



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE LA RESISTENCIA A
AMPICILINA EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI***

*Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniero en Biotecnología*

AUTORES:

DAVID JOHAN MOREIRA SOLÓRZANO
YURI ANDRÉS BARCO AGUILAR

TUTORES:

MSc. ANGELA PACHECO FLORES DE VALGAZ
MSc. MARÍA GABRIELA MARIDUEÑA ZAVALA

GUAYAQUIL - ECUADOR

2024

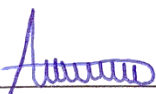
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, **David Johan Moreira Solórzano** con documento de identificación N° 2350988594 y **Yuri Andrés Barco Aguilar** con documento de identificación N° 0951159565; manifestamos que:

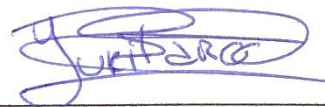
Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 19 de febrero del año 2024

Atentamente,



David Johan Moreira Solórzano
CI: 2350988594



Yuri Andrés Barco Aguilar
CI: 0951159565

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **David Johan Moreira Solórzano** con documento de identificación N° 2350988594 y **Yuri Andrés Barco Aguilar** con documento de identificación N° 0951159565, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE LA RESISTENCIA A AMPICILINA EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI***, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

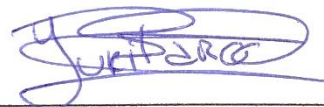
Guayaquil, 19 de febrero del año 2024

Atentamente,



David Johan Moreira Solórzano

CI: 2350988594



Yuri Andrés Barco Aguilar

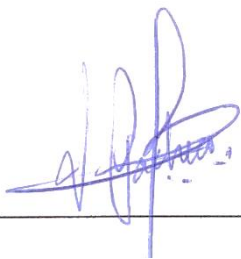
CI: 0951159565

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Ángela Pacheco Flores De Valgaz** con documento de identificación N° 0930726112, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE LA RESISTENCIA A AMPICILINA EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI***, realizado por **David Johan Moreira Solórzano** con documento de identificación N° 2350988594 y **Yuri Andrés Barco Aguilar** con documento de identificación N° 0951159565, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 19 de febrero del año 2024

Atentamente,



Ángela Pacheco Flores De Valgaz

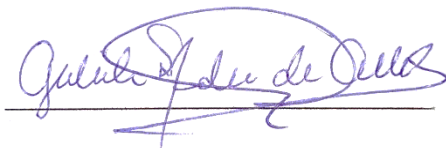
CI: 0930726112

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **María Gabriela Maridueña Zavala** con documento de identificación N° 0923210884, investigadora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **CARACTERIZACIÓN METABOLÓMICA DE LA RESISTENCIA A AMPICILINA EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI***, realizado por **David Johan Moreira Solórzano** con documento de identificación N° 2350988594 y **Yuri Andrés Barco Aguilar** con documento de identificación N° 0951159565, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 19 de febrero del año 2024

Atentamente,



María Gabriela Maridueña Zavala

CI: 0923210884

Dedicatoria David Moreira

A mi querida abuelita Eulalia, quien con amor ha contribuido a mi educación, brindándome las herramientas necesarias para alcanzar mis metas y todo su amor que ha sido mi motivación día a día. A mis entrañables abuelitos maternos Pastora y Guillermo, cuyo deseo sincero siempre ha sido verme triunfar.

Queridos padres, mamá Mónica y papá Leonel

A lo largo de mi trayectoria universitaria, su amor incondicional y apoyo inquebrantable han sido mi mayor fortaleza. Mamá, tu constante respaldo y cariño han sido mi luz en los momentos más oscuros, y papá, tus sabios consejos y protección han sido mi guía en este camino.

A Gaby Maridueña, quien no solo nos ha acogido con cariño desde el principio, sino que también nos ha inspirado y motivado a aprovechar las innumerables oportunidades que la carrera nos ofrece.

Yuri, compañero de tesis y amigo, has sido más que un compañero de estudio, te has convertido en un pilar fundamental en mi vida. Gracias por tu amistad incondicional, tus consejos y por compartir cada paso de este viaje académico conmigo. Eres parte de mi familia y siempre lo serás.

A mis amigos cercanos, quienes con su apoyo inquebrantable me han impulsado a seguir adelante en los momentos más difíciles.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento. Esta tesis es el fruto de su amor, apoyo y guía, y dedico este logro a cada uno de ustedes con todo mi corazón.

Dedicatoria Yuri Barco

Dedico esta tesis a mis seres más queridos, quienes han sido pilares fundamentales en mi camino académico y personal:

A mi mamá, Yesenia, cuyo incansable esfuerzo y sacrificio han hecho posible mi educación universitaria. Su apoyo incondicional y dedicación son invaluableles.

A mi papá, Yuri, por su constante preocupación y sabios consejos que han guiado mis pasos en este camino.

A mi abuelita Eva, mi eterna compañera de vida, quien ha sido como una segunda madre para mí desde el día en que nací. Su amor y apoyo han sido mi fortaleza.

A mi compañero de tesis, David, quien ha sido más que un colega; ha sido mi motivación, mi consejero y mi amigo. Juntos hemos superado desafíos y alcanzados metas.

A Gaby, nuestra cotutora, quien desde el principio creyó en nosotros y nos guió con sabiduría y paciencia.

A la familia de David, por su cálida acogida y constante estímulo, que me han llenado de fuerzas para seguir adelante. Y a la abuelita de David Eulalia, quien me ha brindado su cariño y apoyo incondicional.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento por ser mi fuente de inspiración y por estar siempre presentes en cada paso de este camino. Esta tesis es también un tributo a su amor y apoyo incondicional. ¡Gracias por ser mi motivación constante!

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana por dar paso a la realización de este proceso de integración curricular y brindarnos el apoyo durante el tiempo de su realización

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador de la Escuela Superior Politécnica del Litoral por financiar este trabajo de investigación y a su personal por darnos soporte y conocimiento para su ejecución.

A nuestra tutora Angela Pacheco, por tenernos en cuenta desde el principio para este gran proyecto y luego seguir con nosotros dándonos su soporte, su guía, sus recomendaciones para ir puliendo este trabajo de investigación.

A nuestra co-tutora Gabriela Maridueña que desde el principio nos acogió en el CIBE, nos brindó sus conocimientos, su comprensión, nos tuvo paciencia y la confianza de asignarnos este importante proyecto para que se desarrolle.

A los analistas del CIBE Maria José Acuña e Iván Choez que brindaron parte de su tiempo a nosotros para ayudarnos con las dudas y procedimientos que no estaban claros en la metodología del proyecto.

Resumen

En la actualidad la resistencia a antibióticos se ha ido presentando con más frecuencia en bacterias que han logrado adaptarse a situaciones de exposición a antimicrobianos, como lo es el caso de *E. coli*, siendo la causa más común el uso excesivo de antibióticos en humanos, en animales y la automedicación. En este estudio se determinó la concentración de inhibición media IC₅₀ de Ampicilina en 86 cepas de *E. Coli*, depositadas en la Colección de Cultivos Microbianos CIBE, en las que cepas con características sensibles y resistentes a Ampicilina fueron caracterizadas en base a sus perfiles metabólicos usando GC-MS. La concentración de inhibición media IC₅₀ medida en el espectrofotómetro a 630nm , identificó un 33,80% de cepas sensibles a concentraciones de <100 µg/ml mientras que el 66,20% de cepas se consideraron resistentes a concentraciones entre 100 µg/ml y 4000 µg/ml de Ampicilina. Para la identificación de metabolitos se utilizaron muestras con perfiles susceptibles y con perfiles resistentes con valores de IC₅₀ más relevantes asociándolos a grupos. En la extracción de metabolitos se identificaron los mismos de acuerdo con los tiempos de retención de las muestras corridas en el equipo. Para los perfiles de cepas sensibles se observaron 155 y 205 picos en los cromatogramas, para las cepas resistentes se observaron 161 y 221 picos, utilizando XLSTAT (2024) se obtuvo el análisis de componentes principales, el software MetaboAnalyst 6.0 permitió determinar los metabolitos con mayor significancia. Para los perfiles resistentes se encontraron mayor significancia en 3 metabolitos, mientras que para los perfiles susceptibles se encontraron 10 metabolitos significantes trabajando a un $p < 0.05$. El análisis en “FoldChange” nos permitió extraer 13 metabolitos de las cepas sensibles y 15 metabolitos de las cepas resistentes entre los compuestos obtenidos encontramos ácidos grasos, alcanos, aminoácidos y otros más, que tuvieron mayor diferencia con el grupo control.

Palabras clave: Resistencia; Antibiótico; *E. coli*; Ampicilina; Metabolitos.

Abstract

Currently, antibiotic resistance has become more prevalent in bacteria that have adapted to antimicrobial exposure situations, as exemplified by *E. coli*. The most common cause of this phenomenon is the excessive use of antibiotics in humans, animals, and self-medication. In this study, the IC₅₀ of Ampicillin was determined in 86 strains of *E. coli* deposited in the Microbial Culture Collection CIBE. Strains exhibiting both susceptible and resistant characteristics to Ampicillin were characterized based on their metabolic profiles using GC-MS. The IC₅₀ concentration, measured spectrophotometrically at 630nm, identified 33.80% of strains as susceptible at concentrations below 100 µg/ml, while 66.20% of strains were considered resistant at concentrations ranging from 100 µg/ml to 4000 µg/ml of Ampicillin. Metabolite identification was conducted on samples with susceptible and resistant profiles with the most relevant IC₅₀ values, associating them with groups. Metabolites were extracted and identified based on the retention times of the samples run on the equipment. For susceptible strain profiles, 155 and 205 peaks were observed in the chromatograms, whereas for resistant strains, 161 and 221 peaks were observed. Principal Component Analysis was performed using XLSTAT (2024), and MetaboAnalyst 6.0 software facilitated the determination of metabolites with higher significance. In resistant profiles, three metabolites exhibited greater significance, while susceptible profiles revealed 10 significant metabolites at a significance level of $p < 0.05$. The "FoldChange" analysis allowed the extraction of 13 metabolites from susceptible strains and 15 metabolites from resistant strains. Among the compounds obtained, fatty acids, alkanes, amino acids, and others showed greater differences from the control group. This comprehensive analysis sheds light on the metabolic intricacies associated with Ampicillin resistance in *E. coli* strains, paving the way for potential therapeutic interventions.

