helander, I. M., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., & Gorris, L. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-Negative

bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590-3595.
<https://doi.org/10.1021/jf980154m>

Hernandes, C., Pina, E. S., Taleb-Contini, S. H., Bertoni, B. W., Cestari, I. M., Espanha, L. G., Varanda, E. A., Camilo, K. F. B., Martinez, E. Z., França, S. C., & Pereira, A. M. S. (2017). *Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 900-910.
<https://doi.org/10.1111/jam.13398>

Horváth, G., & Ács, K. (2015). Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(5), 331-341. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ffj.3252>

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

Instituto Nacional de Salud (INS), República de Colombia. (2019). Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) 2018.

Kachur, K., & Suntres, Z. E. (2019). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3042-3053.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>

Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. En *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338-344.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.04.020>

- Kim, J., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. (2021). Synergistic antimicrobial activities of plant essential oils against *Listeria monocytogenes* in organic tomato juice. *Food Control*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108000>
- Kowalska, K. B., & Dudek, W. R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Laborda, P., Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.010>
- Lebeque, P. Y., Morris, Q. H., & Calás, V. N. (2006). Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de Medicina*, 45(1). Obtenido el 23 de octubre de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475232006000100005&lng=es&lng=es.
- Lebreton, F., Snesrud, E., Hall, L., Mills, E., Galac, M., Stam, J., Ong, A., Maybank, R., Kwak, Y. I., Johnson, S., Julius, M., Ly, M., Swierczewski, B., Waterman, P. E., Hinkle, M., Jones, A., Lesho, E., Bennett, J. W., & Mcgann, P. (2021). A panel of diverse *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates for research and development. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(4). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab179>
- Leggett, A., Li, D., Bruschiweiler-Li, L., Sullivan, A., Stoodley, P., & Brüschiweiler, R. (2022). Differential metabolism between *biofilm* and suspended *Pseudomonas aeruginosa* cultures in bovine synovial fluid by 2D NMR-based metabolomics. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22127-x>

- Li, T., Zhan, Z., Lin, Y., Lin, M., Xie, Q., Chen, Y., He, C., Tao, J., & Li, C. (2019). Biosynthesis of amino acids in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is essential to its pathogenicity. *Microorganisms*, 7(12), 693. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120693>
- Liu, L., Law, C. O. K., Nie, Q., Pham, H., Ma, H., Zhang, L., Ho, P. L., & Lau, T. C. (2023). Comparative analysis of outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli* reveal the role of aromatic amino acids synthesis proteins in motility. *International Journal of Medical Microbiology*, 313(1), 151573. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2023.151573>
- Lopatkin, A. J., & Yang, J. H. (2021). Digital insights into nucleotide metabolism and antibiotic treatment failure. *Frontiers in digital health*, 3. <https://doi.org/10.3389/fdgth.2021.583468>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. (s. f.). Brock. Biología de los microorganismos (14^a edición).
- Mahajan, M. S., Tan, M. W., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa* - *Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell Press*, 96(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80958-7)
- Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Sokeng, A. J. T., Izadi, M., Jafari, N. J., Suntar, I., Daglia, M., & Nabavi, S. M. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8), 947. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma10080947>
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., & Izadi, M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>

- Martínez, A., Manrique, M. M., Klaiss, L. M., Stashenko, E., Zafra, G., & Ortiz, C. (2021). Effect of essential oils on growth inhibition, *biofilm* formation and membrane integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121474>
- Masyita, A., Mustika Sari, R., Dwi Astuti, A., Yasir, B., Rahma Rumata, N., Emran, T. bin, Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*, *13*. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
- Mehrad, B., Clark, N. M., Zhanel, G. G., & Lynch, J. P. (2015). Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest*, *147*(5), 1413-1421. <https://doi.org/10.1378/chest.14-2171>
- Méndez, R. K., Santoyo, T. M., Saldaña, V. K, Rodríguez, A. M. Flores, R. R., & Pérez, V. F. (2019). Metabolómica como nueva herramienta para el diagnóstico oportuno en enfermedades no transmisibles. *Revista de Salud Ambiental*, *19*(2), 109-115.
- Meschiari, M., Orlando, G., Kaleci, S., Bianco, V., Sarti, M., Venturelli, C., & Mussini, C. (2021). Combined resistance to ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam in extensively drug-resistant (Xdr) and multidrug-resistant (mdr) *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance predictors and impact on clinical outcomes besides implications for antimicrobial stewardship programs. *Antibiotics*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101224>
- Miao, Q., Zhao, L., Wang, Y., Hao, F., Sun, P., He, P., Liu, Y., Huang, J., Liu, X., Liu, X., Deng, G., Li, H., Li, L., Tang, Y., Wang, L., Feng, M., & Jia, W. (2020). Microbial metabolomics and network analysis reveal fungistatic effect of basil (*Ocimum basilicum*) oil on *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, *260*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.11300>

- Ministerio de Salud y Protección Social (MINSALUD), República de Colombia. (2018). Programa de prevención, vigilancia y control de infecciones asociadas a la atención en salud-IAAS y la resistencia antimicrobiana. Repositorio institucional digital. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/programa-iaas-ram.pdf>
- Mir, S. A., Shrotriya, V., Al-Muhimeed, T. I., Hossain, M. A., & Zaman, M. B. (2023). Metal and metal oxide nanostructures applied as alternatives of antibiotics. *Inorganic Chemistry Communications*, 150, 110503. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.110503>
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., & Labuzek, S. (2004). Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. *Microbiological Research*, 159(1), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.02.001>
- Muñoz, E. J., & McKinney, J. D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular Microbiology*, 8(1), 10-22. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00648.x>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Mutlu, I. A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. *Molecules*, 25(20), 4711. <https://doi.org/10.3390/molecules25204711>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013b). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

- Ni, Z. J., Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2021). Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends in Food Science and Technology*, *110*, 78-89. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.070>
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S. & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, *101*(1), 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022>
- Oliver, S. G. (1997). Yeast as a navigational aid in genome analysis. 1996 Kathleen Barton-Wright Memorial Lecture. *Microbiology*, *143*(5), 1483–1487. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-5-1483>
- Oliva, M. L., Uchima, S. M. M., Suárez, J. P., Arango, A. C. M., & Pabón, M. C. M. (2023). *Lippia origanoides* derivatives *in vitro* evaluation on polymicrobial *biofilms*: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, *148*, 105656. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105656>
- Olmos, E. J. & Tabares, R. L. (2015). Determinación de bacterias oportunistas que causan infecciones graves en pacientes con quemaduras que residen en la sala de quemados del Hospital Provincial Docente Riobamba (Tesis para Licenciado, Universidad Técnica de Ambato). Repositorio digital de la Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/9505>
- O'Neill, J. (2016). Review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Government of the United Kingdom*. <https://apo.org.au/node/63983>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Accedido el 14 de noviembre del 2022, de

<https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017a). Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2021). Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. Accedido el 14 de noviembre del 2022, de <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>

Opperman, C. J., Moodley, C., Lennard, K., Smith, M., Ncayiyana, J., Vulindlu, M., Gafoor, M., Govender, N., Ismail, H., Bamford, C., McCarthy, K. M., Nicol, M. P., & Centner, C. M. (2022). A citywide, clonal outbreak of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Infectious Diseases*, *117*, 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.01.039>

Otis, G., Bhattacharya, S., Malka, O., Kolusheva, S., Bolel, P., Porgador, A., & Jelinek, R. (2019). Selective labeling and growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by aminoguanidine carbon dots. *American Chemical Society Infectious Diseases*, *5*(2), 292-302. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00270>

Oyedeji, A. B., Green, E., Adebisi, J. A., Ogundele, O. M., Gbashi, S., Adefisoye, M. A., Oyeyinka, S. A., & Adebo, O. A. (2021). Metabolomic approaches for the determination of metabolites from pathogenic microorganisms: a review. *Food Research International*, *140*, 110042. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110042>

Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P. É., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and

functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388–W396.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>

Pejčić, M., Stojanović, Z., Genčić, M., Dimitrijević, M., & Radulović, N. (2020). Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of *biofilm* formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food and Chemical Toxicology*, 141.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111431>

Peña, B. C., Roca, M., López, R., Baquero, M., Vento, M., & Cháfer, C. (2020). Metabolomics study to identify plasma biomarkers in Alzheimer Disease: APOE genotype effect. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 180, 113088.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113088>

Pereira, V., Dias, C., De Vasconcelos, M. C., Rosa, E., & Saavedra, M. J. (2014). Antibacterial activity and synergistic effects between eucalyptus globulus leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, 52, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.032>

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>

Programa de Lugares Emblemáticos Internacionales de la Historia de la Química de la ACS. (1999). Descubrimiento y desarrollo de la penicilina. *American Chemical Society*. Accedido el 12 de septiembre del 2022, de <http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/historia-quimica/descubrimiento-desarrollo-penicilina.html>

RajBhandary, U. L., & Söll, D. (2008). Aminoacyl-tRNAs, the bacterial cell envelope, and antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5285-5286.