Keywords: Resistance; Antibiotic; *E. coli*; Ampicillin; Metabolites.

Índice de Contenido

| | |
|---|----------|
| Capítulo 1 | 1 |
| Antecedentes | 1 |
| 1.1. Introducción | 1 |
| 1.2. Planteamiento del problema | 2 |
| 1.3. Justificación..... | 3 |
| 1.4. Objetivos | 4 |
| 1.4.1. Objetivo General | 4 |
| 1.4.2. Objetivos Específicos | 4 |
| Capítulo 2 | 5 |
| Marco Teórico | 5 |
| 2.1. Escherichia coli | 5 |
| 2.1.1. Características generales <i>E. coli</i> | 5 |
| 2.2. Antibióticos y mecanismos | 6 |
| 2.2.1. Antibióticos β -lactámicos..... | 7 |
| 2.3. Resistencia a antibióticos | 8 |
| 2.3.1. Desarrollo de resistencia a antibióticos | 8 |
| 2.3.2. Causas de la crisis de resistencia..... | 9 |
| 2.3.3. Tipos de resistencia antibióticos | 10 |
| 2.4. Mecanismos de resistencia en <i>E. coli</i> a los β -lactámicos | 10 |
| 2.4.1. Metabolitos asociados a la resistencia de <i>E. coli</i> | 11 |
| 2.4.2. Respuesta metabólica de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> | 11 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5. Metabolómica..... | 12 |
| 2.5.1 Métodos experimentales en la caracterización metabolómica: | 14 |
| 2.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS):... | 15 |
| 2.5.3. Concentración inhibidora media máxima (IC ₅₀) | 16 |
| Capítulo 3..... | 17 |
| Materiales y Métodos | 17 |
| 3.1. Obtención de la muestra | 19 |
| 3.2. Determinación de la IC ₅₀ | 20 |
| 3.3. Extracción de metabolitos | 22 |
| 3.4. GC/MS | 23 |
| 3.5. Procesamiento de datos | 24 |
| Capítulo 4..... | 25 |
| Resultados y Discusiones | 25 |
| 4.1. Mediciones del IC ₅₀ | 25 |
| 4.2. Perfil de metabolitos..... | 28 |
| 4.2.1. Perfil de metabolitos de cepas sensibles | 28 |
| 4.2.2. Perfil de metabolitos de cepas resistentes | 30 |
| Capítulo 5..... | 39 |
| Conclusiones y Recomendaciones | 39 |
| 5.1. Conclusiones | 39 |
| 5.2. Recomendaciones..... | 39 |
| Referencias Bibliográficas | 41 |
| Anexos..... | 52 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| CCM | Colección de Cultivos Microbianos |
| CIBE | Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia Coli</i> |
| GC-MS | Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas |
| IC ₅₀ | Concentración de inhibición media |
| MSP | Ministerio de Salud Pública del Ecuador |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| RAM | Resistencia Antimicrobiana |
| SM | Solución Madre de Ampicilina |
| SC | Solución concentrada de Ampicilina |
| S1 | Solución 1 de Ampicilina |
| S3 | Solución 3 de Ampicilina |
| PCA | Análisis de componentes principales |
| CDC | Centros para el Control y Prevención de Enfermedades |

Simbología

°C grados Celsius

μg microgramo

h hora

g gramo

ml mililitro

nm Nanómetro

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. <i>Estructura de E. coli</i> | 5 |
| Figura 2. <i>Mecanismo de acción de los antibióticos</i> | 7 |
| Figura 3. <i>Reservorios de E. coli resistente a los antibióticos y su interacción con los humanos.</i> | 9 |
| Figura 4. <i>Mecanismos generales de resistencia a los antibióticos</i> | 10 |
| Figura 5. <i>Modelo esquemático de la respuesta metabólica de resistencia a los antibióticos</i> | 12 |
| Figura 6. <i>Metabolómica en el estudio del metabolismo bacteriano</i> | 13 |
| Figura 7. <i>Respuesta del metaboloma de E. coli en exposición a ampicilina</i> | 14 |
| Figura 8. <i>Flujo de trabajo para análisis metabolómico basado en espectrometría de masas</i> | 15 |
| Figura 9. <i>Esquema metodológico</i> | 18 |
| Figura 10. <i>Diseño de placa para IC₅₀</i> | 21 |
| Figura 11. <i>Frecuencia porcentual de los valores de IC₅₀ observados desde 0 a 4000 ug/ml</i> | 28 |
| Figura 12. <i>Cromatograma de cepa sensible CCM-B1207</i> | 30 |
| Figura 13. <i>Cromatograma de cepa resistente CCM-B1132</i> | 31 |
| Figura 14. <i>Diagrama de mapas de calor con los 25 metabolitos con más representación</i> | 32 |
| Figura 15. <i>Gráfico de puntuación de PCA (A) y carga (B) de metabolitos de cepas sensibles a ampicilina</i> | 33 |

Figura 16. *Gráfico de puntuación de PCA (A) y carga (B) de metabolitos de cepas resistentes a ampicilina* 34

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica de E. Coli</i> | 6 |
| Tabla 2. <i>Modos de acción y mecanismos de resistencia a antibióticos β-lactámicos</i> ... 8 | 8 |
| Tabla 3. <i>Listado de cepas de E. coli crio-conservadas en la colección de cultivos microbianos CIBE</i> | 19 |
| Tabla 4. <i>Concentraciones de ampicilina en base a los resultados obtenidos del IC₅₀ de las cepas evaluadas.</i> | 21 |
| Tabla 5. <i>Clasificación de las cepas evaluadas en 24 grupos en base a la determinación del IC₅₀</i> | 26 |
| Tabla 6. <i>Principales metabolitos que mostraron diferencia significativa entre cepas control y antibiótico</i> | 35 |

Índice de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1. <i>Equipos empleados en el proceso experimental de extracción de metabolitos e IC₅₀</i> | 52 |
| Anexo 2. <i>Reactivos empleados en el proceso experimental de extracción de metabolitos</i> | 53 |
| Anexo 3. <i>Medios de cultivos utilizados para reactivación y cultivo de cepas</i> | 53 |
| Anexo 4. <i>Soluciones utilizadas en el proceso experimental de extracción de metabolitos</i> | 53 |
| Anexo 5. <i>Concentraciones de ampicilina usadas en cada cepa</i> | 54 |
| Anexo 6. <i>Metabolitos más significantes de cepas sensibles a partir de T-Test con un p<0.05</i> | 55 |
| Anexo 7. <i>Metabolitos más significantes de cepas resistentes a partir de T-Test con un p<0.05</i> | 56 |

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Introducción

En la actualidad, la resistencia a los antibióticos protagoniza un gran desafío en la salud mundial. Se estima que para 2050 podrían ocurrir 10 millones de muertes debido al problema de la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2014). Las principales causas de la resistencia antimicrobiana (RAM) son el uso excesivo de antibióticos en animales de consumo humano y el mal empleo sin receta médica, empeorado por la excreción de antibióticos sin metabolizar (Van Boeckel et al., 2015).

Entre las décadas de los 50s y 60s, se descubrió que bacterias de la familia Enterobacteriaceae presentaban resistencia a antibióticos como la ampicilina, causando numerosos decesos y pérdidas económicas. En la década de los 70s, se observó resistencia a la ampicilina en otros microorganismos patógenos (Rossolini et al., 2014). Al presente, cerca del 20% de las cepas de *E. Coli* aisladas en el mundo presentan resistencia a los medicamentos antimicrobianos de primera línea como la ampicilina (OMS, 2022). En Ecuador, en zonas rurales existe una prevalencia del 81.75% de resistencia a la ampicilina en *E. Coli*, lo que ha llevado al MSP a catalogarlo como microorganismo multirresistente (Ross et al., 2020).

Uno de los principales mecanismos de resistencia más importantes que tiene *E. coli* es la producción de enzimas β -lactamasas (Galindo-Méndez, 2020). Estas enzimas son capaces de fraccionar el anillo β -lactámico, principal estructura de los antibióticos β -lactámicos, produciendo la inactivación de esta molécula (Basavaraju & Gunashree, 2022).

La metabolómica es una disciplina que estudia el metaboloma, con el propósito de identificar y cuantificar metabolitos, utilizando técnicas analíticas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Fiehn, 2016). La GC-MS se define como

la técnica estándar para medir los compuestos orgánicos volátiles del metaboloma (Diez-Simon et al., 2019). El metaboloma se encuentra relacionado con el fenotipo de un organismo y revela respuestas iniciales a la presión antibiótica y adaptaciones esenciales para preservar mecanismos de RAM. Los enfoques metabolómicos sirven como herramientas fundamentales para identificar conexiones entre mecanismos de RAM y el metabolismo microbiano (Kok et al., 2022). Microorganismos como *E. Coli*, son capaces de producir una gran variedad de compuestos orgánicos volátiles que pueden estudiarse por medio de técnicas como la GC-MS (Elmassry & Piechulla, 2020).

1.2. Planteamiento del problema

La resistencia a los antibióticos figura como una amenaza para la salud humana como para la salud animal (OMS, 2020). Las infecciones por *E. coli* son cada vez más frecuentes. Esto implica que aumento de complicaciones médicas por infección y que *E. coli* desarrolle mecanismos de resistencia como la producción de β -lactamasas, disminuyendo así la efectividad de los antibióticos en los microorganismos (Coral et al., 2021).

La búsqueda de nuevos métodos para enfrentar la RAM se basa en el entendimiento de esta por medio de ciencias como la metabolómica (Fortuin & Soares, 2022). En el presente trabajo se plantea presentar la respuesta de cambios metabólicos a nivel intracelular de cepas de *E. coli* obtenidas de estudios de caracterización realizados a nivel nacional, este aporte permitirá la continuidad de la investigación, caracterización y el desarrollo de métodos de control de la resistencia de *E. coli*, contribuyendo al conocimiento de la resistencia a nivel metabolómico que en ocasiones limita el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas, impidiendo el progreso en investigaciones para la cura de las infecciones bacterianas (Kok et al., 2022).

1.3. Justificación

El estudio y seguimiento a la resistencia a los antibióticos contribuyen con una base de información para el descubrimiento de nuevos fármacos que contrarresten las infecciones de bacterias resistentes (Aminov, 2022). Por eso, el estudio del metaboloma da como resultado una poderosa herramienta para comprender los cambios ocurridos en el perfil metabólico (Carrera-Garcés et al., 2021). De modo que, el contribuir a la caracterización de los mecanismos de resistencia de las cepas de *E. Coli* frente a ampicilina e identificar metabolitos que tienen mayor incidencia en la resistencia para determinar estos cambios a nivel de metabolismo aportará a futuras investigaciones y soluciones.

Por otro lado, las colecciones de cultivos microbianos son repositorios de gran valor científico que albergan una amplia diversidad de microorganismos. Estos recursos son fundamentales para el desarrollo de investigaciones en diversas áreas, incluyendo la microbiología, la biomedicina, la biotecnología y la agricultura. En este caso será un gran recurso para el estudio de perfiles de metabolitos de cepas de *E. coli*. Este proyecto de tesis se lo realiza en colaboración con el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) del cual se empleó su colección de cepas de *E. coli* depositadas en su cepario llamado Colección de cultivo microbianos CCM-CIBE.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Caracterizar la composición metabólica de la resistencia a la ampicilina en cepas de *Escherichia coli*.

1.4.2. Objetivos Específicos

Determinar la concentración de inhibición media (IC₅₀) de la ampicilina en cepas de *E. coli* de la colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE).

Identificar los metabolitos asociados a la resistencia de ampicilina mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de las cepas que mostraron mayor resistencia y susceptibilidad a 6 y 12 horas.

Capítulo 2

Marco Teórico

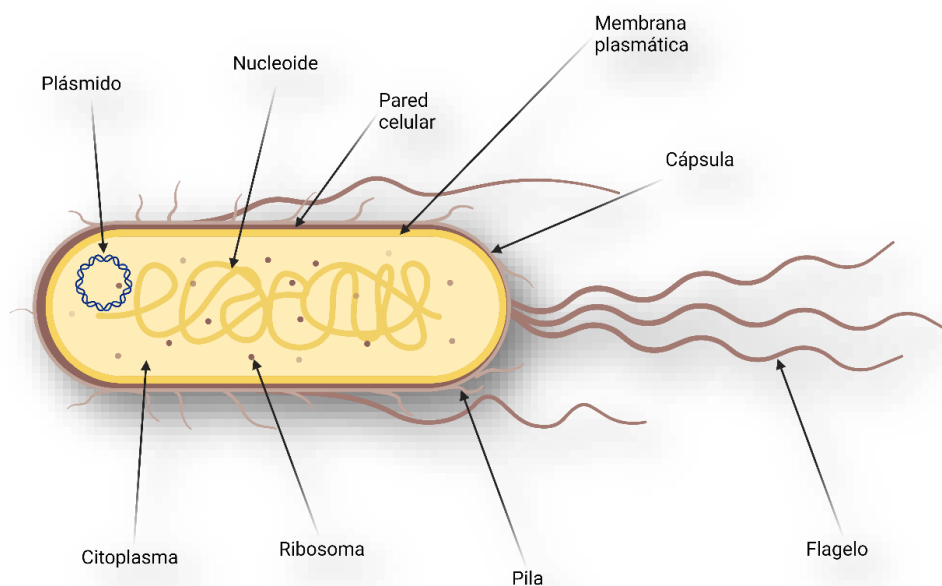
2.1. Escherichia coli

E. coli es una bacteria tipo bacilo gramnegativo que está presente en la flora intestinal. No obstante, puede ser causa de enfermedades gastrointestinales que afectan a los seres humanos (Estrada-Garcia & Tarr, 2023).

2.1.1. Características generales *E. coli*

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, *E. coli* tiene una capa fina de pared celular de peptidoglicano como se observa en la **Figura 1**, es anaerobia facultativa en forma de bastón con un metabolismo fermentativo y respiratorio. Posee un tamaño de 1,1 a 1,5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo (Yang & Wang, 2014).

Figura 1. Estructura de *E. coli*



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores. Adaptada de Basavaraju et al., (2022).

La bacteria de *E. coli* tiene una gran velocidad de crecimiento de 18 a 72 horas, con una temperatura óptima de 37 °C, suelen ser móviles por su disposición flagelar y en pocos casos son inmóviles. En condiciones de laboratorio se puede cultivar y reproducir en tan solo 20 minutos (Basavaraju et al., 2022).

2.1.2. Taxonomía de *E. coli*

En la **Tabla 1**, se ilustra la clasificación taxonómica de *E. coli*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *E. Coli*

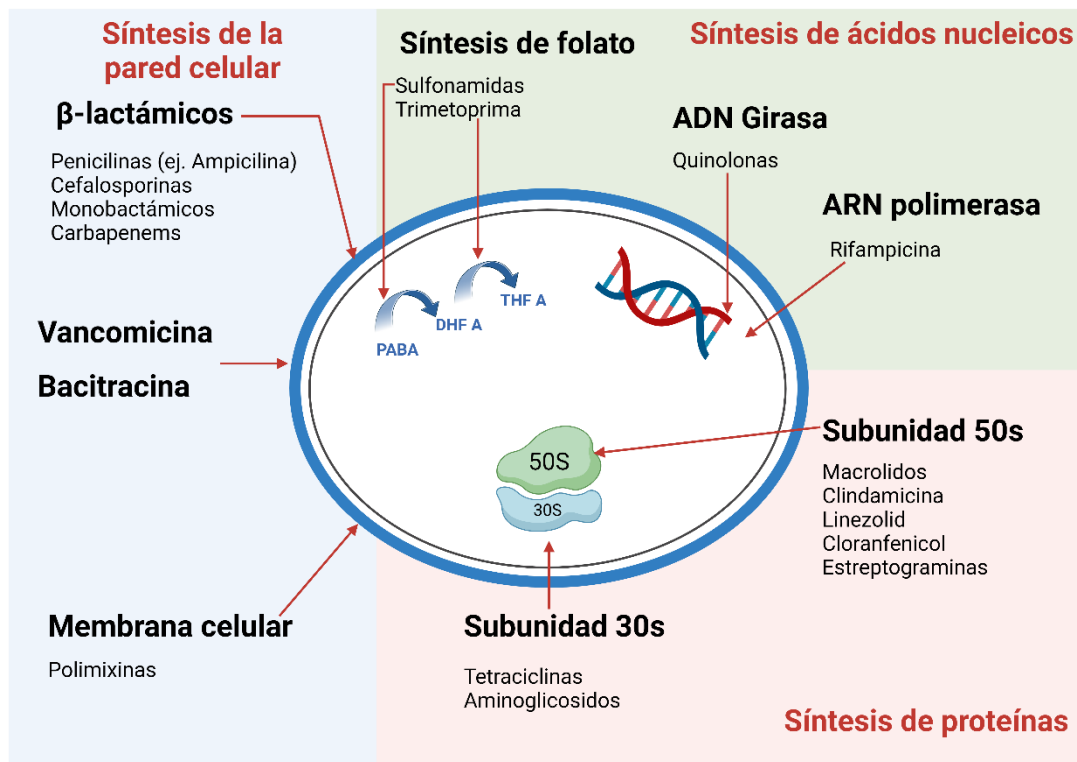
| | |
|---------|-------------------------|
| Dominio | Bacterias |
| Reino | Bacterias |
| Filo | Proteobacterias |
| Clase | Proteobacterias gamma |
| Orden | Enterobacterales |
| Familia | Enterobacterias |
| Género | Escherichia |
| Especie | <i>Escherichia coli</i> |

Nota. Tomado de Basavaraju & Gunashree, (2022).

2.2. Antibióticos y mecanismos

Los antibióticos son medicamentos de origen natural o sintéticos usados con el fin de tratar infecciones de origen bacteriano, fueron introducidos en la década de los 40s y han permitido disminuir riesgos asociados a infecciones bacterianas (Upmanyu & Malviya, 2020). Los principales mecanismos de acción de los antibióticos como se observa en la **Figura 2** son la síntesis de la pared celular, síntesis de ácidos nucleicos y la síntesis proteica.

Figura 2. Mecanismo de acción de los antibióticos



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores. Adaptada de Kapoor et al., (2017)

2.2.1. Antibióticos β-lactámicos

Los antibióticos β-lactámicos son los agentes antimicrobianos más usados a nivel mundial (Mora-Ochomogo & Lohans, 2021). En la **Tabla 2** se ilustra algunos β-lactámicos que incluyen a las penicilinas, cefalosporinas, penem y monobactámicos.

Su mecanismo de acción se basa en la unión covalente e inhibición de las proteínas fijadoras de penicilina, estas proteínas son necesarias para la reticulación de la capa de peptidoglicano, al accionar este mecanismo se hidrolizan los enlaces cruzados de peptidoglicano provocando degradación de la pared celular (Sykes & Papich, 2014).

Tabla 2. *Modos de acción y mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos*

| Ejemplo | Objetivo | Resistencia |
|-----------------------------|-----------------|---------------------|
| Penicilinas (ampicilina) | | |
| Cefalosporinas (cefamicina) | Biosíntesis de | Hidrólisis, eflujo, |
| Penems (meropenem) | peptidoglicanos | objetivo alterado. |
| Monobactámicos (aztreonam) | | |

Nota. Tomado de Morar & Wright, (2010).