- Rashiya, N., Padmini, N., Ajilda, A. A. K., Prabakaran, P., Durgadevi, R., Veera Ravi, A., Ghosh, S., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2021). Inhibition of *biofilm* formation and quorum sensing mediated virulence in *Pseudomonas aeruginosa* by marine sponge symbiont *Brevibacterium casei* strain Alu. *Microbial Pathogenesis*, *150*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104693>
- Rather, M. A., Saha, D., Bhuyan, S., Jha, A. N., & Mandal, M. (2022). Quorum quenching: a drug discovery approach against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, *264*, 127173. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127173>
- Reyes, J. F., Munguía, P. R., Cid, P. T. S., Hernández, C. P., Ochoa, V. C. E., & Avila, S. R. (2020). Inhibitory effect of mexican oregano (*Lippia berlandieri Schauer*) essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Thyphimurium biofilm* formation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00036>
- Ribeiro, F. P., Santana de Oliveira, M., Feitosa, A., Santana, B. M P., Moacir Do Rosario, M. A., Aguiar, E. H., & Favacho, R. A. (2021). Chemical composition and antibacterial activity of the *Lippia origanoides* kunth essential oil from the Carajás National Forest, Brazil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, *2021*. <https://doi.org/10.1155/2021/9930336>
- Rojo, D. & Barbas, C. (2015). La ventana de la metabolómica, vislumbrando el panorama de sus aplicaciones. *Sociedad Español de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM)*, *186*.
- Ruiz, D. J., Torres, R., Stashenko, E. E., & Ortiz, C. (2023). Antifungal and *antibiofilm* activity of Colombian essential oils against different *Candida* strains. *Antibiotics*, *12*(4), 668. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040668>
- Santos, B. N. G. D., Furtado, M. M., De Freitas, E. D., Lima, L. R., Leão, P. V. S., De Alcântara Oliveira, F. A., De Medeiros, M. D. G. F., De Andrade, E. M., Feitosa, R. C. A., De H Tavares, S. C. C., Coutinho, H. D. M., Ferreira, J. H. L., & Barreto, H. M. (2023). Chemical profile of the

essential oil of *Lippia origanoides* Kunth and antibiotic resistance-modifying activity by gaseous contact method. *Journal of Herbal Medicine*, 100703. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100703>

Sathe, N. S., Beech, P. L., Croft, L., Suphioglu, C., Kapat, A., & Athan, E. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and Exploring novel approaches to treatment. *Infectious medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2023.05.003>

Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C., Dirección de Salud Pública. (2007). Política de prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalaria (IIH) para Bogotá, D.C

Shafran, N., Shafran, I., Ben-Zvi, H., Sofer, S., Sheena, L., Krause, I., Shlomai, A., Goldberg, E., & Sklan, E. H. (2021). Secondary bacterial infection in COVID-19 patients is a stronger predictor for death compared to influenza patients. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92220-0>

Shen, S., Zhan, C., Yang, C., Fernie, A. R., & Luo, J. (2022). Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: Past decade and future perspectives. *Molecular Plant. Cell Press*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.09.007>

Sivapragasam, S., & Grove, A. (2019). The link between purine metabolism and production of antibiotics in *Streptomyces*. *Antibiotics*, 8(2), 76. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020076>

Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010a). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>

- Trujillo, L. S., Quintero, R. E., Stashenko, E. E., Conde, O. S., Rondón, V. P., & Ocazonez, R. E. (2022). Essential oils from Colombian plants: Antiviral potential against dengue virus based on chemical composition, *in vitro* and *in silico* analyses. *Molecules*, 27(20). <https://doi.org/10.3390/molecules27206844>
- Saccetti, E., & Timmerman, M. E. (2016). Approaches to sample size determination for multivariate data: applications to PCA and PLS-DA of OMicS Data. *Journal of Proteome Research*, 15(8), 2379-2393. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01029>
- Schwendner, P., Riedo, A., Melton, D. J., Horváth, P., Lindner, R., Ehrenfreund, P., Beblo, V. K., Rettberg, P., Rabbow, E., Westall, F., Bashir, A. K., Moissl, E. C., García, D. L., Gómez, F., Amils, R., Marteinson, V., Walter, N., & Cockell, C. S. (2022). Microbial metabolism of amino acids—biologically induced removal of glycine and the resulting fingerprint as a potential biosignature. *Frontiers in Astronomy and Space Sciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fspas.2022.781542>
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133-1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>
- Sumner, L. W., Mendes, P., & Dixon, R. A. (2003). Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62(6), 817-836. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00708-2)
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1-21. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>

- Tang, C., Chen, J., Zhou, Y., Ding, P., He, G., Zhang, L., Zhao, Z., & Yang, D. (2021). Exploring antimicrobial mechanism of essential oil of *Amomum villosum* Lour through metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126608>
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., & Siuzdak, G. (2012). XCMS Online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Analytical Chemistry*, 84(11), 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/ac300698c>
- Usano, A. J., Paúl, J. P., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)*, 7(2).
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull, K. E. (2019). Bacterial *biofilm* eradication agents: A current review. *Frontiers in Chemistry*, 7. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>
- Vicuña, G. C., Stashenko, E., & Fuentes, J. L. (2010). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), 343-349. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.008>
- Viuda, M. M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2011). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22(11), 1715–1722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.003>
- Wang, Y., Wu, J., & Yang, H. (2022). Comparison of the metabolic responses of eight *Escherichia coli* strains including the “big six” in pea sprouts to low concentration electrolysed water by NMR spectroscopy. *Food Control*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108458>

- Waris, M., Koçak, E., Gonulalan, E. M., Demirezer, L. O., Kır, S., & Nemutlu, E. (2022). Metabolomics analysis insight into medicinal plant science. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 157. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116795>
- Wei, A., & Shibamoto, T. (2007). Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1737–1742. <https://doi.org/10.1021/jf062959x>
- Wijesinghe, G. K., Feiria, S. B., Maia, F. C., Oliveira, T. R., Joia, F., Barbosa, J. P., Boni, G. C., & Höfling, J. F. (2021). In-vitro antibacterial and *antibiofilm* activity of *Cinnamomum verum* leaf oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 93(1), 1-11. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201507>
- Worley, B., Halouska, S. M., & Powers, R. (2013). Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots. *Analytical Biochemistry*, 433(2), 102-104. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.011>
- Wright, G. D. (2014). Something old, something new: Revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(3), 147-154. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0063>
- Yanes, O. (s. f.). La metabolómica: un déjà vu por la historia de la bioquímica. *Revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, SEEBM*. Tomado de [Obtenido de https://revista.sebbm.es/articulo.php?id=6&url=la-metabolomica-un-dej-vu-por-la-historia-de-la-bioquimica&isrevista=1](https://revista.sebbm.es/articulo.php?id=6&url=la-metabolomica-un-dej-vu-por-la-historia-de-la-bioquimica&isrevista=1)

Anexos

Anexo A. Comparación de espectros de masas obtenidos por UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS con espectros reportados.

Metabolito identificado	Fórmula molecular	Aducto	Masa		Δ ppm	Iones característicos	
			Calculada	Experimen tal		Encontrados	Reportados
Adenina	$C_5H_5N_5$	$(M+H)^+$	136,0623	136,0618	3,93	119,0352 109,0509 94,0400 92,0246	119,0352 109,0508 94,0400 92,0243
Inosina	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	$(M+NH_4-H_2O)^+$	268,1037	268,1037	0,18	137,0456 97,0286 73,0288 69,034	137,0457 97,0285 73,0273 69,0323
Pterin	$C_6H_5N_5O$	$(M+H)^+$	164,0572	164,0566	3,96	119,035 96,0558 94,0409 92,0247	119,0324 96,0542 94,0389 92,0225
L-4-hidroxiglutamato semialdehído	$C_5H_9NO_4$	$(M+H)^+$	148,0609	148,0604	4,04	130,0500 102,0553 84,0448 74,0241	130,0498 102,0549 84,0444 74,0236
Dihidrotimina	$C_5H_8N_2O_2$	$(M+Na)^+$	151,0482	151,0477	3,82	129,0659 111,0553 101,0709 58,0655	129,0659 111,0553 101,0709 58,0651

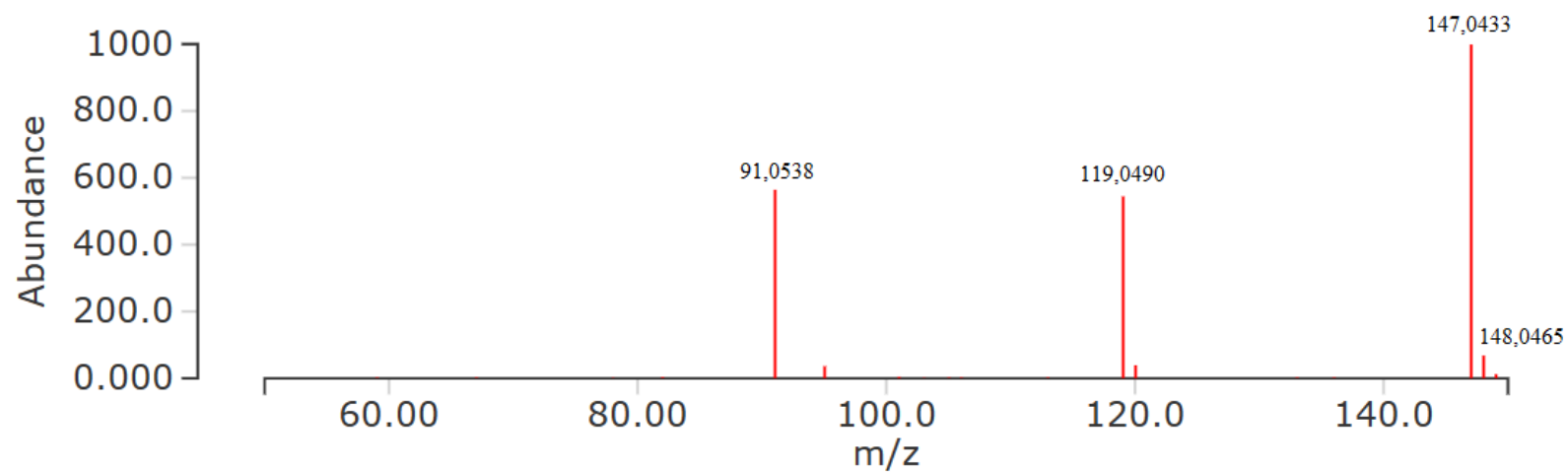
Ácido p-cumárico	$C_9H_8O_3$	$(M+Na)^+$	187,0370	187,0366	2,37	148,0474 147,0437 119,0490 91,0545	148,0465 147,0433 119,0490 91,0538
S-(3-oxo-3-carboxi-n-propil)cisteína	$C_7H_{11}NO_5S$	$(3M+H)^+$	664,1152	664,1155	0,42	101,0233 89,0054 55,0178 114,9852	101,0233 89,0056 55,0178 114,9848
Valil-seril-arginina	$C_{14}H_{28}N_6O_5$	$(M+H)^+$	361,2199	361,2189	2,93	72,0813 60,0450 74,0969	72,0807 60,0443 74,0964
Ácido pirrolidonacarboxílico	$C_5H_7NO_3$	$(M+H)^+$	130,0504	130,0499	4,09	84,0449 56,0501 130,0500	84,0452 56,0503 130,0504
Glutamato	$C_5H_9NO_4$	$(M+Na)^+$	170,0428	170,0422	3,87	131,0337 130,0499 102,0552 84,0443	131,0320 130,0490 102,0560 84,0440
Heptano-1,2,3-triol	$C_7H_{16}O_3$	$(M+Na)^+$	171,0996	171,0995	0,84	69,0704 113,0962 99,0808 57,0704	69,0698 113,0960 99,0804 57,0698
Homoserina	$C_4H_9NO_3$	$(M+2Na-H)^+$	164,0298	164,0293	3,07	56,0501 74,0605 58,0656 57,0535	56,0494 74,0590 58,0648 57,0547

Xantina	$C_5H_4N_4O_2$	$(M+NH_4-H_2O)^+$	152,0564	152,0567	2,59	110,0348 82,0398 136,0139	110,0349 82,0394 136,0138
(L/D)-Aspartato	$C_4H_7NO_4$	$(2M+H)^+$	267,0828	267,0809	6,95	116,0340 88,0376 74,0235 70,0271	116,0340 88,0370 74,0230 70,0270
N-Carbamoilsarcosin	$C_4H_8N_2O_3$	$(M+H)^+$	133,0613	133,0608	4,00	90,0552 88,0393 87,0553 72,0444	90,0550 88,0393 87,0553 72,0444
Hidroxiectoína	$C_6H_{10}N_2O_3$	$(3M+Na)^+$	497,1971	497,1967	0,86	95,0608 113,0711 141,0656 97,0763	95,0603 113,0709 141,0658 97,076
Alanilvalina	$C_8H_{16}N_2O_3$	$(M+2Na-H)^+$	233,0876	233,0871	2,37	72,0813 118,0864 57,0579 55,0549	72,08104 118,08711 57,05825 55,05486
4-O-(beta-L-Arabinofuranosil)-(2S,4S)-4-hidroxi prolina	$C_{10}H_{17}NO_7$	$(M+H)^+$	264,1083	264,1075	3,19	98,0603 132,0655 68,0499 114,0550	98,0600 132,0655 68,0495 114,0549
L-Prolinamida	$C_5H_{10}N_2O$	$(M+Na)^+$	137,0690	137,0685	3,74	70,0656 115,0868 97,0763	70,0651 115,0865 97,0760

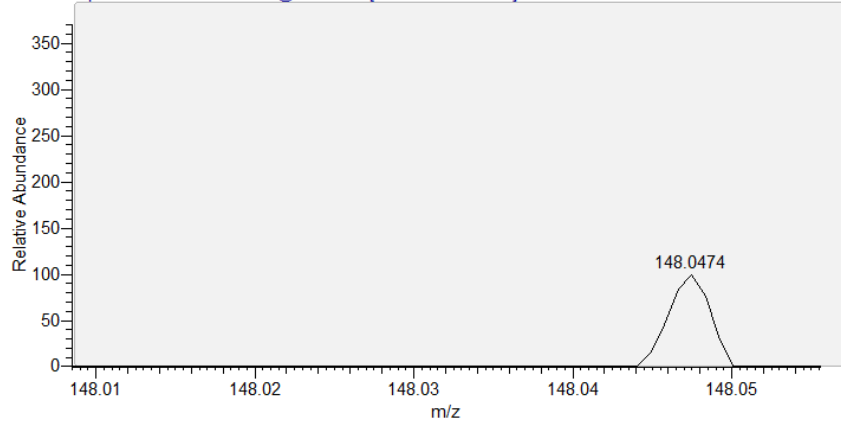
1,3-Dimetilurea	$C_3H_8N_2O$	$(2M+H)^+$	177,1351	177,1345	3,76	89,0714 71,0609 62,0605 60,0449	89,0715 71,0609 62,0606 60,0449
Coenzima F420-0	$C_{19}H_{22}N_3O_{12}P$	$(M+Na-2H)^-$	536,0682	536,0676	0,80	78,9578 62,9630 152,9947	78,9590 62,9641 152,9958
Asparaginil-cisteinil-cisteína	$C_{10}H_{18}N_4O_5S_2$	$(M-H-H_2O)^-$	319,0489	319,0522	9,89	218,0603 115,0506 112,0505 130,0611	218,0604 115,0513 112,0516 130,0622
(S)-malil alfa-D-glucosaminida	$C_{10}H_{17}NO_9$	$(M-H)^-$	294,0825	294,0825	0,03	89,0233 87,0076 72,9931 59,0126	89,0244 87,0087 72,9931 59,0138
L-arabinitol 5-fosfato	$C_5H_{13}O_8P$	$(M-H)^-$	231,0270	231,0271	1,45	78,9579 96,9684 138,9790 71,0127	78,9590 96,9696 138,9801 71,0138
ADP-ribosa	$C_{15}H_{23}N_5O_{14}P_2$	$(M-H-H_2O)^-$	540,0487	540,0529	7,67	78,9578 346,0552 96,9684 158,9242	78,9573 346,0543 96,9681 158,9244
Ácido 4-hidroxi-L-glutámico	$C_5H_9NO_5$	$(M-H)^-$	162,0402	162,0410	4,74	74,0238 72,0079 100,0396 86,0237	74,0247 72,0091 100,0404 86,0247