2.2.1.1. Ampicilina

Es un antibiótico derivado de la penicilina, perteneciente a la familia de los β -lactámicos y actúa contra cocos grampositivos, gram positivos anaerobios y algunos gramnegativos anaerobios como *E. coli* (Castle, 2007). Actúa como inhibidor de las β -lactamasas, causando interferencia con la síntesis de la pared celular mediante la unión de proteínas fijadoras de penicilina e inhibiendo la síntesis de peptidoglicanos (Cho et al., 2014).

2.3. Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos sucede cuando el microorganismo, como las bacterias, desarrollan la capacidad de inmunidad o de vencer el efecto de los medicamentos diseñados para matarlos. Por ello, las infecciones de bacterias resistentes son difíciles de tratar (CDC, 2022). Las bacterias pueden llegar a neutralizar a un antibiótico alterando su composición para hacerlo ineficiente, o expulsar el medicamento fuera de la célula y hasta modificar su estructura del cuerpo para defenderse (Habboush & Guzman, 2023).

2.3.1. Desarrollo de resistencia a antibióticos

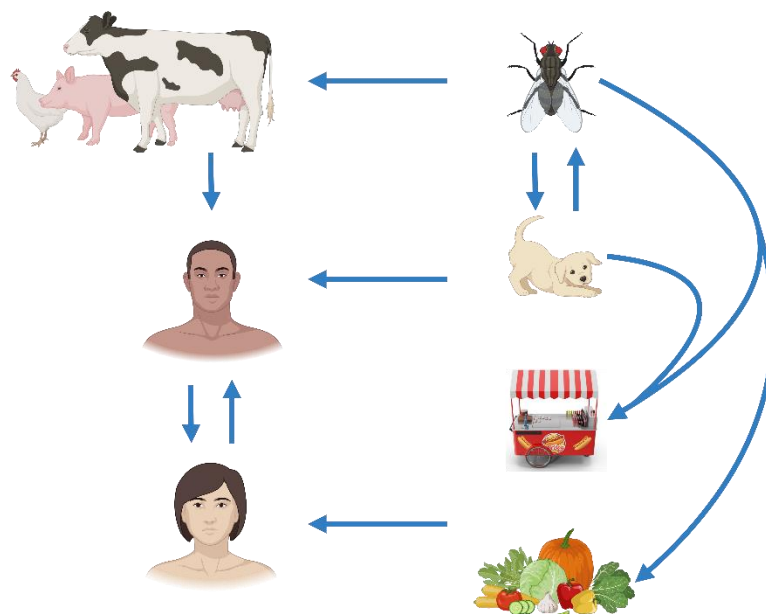
Las bacterias una vez tienen contacto con los antibióticos pueden desarrollar algunas estrategias de defensa llamadas mecanismos de resistencia. En donde el ADN de la bacteria

expresa proteínas para su defensa y a la vez esto genera rasgos de resistencia que pueden propagarse a otras bacterias (CDC, 2022).

2.3.2. Causas de la crisis de resistencia

Los factores que contribuyen a la RAM son el uso excesivo de antibióticos, automedicación, uso extensivo de antibióticos en el área agrícola y poca aparición de nuevas medicinas antimicrobianas (Ventola, 2015). La resistencia antibiótica no solo se limita al uso humano, ganadero o clínico, también proviene de determinantes intrínsecos en bacterias comensales y ambientales. Como se ilustra en la **Figura 3** los reservorios de *E. Coli* y la interacción que tiene con los humanos. Otros determinantes como la impermeabilidad de su membrana o la expresión de bombas de eflujo brindan ventajas selectivas, dando una resistencia intrínseca (Galindo-Méndez, 2020).

Figura 3. Reservorios de *E. coli* resistente a los antibióticos y su interacción con los humanos.

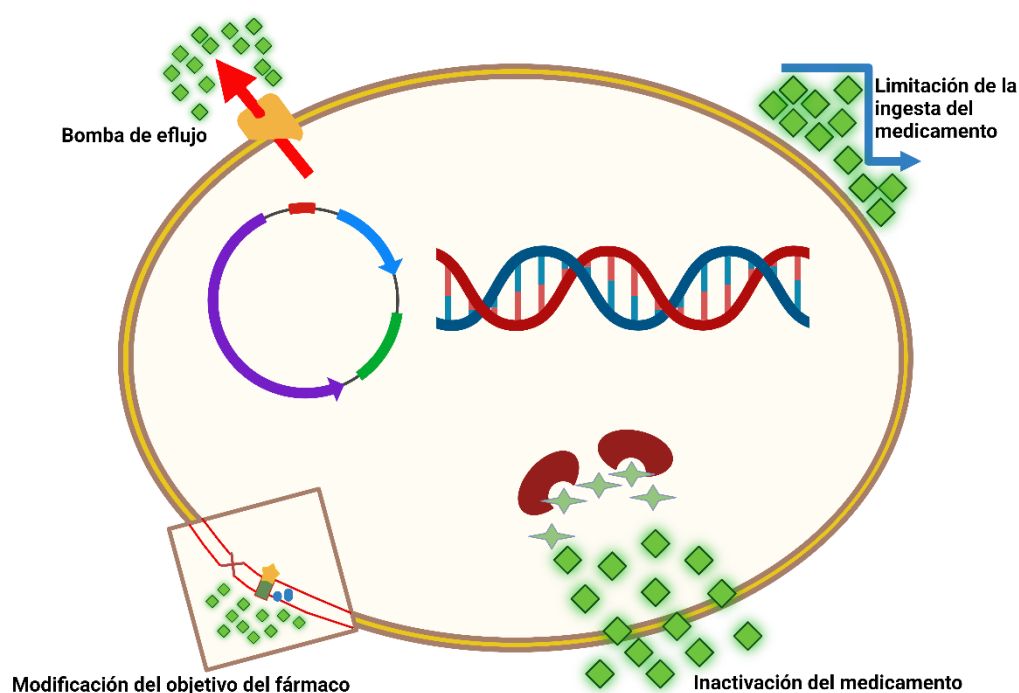


Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores. Adaptada de Galindo-Méndez, (2020).

2.3.3. Tipos de resistencia antibióticos

Los diferentes tipos de RAM están divididos en cuatro categorías como se ilustra en la **Figura 4**, los cuales son la limitación de absorción de un fármaco, modificación de objetivo del fármaco, inactivación del antibiótico y salida del fármaco activo.

Figura 4. Mecanismos generales de resistencia a los antibióticos



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores. Adaptada de Reygaert, (2018)

Existen otra clasificación de resistencia: intrínseca y adquirida. La primera RAM surge de características naturales que hacen resistente a la bacteria. La RAM adquirida ocurre por cambios genéticos o transferencia de genes entre bacterias (Charpentier & Tuomanen, 2020).

2.4. Mecanismos de resistencia en *E. coli* a los β -lactámicos

E. coli ha desarrollado diferentes mecanismos contra los β -lactámicos. Primero produce β -lactamasas que inactivan este fármaco, Además, puede reducir la perpetración del antibiótico,

alterar sus proteínas de unión a la penicilina. Por último, esta puede expulsar el antibiótico del espacio periplásmico (Galindo-Méndez, 2020).

Las β -lactamasas inactivan al fármaco al hidrolizar una parte de la estructura del anillo β -lactámico, haciendo que este se abra y no pueda unirse a sus proteínas de unión PBP diana (Reygaert, 2018). En la actualidad, las β -lactamasas tienen la clasificación de forma estructural de Ambler, donde hay una similitud de secuencia y separa las proteínas en 4 tipos: A, C y D que son de serina- β -lactamasas y la B de metalo- β -lactamasas (MBL) (Galindo-Méndez, 2020). Las β -lactamasas más importantes son las de espectro extendido, las β -lactamasas AmpC y las carbapenemasas, donde cada una de las β -lactamasas presentan diferente actividad hidrolítica (Bajaj et al., 2016).

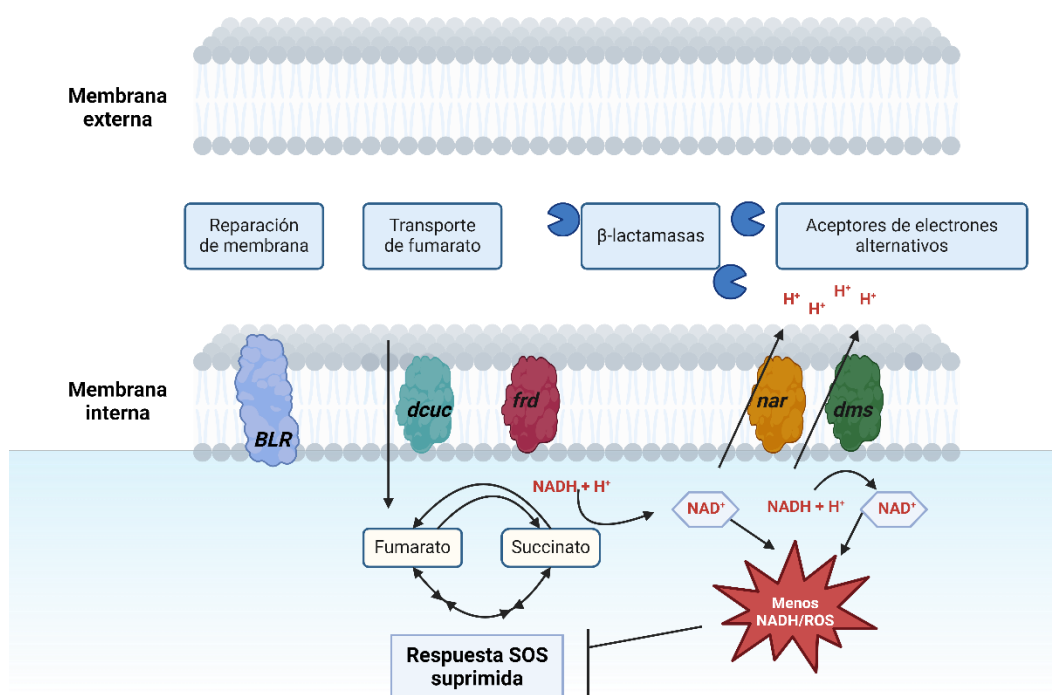
2.4.1. Metabolitos asociados a la resistencia de *E. coli*

En *E. coli*, las rutas metabólicas que se activan en la resistencia a antibióticos se conoce al de la alanina, el aspartato y el glutamato que promueven la biosíntesis de ácidos grasos, conocida por la formación de biopelículas, los metabolitos asociados a estas rutas se encuentran: metionina, kyotorfina, ornitina, ácido 5-aminovalérico, prolina, ácido elaídico, valina, N-metil-DL-alanina y β -alanina (Lin et al., 2019). Así también, el ciclo del ácido tricarboxílico que contribuye a la acumulación de energía para una adaptación en entornos estresantes (Cox, 2012).