CDP-Glicerol	$C_{12}H_{21}N_3O_{13}P_2$	(M-H) ⁻	476,0471	476,0467	0,85	78,9579 96,9684 152,9948 158,9242	78,9589 96,9696 152,9958 158,9253
Asparaginil-lisina	$C_{10}H_{20}N_4O_4$	(M-H) ⁻	259,1406	259,1405	0,44	143,0816 145,0971 141,0659 126,0551	143,0826 145,0982 141,0669 126,0560
Citrato	$C_6H_8O_7$	(M+Na-2H) ⁻	213,0011	213,0007	1,78	147,0288 129,0190 191,0189 111,0080	147,0293 129,0190 191,0193 111,0087
4-Hidroxitreonina	$C_4H_9NO_4$	(M-H) ⁻	134,0453	134,0461	5,64	116,0345 104,0343 102,0186 74,0241	116,0353 104,0353 102,0197 74,0248

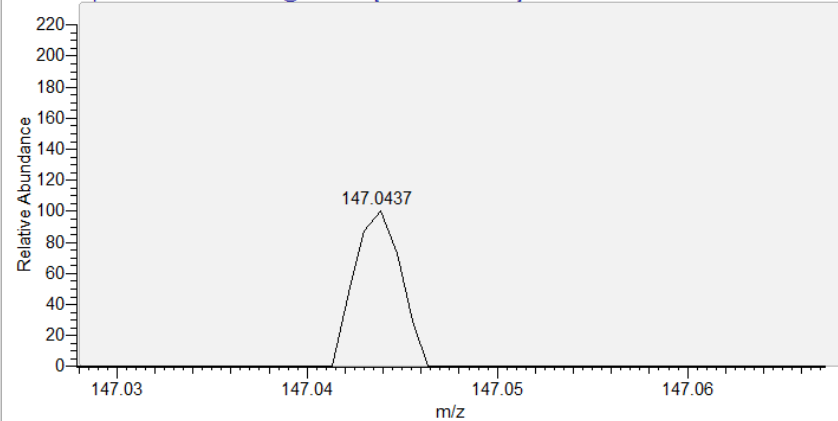
Todos los espectros de masas fueron obtenidos por medio de las bases de datos Mass Bank, PubChem, HMDB y CFM-ID (versión 3.0 y 4.0).

Anexo B. Comparación de espectros de masas del ácido p-cumárico

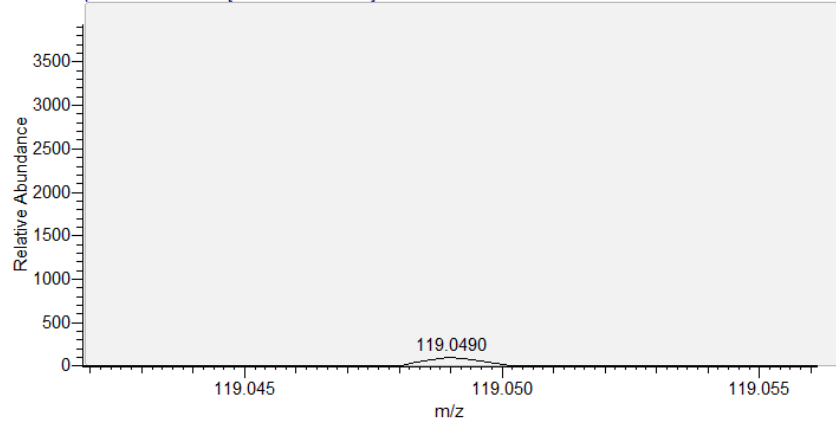
993452-61-EB RT: 1.45
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd10.00 [50.0000-750.0000]



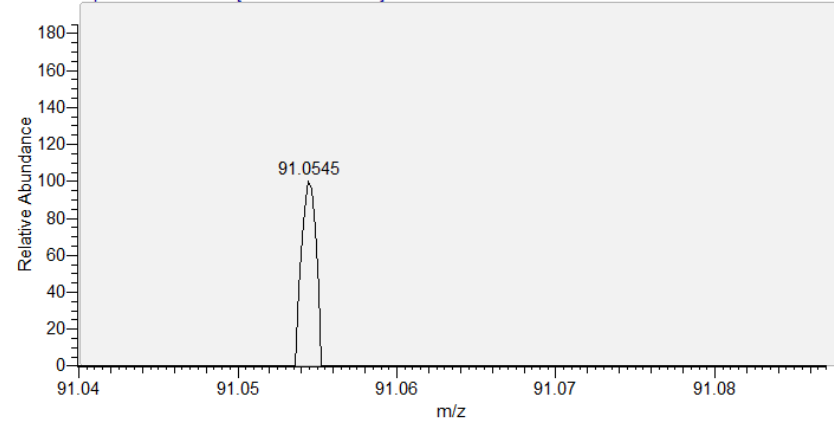
993452-61-EB RT: 1.44
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd30.00 [50.0000-750.0000]



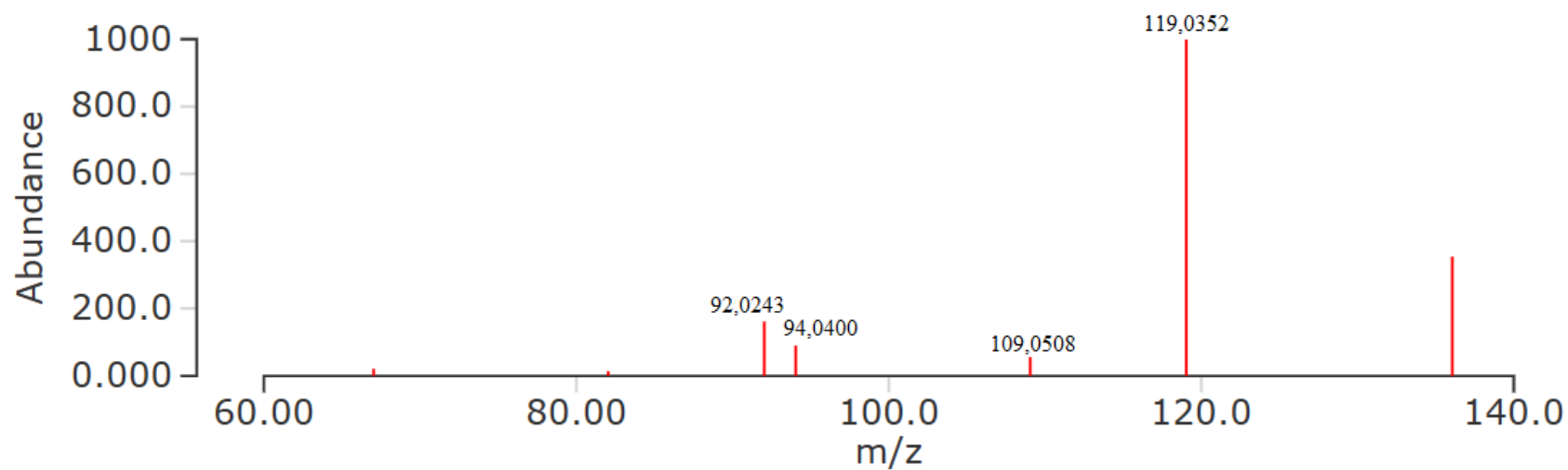
993452-61-EB RT: 1.45
T: FTMS + p ESI Full lock ms [50.0000-750.0000]



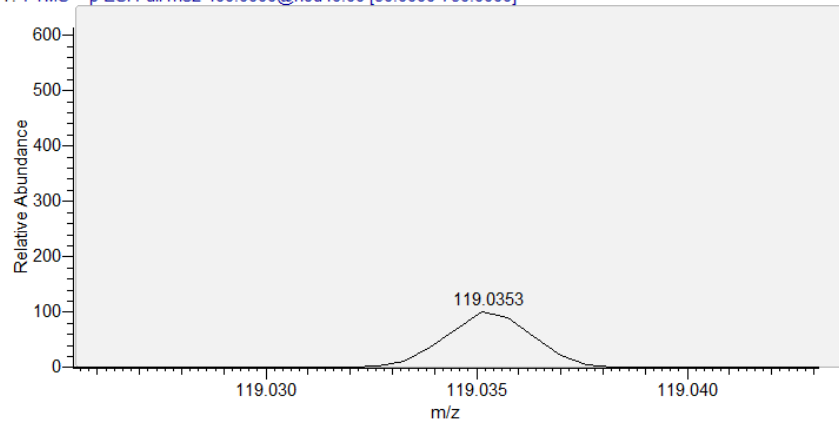
993452-61-EB RT: 1.45
T: FTMS + p ESI Full lock ms [50.0000-750.0000]



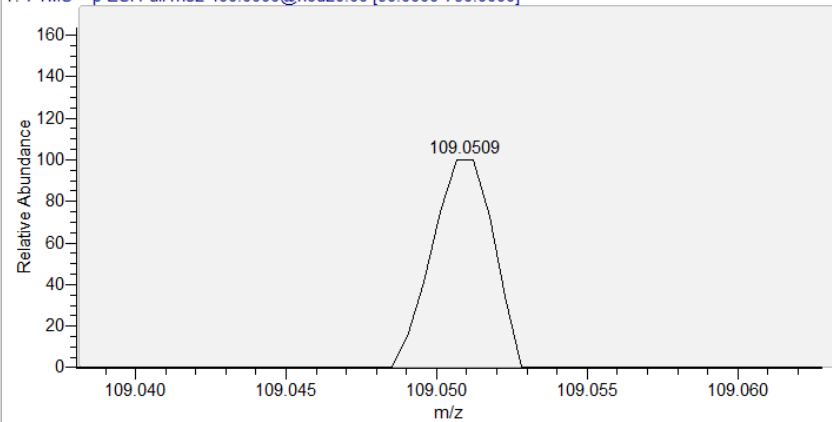
Anexo C. Comparación de espectros de masas de la adenina



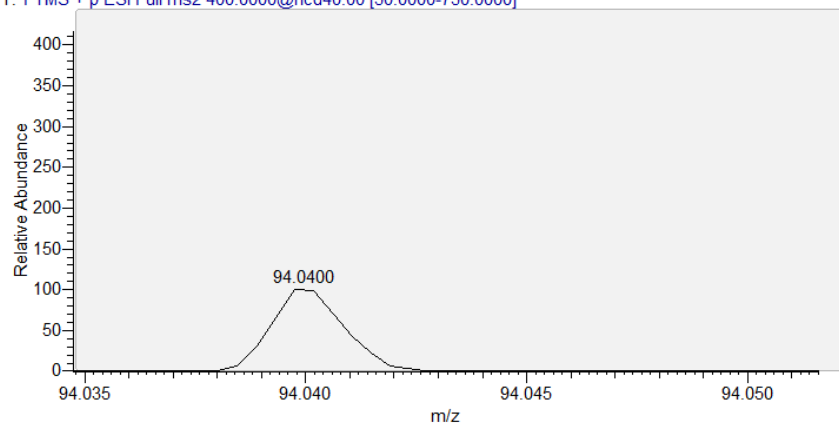
993452-54-EB RT: 2.72
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd40.00 [50.0000-750.0000]



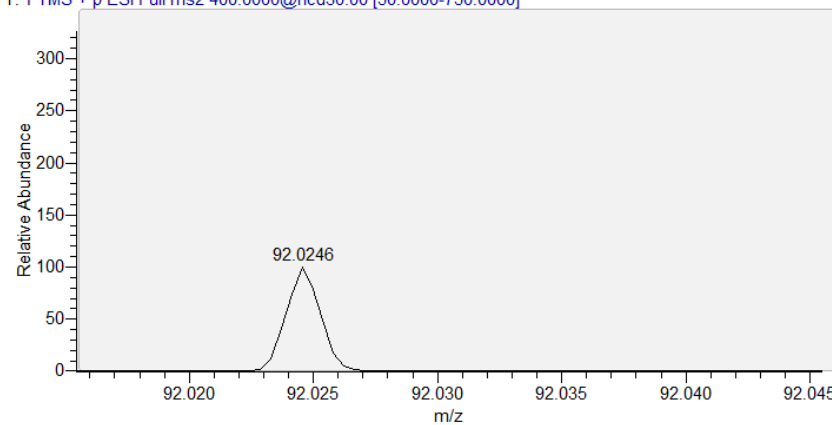
993452-54-EB RT: 2.66
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd20.00 [50.0000-750.0000]

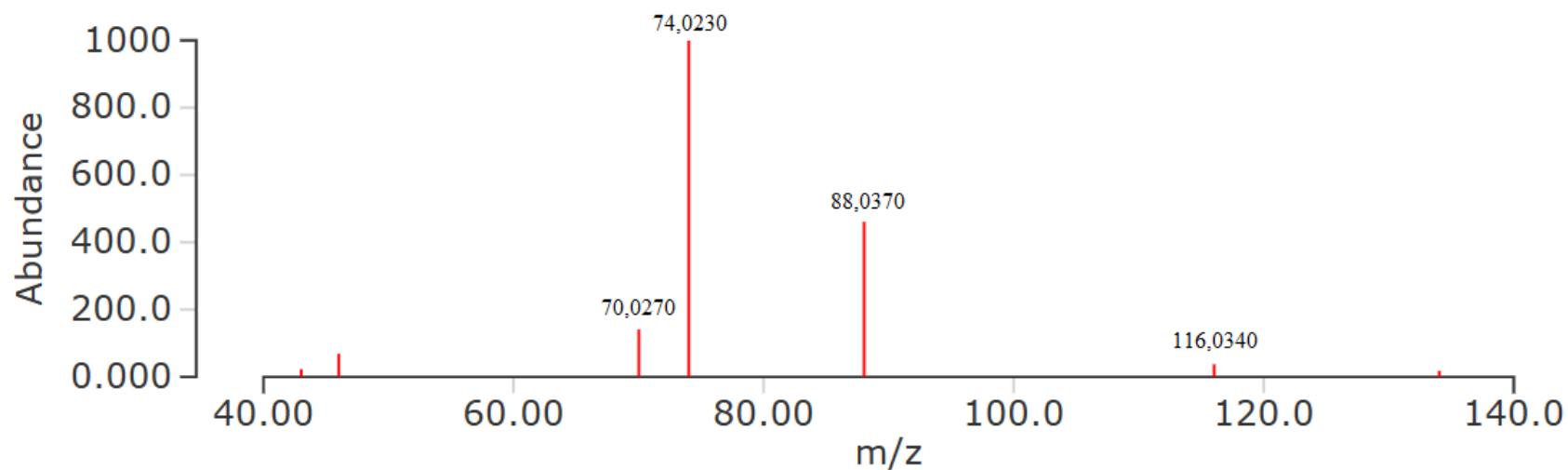


993452-54-EB RT: 2.72
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd40.00 [50.0000-750.0000]

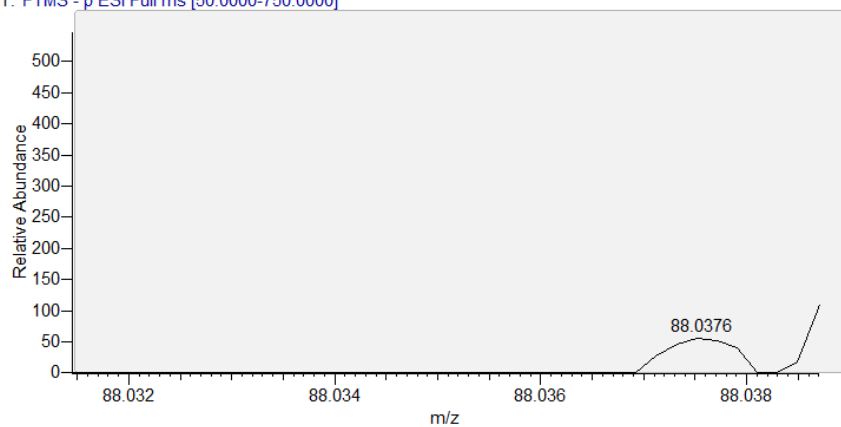


993452-54-EB RT: 2.71
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd30.00 [50.0000-750.0000]