2.4.2. Respuesta metabólica de resistencia a antibióticos en *E. coli*

Las bacterias resistentes se adaptan a un metabolismo parcialmente anaeróbico. Esto conlleva al agotamiento de NADH, contrarrestando la producción elevada de superóxido dependiente de NADH como se observa en la **Figura 5**. Además, muestran una supresión de la respuesta SOS y por último presentan una mutación en la región promotora de AmpC (Händel et al., 2013).

Figura 5. Modelo esquemático de la respuesta metabólica de resistencia a los antibióticos



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores. Adaptada de Händel et al., (2013)

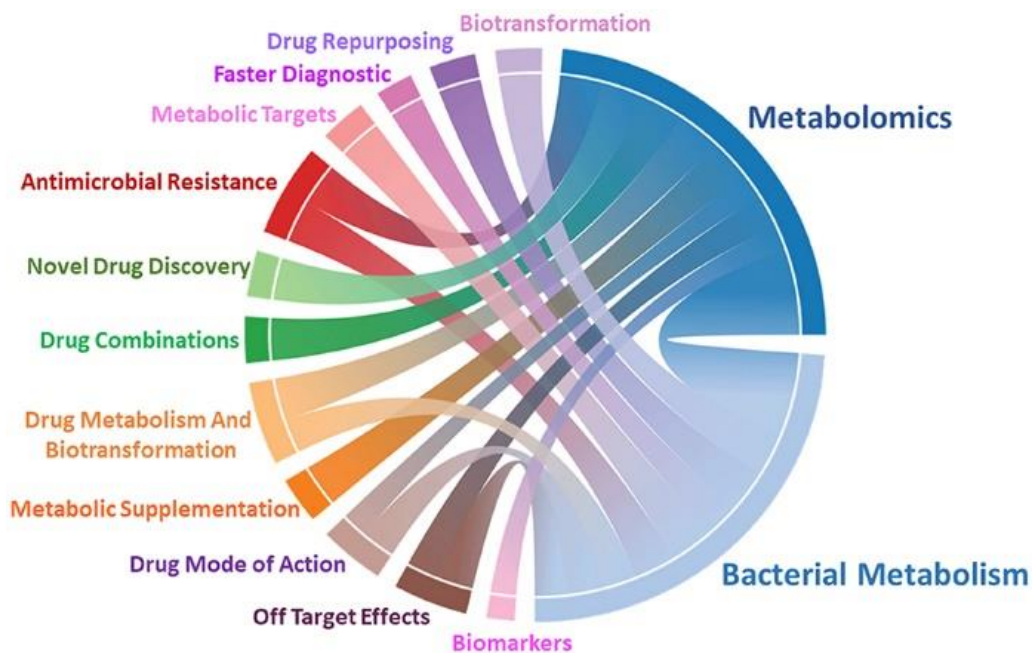
2.5. Metabolómica

Es una herramienta que permite la identificación y cuantificación de los metabolitos de un organismo o muestra de origen biológico, tiene un alto potencial en investigación de los perfiles metabólicos. Su desarrollo se debe gracias a las técnicas analíticas que permiten separar moléculas pequeñas, caracterizarlas y detectarlas por medio de softwares creados para el estudio del metaboloma (Idle & Gonzalez, 2007).

La metabolómica bacteriana brinda soluciones para la RAM, acelerando el descubrimiento de los cambios metabólicos en el tratamiento con el antibiótico y en el periodo

de la infección como se observa en la **Figura 6**, esto juega un rol primordial al momento de reconocer nuevos objetivos farmacológicos y contrarrestar la resistencia antibiótica (Soni et al., 2023).

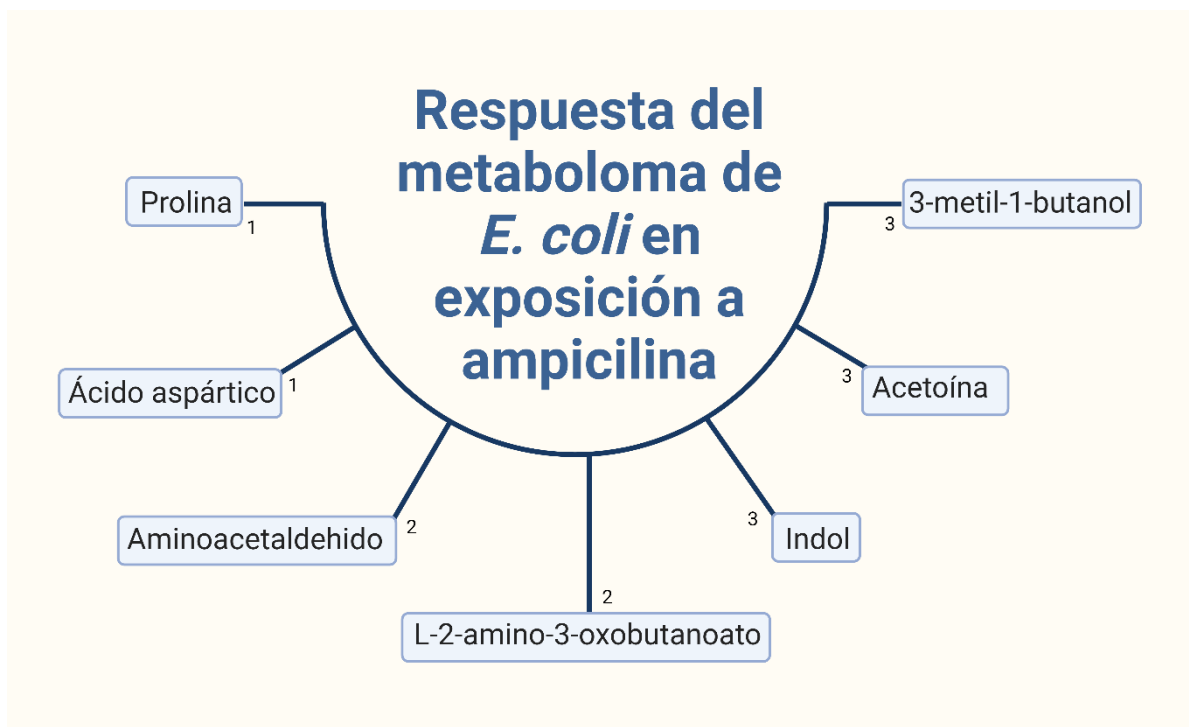
Figura 6. *Metabolómica en el estudio del metabolismo bacteriano*



Nota Tomado de Soni et al., (2023)

En un estudio realizado por Zampieri et al., (2017) demuestra la respuesta metabólica de *E. coli* expuesta a varios antibióticos donde se identificó una respuesta metabólica en su interior como se muestra en la **Figura 7**, en la cual se observa que en exposición a ampicilina los principales metabolitos asociados a resistencia son L-prolina, aminoacetaldehído y L-2-amino-3-oxobutanoato.

Figura 7. Respuesta del metaboloma de *E. coli* en exposición a ampicilina



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores. Adaptada de ¹Jiang et al., (2023); ²Zampieri et al., (2017); ³Dixon et al., (2022)

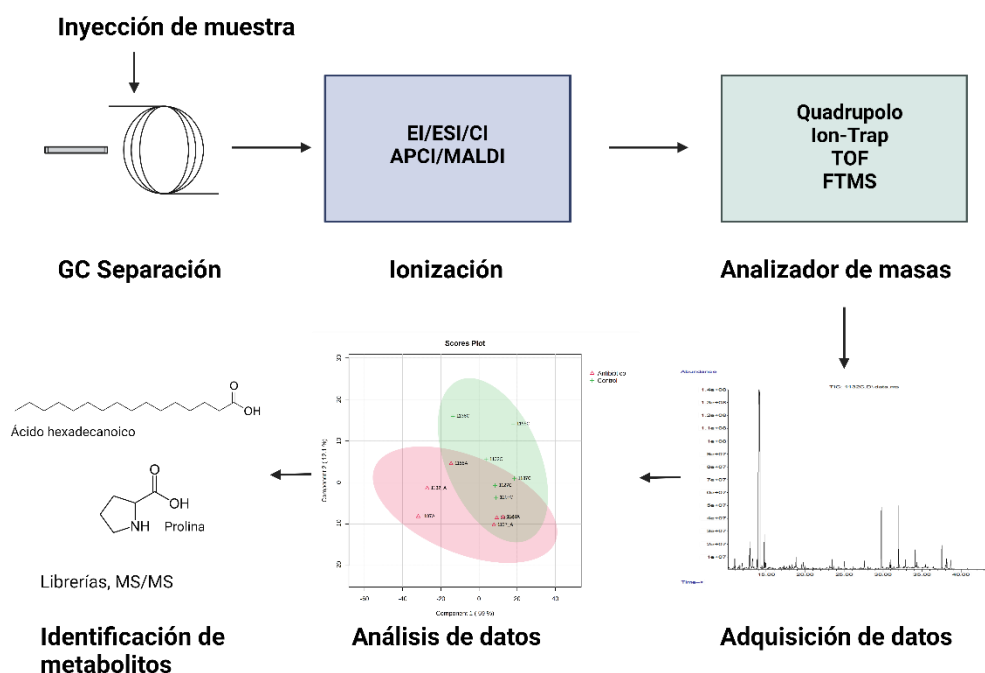
2.5.1 Métodos experimentales en la caracterización metabolómica:

En metabolómica se emplean diversas técnicas experimentales para la separación y detección de metabolitos, las principales plataformas analíticas son la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas. La resonancia magnética nuclear analiza los patrones de resonancia en un campo magnético para identificar metabolitos, mientras que la espectrometría de masas, mediante cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) con ionización, ofrece una rápida detección y selectiva de metabolitos en la metabolómica (Wang et al., 2010).

Como se observa en la **Figura 8** se muestra el flujo de trabajo que se lleva a cabo en un análisis metabolómico, en el que las muestras biológicas son sometidas a separación por técnicas de cromatografía líquida o de gases, posteriormente los espectros resultantes se derivan

a analizadores de masa y análisis de datos y estadísticos para poder identificar algún metabolito de interés.

Figura 8. Flujo de trabajo para análisis metabolómico basado en espectrometría de masas



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores. Adaptada de Wang et al., (2010)

2.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS):

Es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar metabolitos en muestras biológicas, utiliza derivatización química para mejorar la volatilidad de las muestras y combina enfoques dirigidos y no dirigidos, respaldados por bibliotecas espectrales, y emplea diversos detectores y espectrómetros de masas (Fiehn, 2016b).

Los enfoques dirigidos permiten la integración para la cuantificación absoluta de metabolitos específicos, por otro lado, los enfoques no dirigidos permiten descubrir nuevos compuestos (Iyer et al., 2023).

2.5.3. Concentración inhibidora media máxima (IC₅₀)

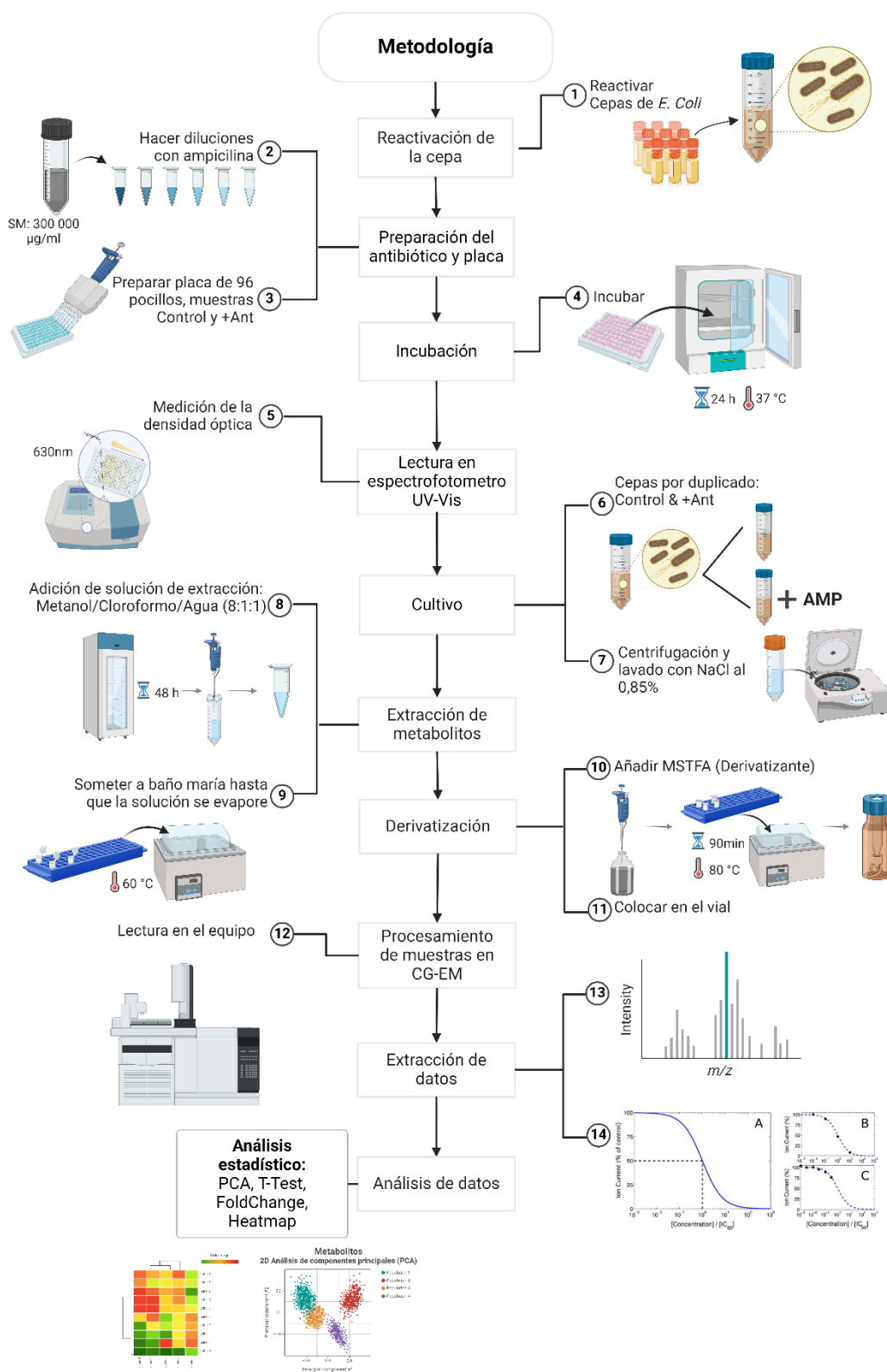
Es una medida que permite determinar la eficacia de un fármaco, indicando la cantidad necesaria para inhibir un proceso biológico a la mitad, tomando un papel como fármaco antagonista dentro del campo de la investigación (Aykul & Martinez-Hackert, 2016). Esto sirve para comprender el comportamiento que tiene un fármaco en un sistema biológico, como el de una bacteria, inhibiendo a mitad sus funciones de las células dianas de interés.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

El presente estudio fue parte integrante del proyecto de investigación CIBE-600-2018 titulado “Establecimiento, conservación y preservación de una Colección de cultivos microbianos del Ecuador con fines de investigación”. La metodología mencionada a continuación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) en el área de Fitopatología. La metodología empleada en la investigación se ilustra en la **Figura 9** y en los equipos y materiales empleados se detallan en los **Anexo 1, Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4**.

Figura 9. Esquema metodológico



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores (2024). Adaptada de Maridueña-Zavala et al., (2017a); Lechuga-Varela, (2018); Ramírez-Condoy et al., (2022); Putri et al., (2022).

3.1. Obtención de la muestra

En este estudio, se trabajaron con 86 cepas de *E. coli*. Las cuales observamos en la siguiente **Tabla 3** y fueron reactivadas de la colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE).

Tabla 3. Listado de cepas de *E. coli* crio-conservadas en la colección de cultivos microbianos CIBE

| | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CCM-B1125 | CCM-B1150 | CCM-B1170 | CCM-B1193 |
| CCM-B1126 | CCM-B1151 | CCM-B1171 | CCM-B1194 |
| CCM-B1127 | CCM-B1152 | CCM-B1172 | CCM-B1195 |
| CCM-B1128 | CCM-B1153 | CCM-B1173 | CCM-B1196 |
| CCM-B1129 | CCM-B1144 | CCM-B1174 | CCM-B1197 |
| CCM-B1130 | CCM-B1154 | CCM-B1175 | CCM-B1198 |
| CCM-B1131 | CCM-B1134 | CCM-B1176 | CCM-B1199 |
| CCM-B1132 | CCM-B1133 | CCM-B1177 | CCM-B1200 |
| CCM-B1135 | CCM-B1155 | CCM-B1179 | CCM-B1201 |
| CCM-B1136 | CCM-B1156 | CCM-B1180 | CCM-B1202 |
| CCM-B1137 | CCM-B1157 | CCM-B1181 | CCM-B1203 |
| CCM-B1138 | CCM-B1158 | CCM-B1182 | CCM-B1204 |
| CCM-B1139 | CCM-B1159 | CCM-B1183 | CCM-B1205 |
| CCM-B1140 | CCM-B1160 | CCM-B1184 | CCM-B1206 |

| | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CCM-B1141 | CCM-B1161 | CCM-B1185 | CCM-B1207 |
| CCM-B1142 | CCM-B1162 | CCM-B1186 | CCM-B1208 |
| CCM-B1143 | CCM-B1164 | CCM-B1187 | CCM-B1209 |
| CCM-B1145 | CCM-B1165 | CCM-B1188 | CCM-B1210 |
| CCM-B1146 | CCM-B1166 | CCM-B1189 | CCM-B1211 |
| CCM-B1147 | CCM-B1167 | CCM-B1190 | CCM-B1212 |
| CCM-B1148 | CCM-B1168 | CCM-B1191 | |
| CCM-B1149 | CCM-B1169 | CCM-B1192 | |