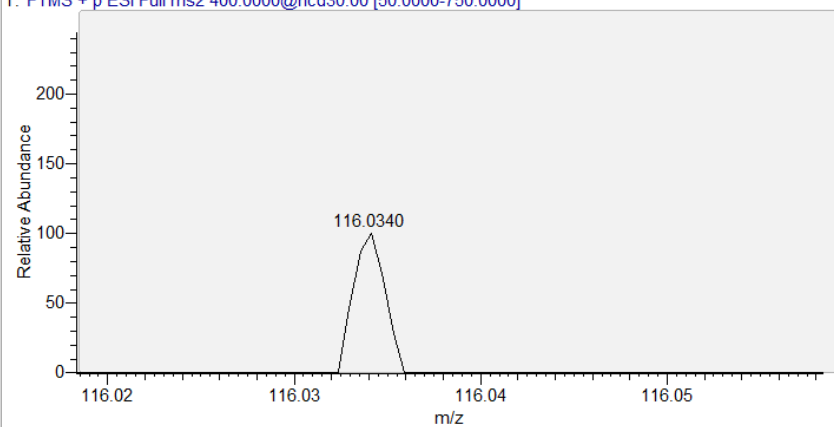


Anexo D. Comparación de espectros de masas del (L/D)-aspartato

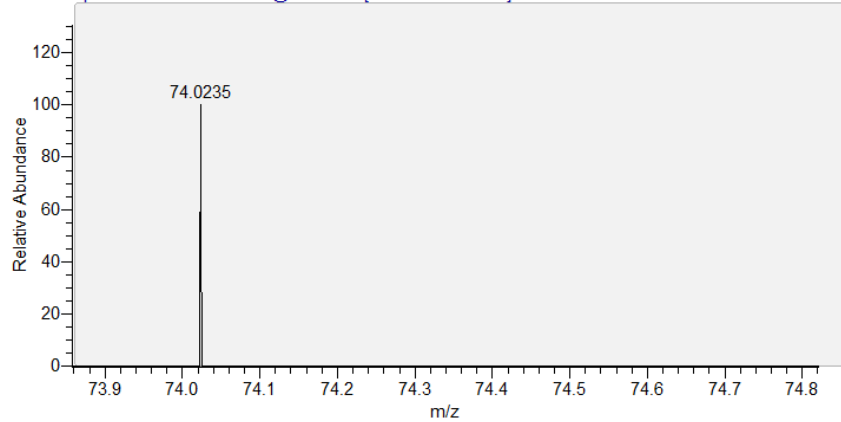
993452-45-EB RT: 2.27
T: FTMS - p ESI Full ms [50.0000-750.0000]



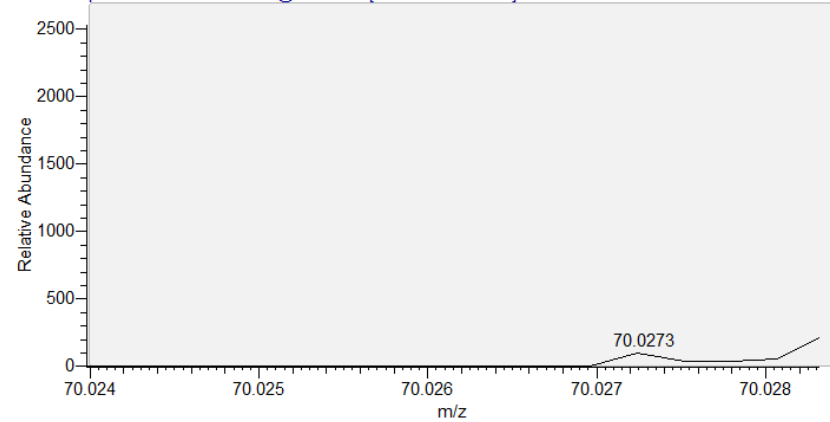
993452-45-EB RT: 2.26
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd30.00 [50.0000-750.0000]



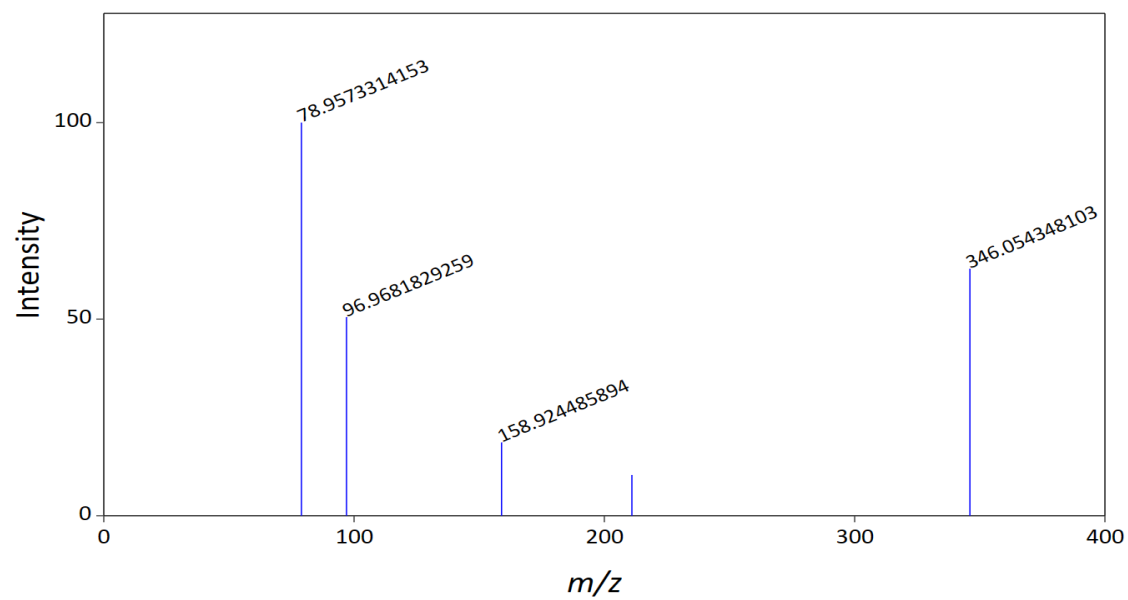
993452-45-EB RT: 2.20
T: FTMS - p ESI Full ms2 400.0000@hcd20.00 [50.0000-750.0000]



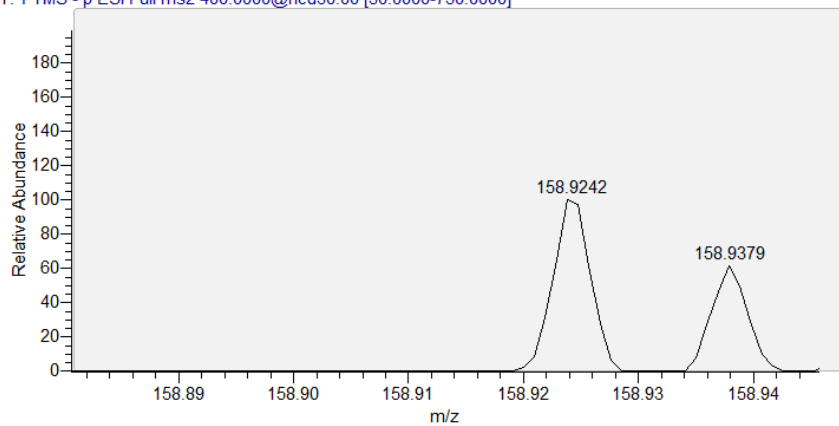
993452-45-EB RT: 2.26
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd20.00 [50.0000-750.0000]



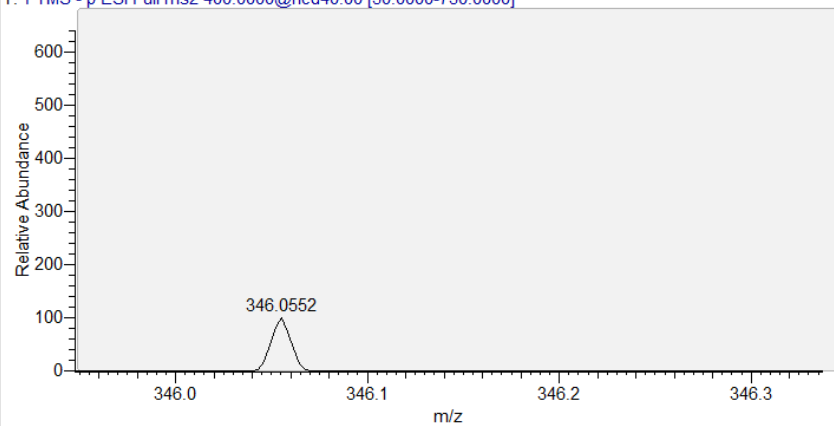
Anexo F. Comparación de espectros de masas de la ADP-ribosa



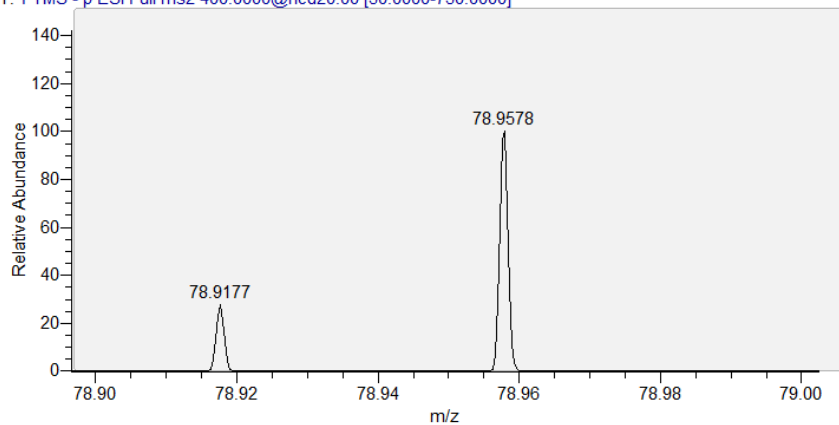
993452-54-EB RT: 2.22 NL: 3.69E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 400.0000@hcd30.00 [50.0000-750.0000]



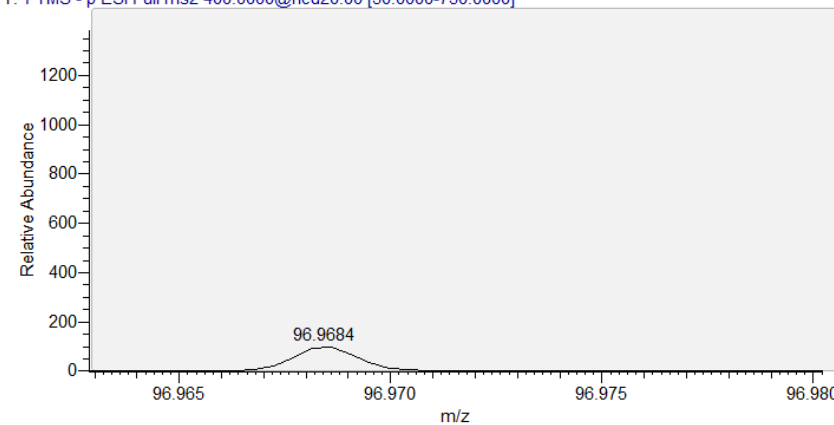
993452-54-EB RT: 2.22 NL: 5.65E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 400.0000@hcd40.00 [50.0000-750.0000]

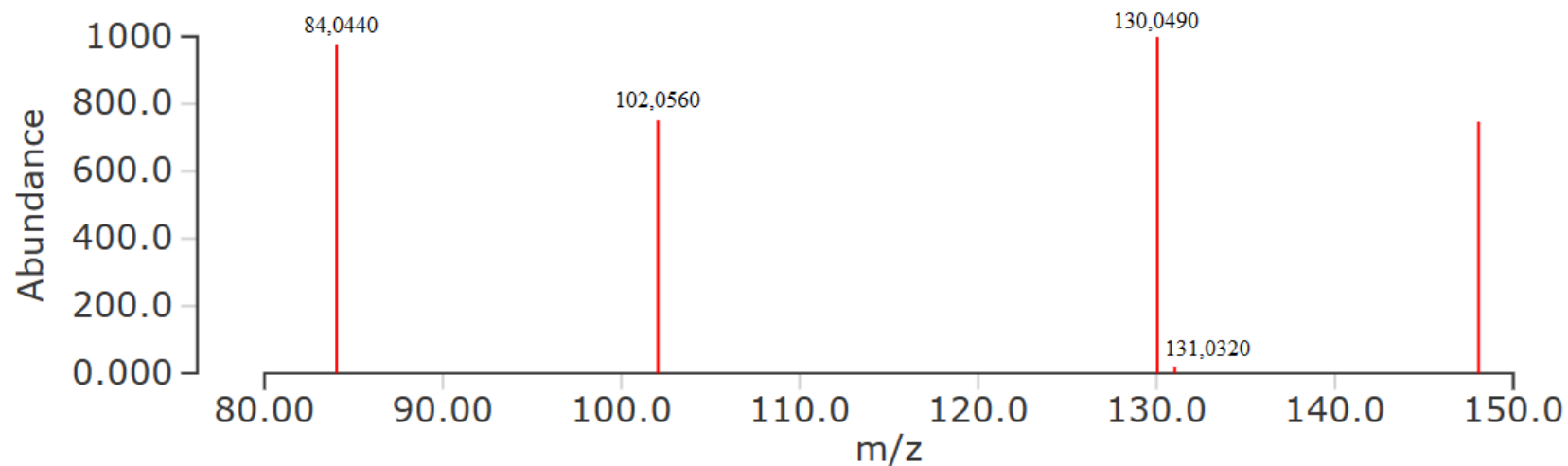


993452-54-EB RT: 2.22 NL: 1.36E5
T: FTMS - p ESI Full ms2 400.0000@hcd20.00 [50.0000-750.0000]

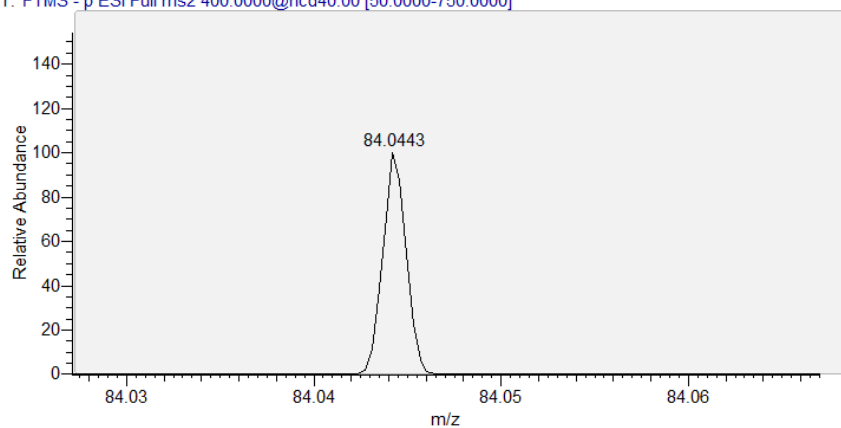


993452-54-EB RT: 2.22 NL: 1.86E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 400.0000@hcd20.00 [50.0000-750.0000]

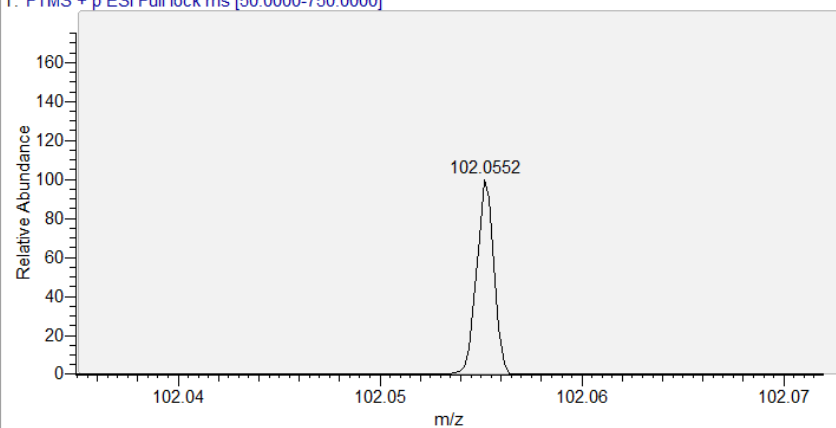


Anexo G. Comparación de espectros de masas del glutamato

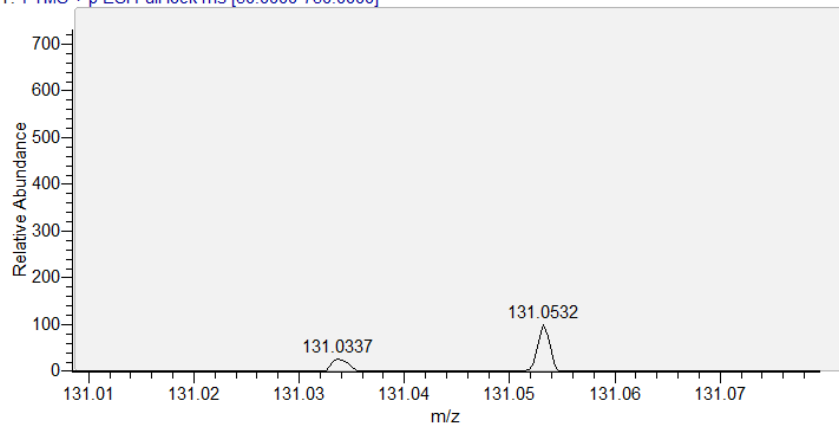
993452-54-EB RT: 0.83 NL: 9.48E4
T: FTMS - p ESI Full ms2 400.0000@hcd40.00 [50.0000-750.0000]