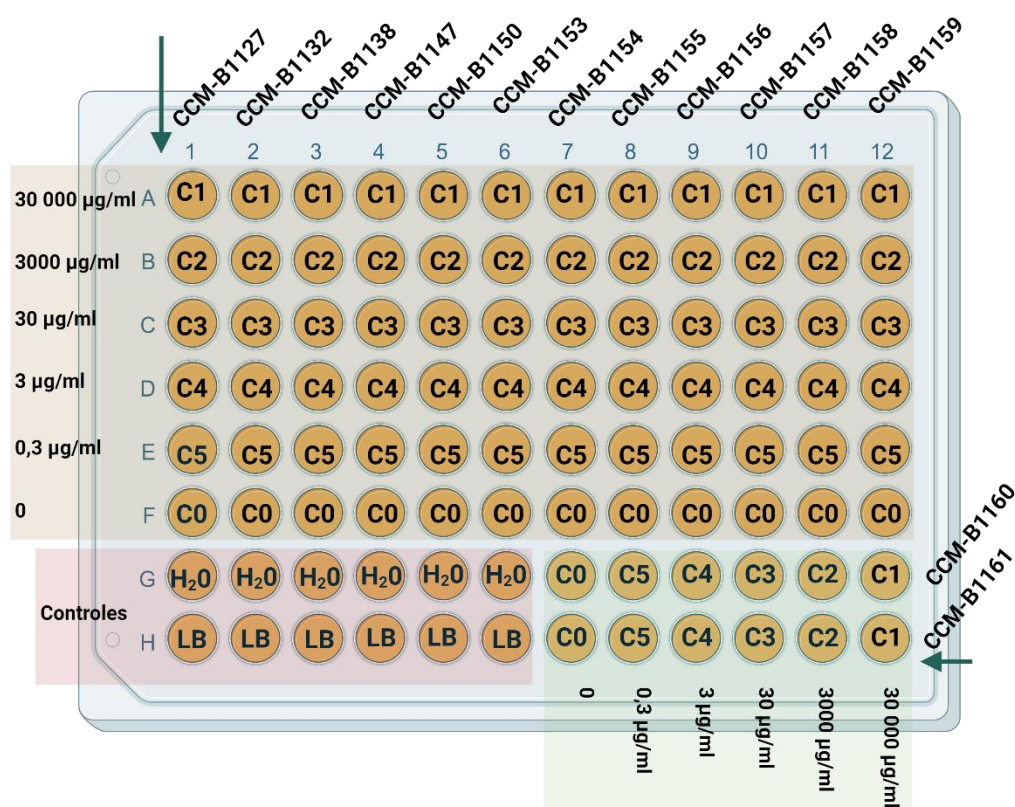
Nota. Las cepas se encontraban conservadas en ultracongelación a -80°C en caldo Luria-Bertani (LB) + glicerol, y fueron entregadas en TSA para los posteriores análisis. Elaborado por los autores (2024).

3.2. Determinación de la IC_{50}

Para la determinación del IC_{50} se siguió la metodología descrita en la normativa (ISO 20776-1, 2021), se hizo un subcultivo en tubos falcon de 30 ml con LB de las cepas que habían crecido en TSA y se incubaron por 18h, seguido se estableció un estándar en la escala de McFarland (MFU) de 0,5 en cada cepa. Una vez obtenido el inóculo se realizó la preparación en placas micro-tituladoras estériles de 96 pocillos donde se colocó el inóculo de las 86 cepas junto con las concentraciones del antibiótico por cada cepa se realizaron 5 concentraciones de ampicilina y un control En cada pocillo se colocó 150 ml LB + 50 ml de ampicilina + 50 ml de cepa estandarizada, las concentraciones de ampicilina empleadas en orden desde el pocillo A hasta el F fueron C1 30000 $\mu\text{g/ml}$; C2 300 $\mu\text{g/ml}$; C3 30 $\mu\text{g/ml}$; C4 3 $\mu\text{g/ml}$; C5 0,3 $\mu\text{g/ml}$; C0 0, en la fila G se colocó 250 μl de agua estéril y en la fila H se colocó en cada pocillo 250 μl de medio LB para controles, se realizó una réplica por cada placa siguiendo el mismo diseño, como se observa en la **Figura 10**. Finalmente, la placa se incubó a 37°C , pasadas

las 24 horas, se efectuó la lectura en un espectrofotómetro de placas a 630nm (Voigt et al., 2019). Los datos obtenidos fueron extraídos en una matriz de excel y se determinó el porcentaje de concentración de inhibición media utilizando PRISM10 de GraphPad Software con Model Dose-response – Inhibition para 3 parámetros (Le Berre et al., 2022).

Figura 10. Diseño de placa para IC_{50}



Nota. Ilustración creada con BioRender.com, por los autores (2024).

Una vez obtenido los valores del IC_{50} se estableció 4 tipos de concentraciones de ampicilina como se observa en la **Tabla 4**, para categorizar las cepas de acuerdo con su resistencia y susceptibilidad.

Tabla 4. Concentraciones de ampicilina en base a los resultados obtenidos del IC_{50} de las cepas evaluadas.

| Solución de ampicilina | Concentración en $\mu\text{g/ml}$ |
|-------------------------------|---|
| SM | 300 000 $\mu\text{g/ml}$ |
| SC | 150 000 $\mu\text{g/ml}$ |
| S1 | 3000 $\mu\text{g/ml}$ |
| S3 | 300 $\mu\text{g/ml}$ |

Nota. Elaborado por los autores (2024).

SM: Solución Madre de ampicilina

SC: Solución concentrada

S1: Solución #1

S3: Solución #3

3.3. Extracción de metabolitos

Para la extracción de metabolitos La extracción de los metabolitos se realizó en base a la metodología descrita por Cevallos-Cevallos et al., (2011 a ,b) para esto se realizó un subcultivo en tubos falcon de 50ml que contenían 30ml de caldo Luria-Bertani (LB). Donde primero se agrupó cada cepa por el valor de IC_{50} a partir de la media entre valores cercanos. El siguiente paso consistió en hacer subcultivos por cada cepa en tubos falcon, un control sin antibiótico y otro con antibiótico obtenida del IC_{50} , seguido se incubaron a 37°C por 18 horas (Radoš et al., 2022). Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron a 5000 xg por 20 minutos con una temperatura de 4°C , de los cuales se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con solución salina al 0,85% repitiendo el centrifugado. Se descartó totalmente el sobrenadante y al sedimento de la muestra se lo pesó y se agregó la solución de extracción metanol/cloroformo/agua que tenía una proporción de 8:1:1, el volumen de la solución de extracción se midió en proporción al peso del pellet obtenido de la muestra del tubo, siendo este

1 parte de muestra por 3 de solución. Finalmente se dejó incubando en refrigeración por 48 horas. Pasada la incubación se procedió a una centrifugación a 4000 xg por 10 minutos a una temperatura de 4°C. Se tomó 0.5 ml del sobrenadante y se lo traspasó a tubos eppendorf estériles, para llevarlos a una segunda centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos y se traspasó el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf desechando los residuos en los anteriores. Como paso siguiente se secó en baño María a 60°C con los tubos eppendorf destapados para que el líquido se evapore, una vez bien secas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

3.4. GC/MS

Para el análisis del perfil de metabolitos intracelulares de *E. coli* mediante GC-MS, las muestras secas se silanizaron por 90 minutos en baño María utilizando 150 μ l de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) como un agente derivatizante. Para la separación e identificación de metabolitos se llevó a cabo mediante la metodología descrita por Maridueña-Zavala et al., (2017) en donde se tomó 120 μ l de muestra y se los pasó a los viales de color ámbar para la lectura del cromatógrafo marca Agilent Technologies (sistema 7890^a GC y 5975C inerte XL MSD con detector de triple eje). Se empleó una columna no polar HP-5 con una dimensión de 30 m \times 320 μ m \times 0.25 μ m con fenil metilpolisiloxano (0.25 μ m de espesor de película) como fase estacionaria. Se inyectaron volúmenes de 1 μ l de las muestras derivatizadas, donde el inyector se encontraba a 250°C, y la temperatura inicial del horno fue de 70°C, la cual permaneció a la misma durante 1 minuto, la velocidad de la temperatura era de 5°C/min hasta llegar a 210°C, luego cambió la velocidad a 15°C/min hasta la temperatura final que fue de 315°C permaneciendo así por 9 minutos. El helio ultrapuro fue utilizado como gas portador a un flujo de 2.5ml/min. La interfaz GC-MS se configuró a 280 °C y después de 8 minutos de retraso del solvente, la exploración se registró con una frecuencia de 4 s⁻¹. Los datos se adquirieron utilizando ChemStation E.02.02 (Agilent Technologies, Inc.) y los metabolitos expresados diferencialmente se identificaron mediante lectura y comparación de espectros MS

utilizando la base de datos NIST 11, que nos permitió comparar los picos expresados mostrándonos un R. match confiable que sea menor de 100 al Match y una probabilidad mayor al 70%.

3.5. Procesamiento de datos

Los datos obtenidos en las áreas de pico de cada metabolito de la MS fueron analizados, los picos detectados en menos de 6 mediciones se trataron como la posibilidad de arrastre de metabolitos y se apartaron. El análisis de datos multivariado se ejecutó utilizando la herramienta XLSTAT 2024, donde se incluyó un Análisis de componentes principales (PCA) (Carrera-Garcés et al., 2021). El uso de métodos de análisis multivariados como el PCA es crucial para identificar los patrones en los perfiles metabólicos priorizando los metabolitos claves asociados con la resistencia (Worley & Powers, 2013). Por ellos al utilizar estos métodos analíticos podemos llegar a un acercamiento para entender los metabolitos intracelulares implicados. Para el análisis de metabolitos con mayor diferencia y significancia se utilizó el software online *MetaboAnalyst 6.0*, los metabolitos expresados de manera diferencial se escogieron con pruebas T-test con un nivel de significancia del 0,05 y se informaron como el logaritmo en base 2 del cambio en veces de cada compuesto después de la exposición a la Ampicilina.