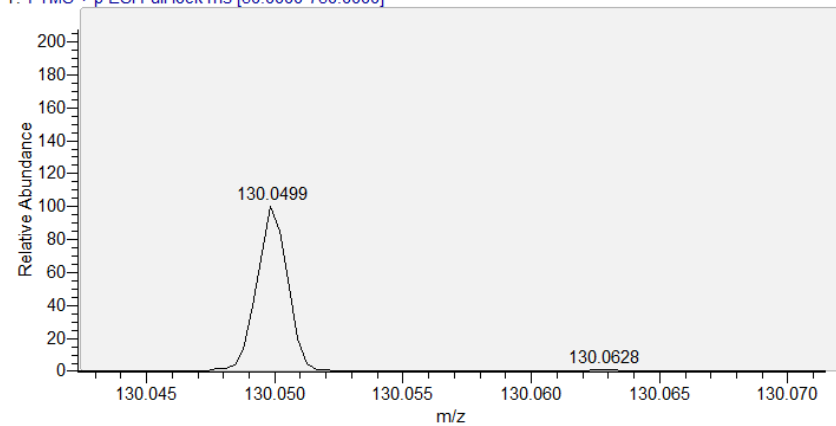
993452-54-EB RT: 0.83 NL: 1.29E6
T: FTMS + p ESI Full lock ms [50.0000-750.0000]



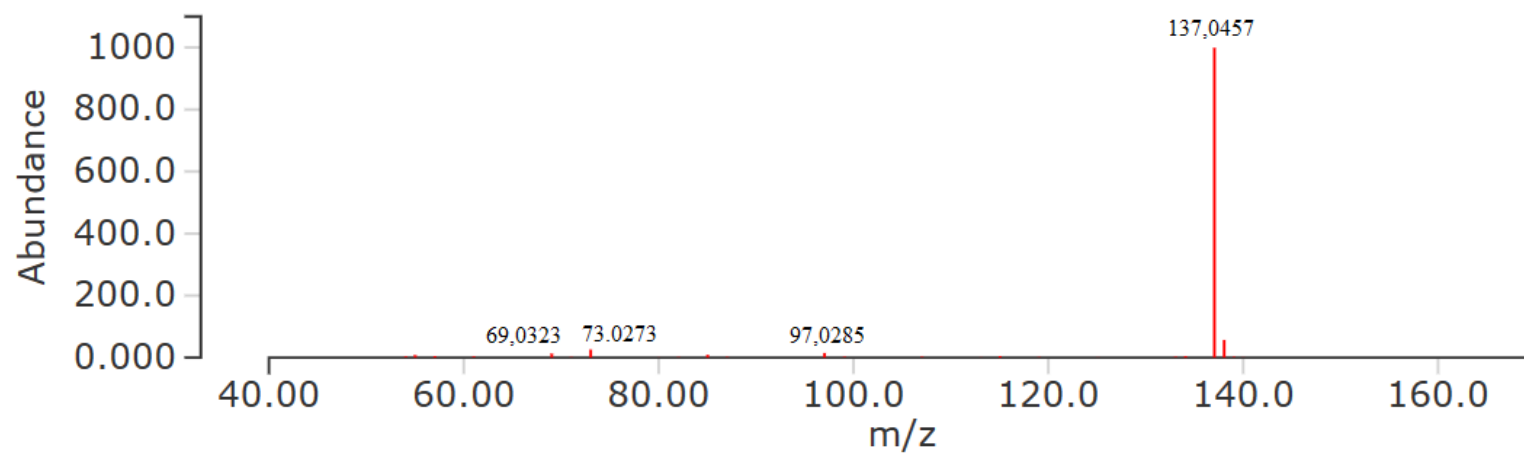
993452-54-EB RT: 0.83 NL: 2.41E5
T: FTMS + p ESI Full lock ms [50.0000-750.0000]



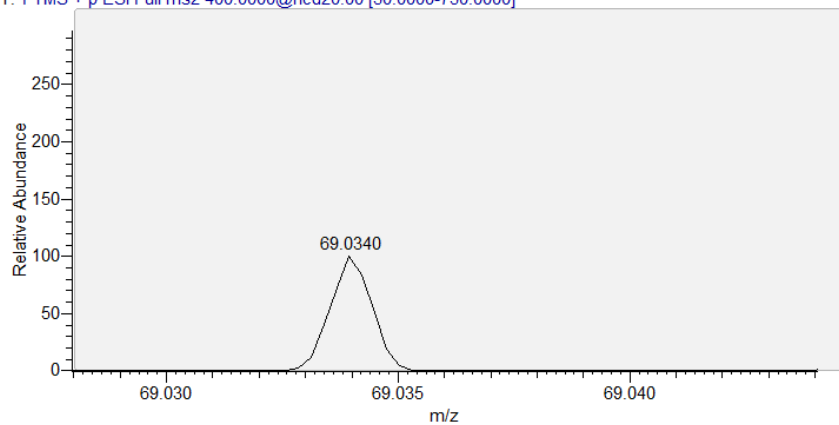
993452-54-EB RT: 0.83 NL: 4.75E6
T: FTMS + p ESI Full lock ms [50.0000-750.0000]



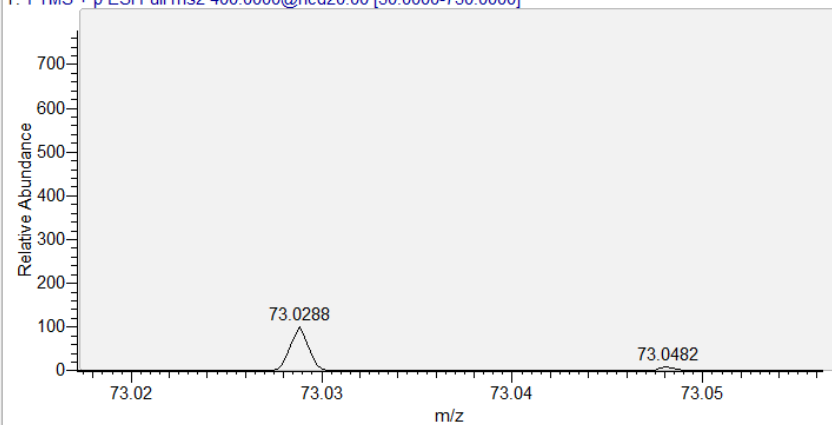
Anexo H. Comparación de espectros de masas de la inosina



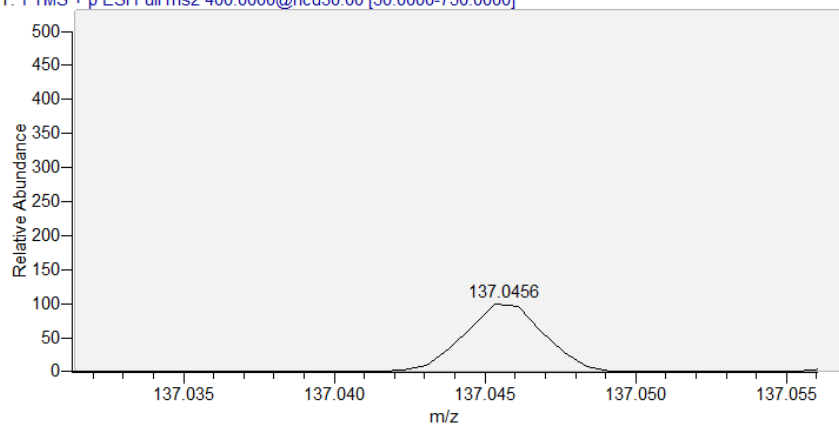
993452-54-EB RT: 2.71 NL: 1.49E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd20.00 [50.0000-750.0000]



993452-54-EB RT: 2.71 NL: 2.68E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd20.00 [50.0000-750.0000]



993452-54-EB RT: 2.71 NL: 4.28E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd30.00 [50.0000-750.0000]



993452-54-EB RT: 2.71 NL: 5.69E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 400.0000@hcd10.00 [50.0000-750.0000]