Capítulo 4

Resultados y Discusiones

4.1. Mediciones del IC₅₀

En base a las mediciones del IC₅₀ se clasificó las cepas de acuerdo con sus concentraciones de inhibición (**Tabla 5**), las cepas que mostraron un valor fuera de los valores normales en la prueba del IC₅₀, no se incluyeron en el análisis de metabolitos. Los resultados de sensibilidad y resistencia de las cepas nos muestran (**Figura 11**) que un 10% de las cepas presentan un IC₅₀ ≤ 10 ug/ml, un 24,29% de las cepas tienen un IC₅₀ ≤ 100 ug/ml, otro grupo 34,29% tienen un IC₅₀ ≤ 1000, un 7,14% de las cepas tienen un IC₅₀ ≤ 2000, un 21,43% de las cepas tienen un IC₅₀ ≤ 3000 y por último un 2,86% de cepas restantes mostraron un IC₅₀ ≥ 4000 ug/ml. En la investigación se ha determinado que las cepas que presentaron un IC₅₀ ≥ 100 ug/ml fueron consideradas como resistentes a la ampicilina, estos valores coinciden con investigaciones previas en donde los valores de sensibilidad se encuentran por debajo de 2 ug/ml en Reyes S et al., (2004) debido a que las cepas evaluadas no presentaban resistencia, en otra investigación se observó que los niveles de sensibilidad en *E. coli* también se ubicaron en 2 ug/ml y se evaluó los cambios ocurridos en el nivel de resistencia de *E. coli* al administrar ampicilina en cerdos, donde la resistencia se estableció en 32 ug/ml (Ahmad et al., 2016). A nivel de los metabolitos, se han podido determinar respuesta rápida de cambios metabólicos en concentraciones de ampicilina que van desde 15 ug/ml, lo que puede presentar problemas debido a una inmediata la tolerancia a los antibióticos puede verse alterado su metabolismo (Zampieri et al., 2017). En este estudio se reveló una distribución significativa entre las cepas sensibles y resistentes, destacando que los valores de resistencia mencionados coinciden con los de otros estudios previos, dando respaldo a estos hallazgos, además estudiar la respuesta metabólica a diferentes concentraciones de ampicilina subraya la importancia de la relación entre resistencia y cambios en el metabolismo de *E. coli*.

En cuanto a la proporción de cepas sensibles (33,80%) y cepas resistentes (66,20%) diversos autores han podido concluir que dentro de una evaluación sin importar la situación geográfica el porcentaje de cepas resistentes supera al 50% de las cepas evaluadas (Erb et al., 2007), estos valores pueden incluso llegar hasta el 82% de resistencia dependiendo de la procedencia de la cepa (Patil et al., 2023). A nivel médico se han confirmado valores del 100% de resistencia en evaluaciones realizadas en 4 años distintos (Cáceres Rojas et al., 2019), resaltando la importancia de comprender los niveles de resistencia de *E. coli*.

Tabla 5. Clasificación de las cepas evaluadas en 24 grupos en base a la determinación del IC₅₀

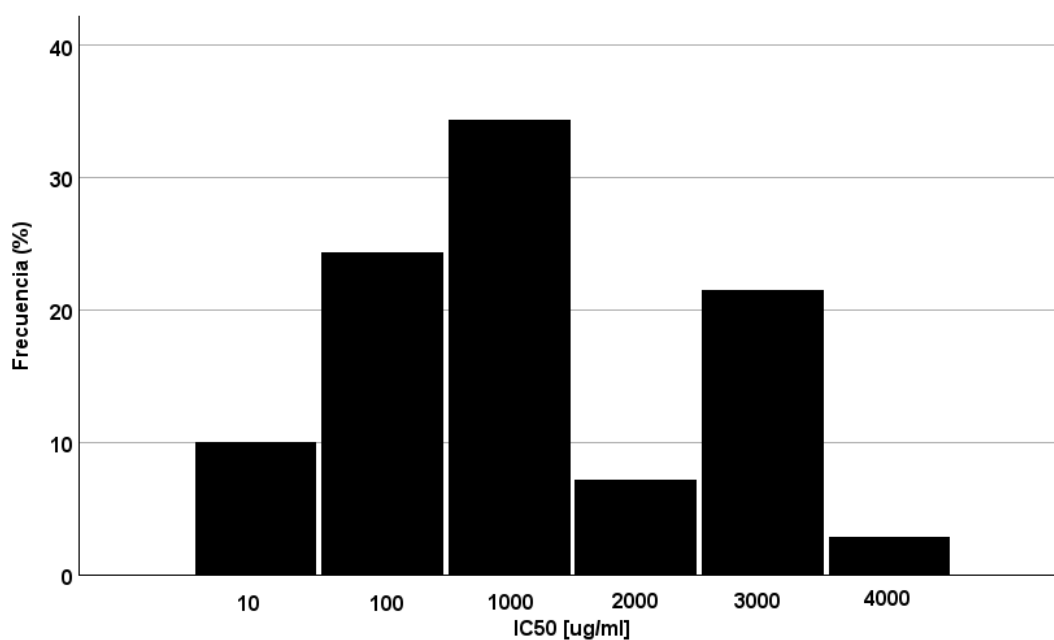
| Grupo | Cepas | IC₅₀ [µg/ml] |
|--------------|---|------------------------------------|
| Grupo 1 | CCM-B1131 | 70.01 |
| Grupo 2 | CCM-1209, CCM-B1210, CCM-B1196 | 60.04 |
| Grupo 3 | CCM-B1198, CCM-B1212 | 30.46 |
| Grupo 4 | CCM-B1188 | 71.96 |
| Grupo 5 | CCM-B1202, CCM-B1206 | 848.50 |
| Grupo 6 | CCM-B1195, CCM-B1200, CCM-B1190 | 442.1 |
| Grupo 7 | CCM-B1183, CCM-B1169, CCM-B1135, CCM-B1136, CCM-B1208, CCM-B1197 | 539.98 |
| Grupo 8 | CCM-B1156, CCM-B1176 | 934.3 |
| Grupo 9 | CCM-B1167 | 718.15 |
| Grupo 10 | CCM-B1168, CCM-B1203 | 666.4 |
| Grupo 11 | CCM-B1158, CCM-B1157, CCM-B1128 CCM-B1129 | 243.35 |
| Grupo 12 | CCM-B1133 | 361 |

| | | |
|----------|---|--------|
| Grupo 13 | CCM-B1186, CCM-B1155, CCM-B1160, CCM-B1185, CCM-B1191 | 145.1 |
| Grupo 14 | CCM-B1147, CCM-B1151, CCM-B1125 | 1501.1 |
| Grupo 15 | CCM-B1199 | 1250 |
| Grupo 16 | CCM-B1149 | 1740 |
| Grupo 17 | CCM-B1207 | 0,58 |
| Grupo 18 | CCM-B1181, CCM-B1182, CCM-B1152, CCM-B1130, CCM-B1126, CCM-B1180 | 3000 |
| Grupo 19 | CCM-B1127, CCM-B1177, CCM-B1179 | 5.0 |
| Grupo 20 | CCM-B1162 | 6.87 |
| Grupo 21 | CCM-B1161, CCM-B1187 | 10 |
| Grupo 22 | CCM-B1132 | 1523 |
| Grupo 23 | CCM-B1171, CCM-B1159 | 3751,5 |
| Grupo 24 | CCM-B1138 | 4418 |

Nota. Datos de *GraphPad Prism 10* por los autores (2024)

Figura 11. Frecuencia porcentual de los valores de IC_{50} observados desde 0 a 4000

ug/ml



Nota. Elaborado en IBM SPSS Statistics 29.0.2.0 por los autores (2024)

4.2. Perfil de metabolitos

La siembra de los grupos de cepas se realizó con sus valores de IC_{50} del grupo asignado, para mantener uniformidad en el estudio se elaboró un cuadro de la cantidad de medio a usar junto con la concentración de Ampicilina (**Anexo 5**).

4.2.1. Perfil de metabolitos de cepas sensibles

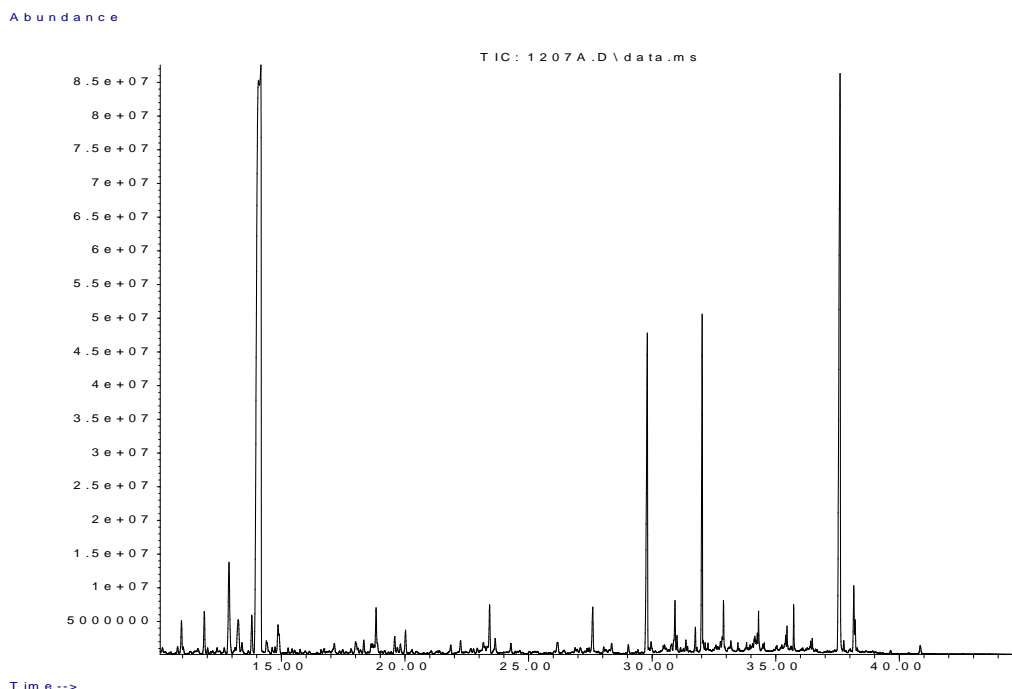
En las muestras con concentraciones $< 10 \mu\text{g/ml}$ se observaron 155 y 205 picos en el cromatograma obtenido (**Figura 12**). Se obtuvieron 13 metabolitos que tuvieron diferencia significativa con su respectivo control, entre los compuestos que se encontraron están aminoácidos como el ácido aspártico siendo este el que tuvo mayor cambio entre el control, la valina y prolina, entre ácidos grasos se encontraron al ácido hexanodioico, ácido butanodioico y ácido butanoico y otros compuestos como algunos alcanos entre los cuales están docosano,

eicosano, tetracosano y heneicosano (**Tabla 6**). El ácido hexanodioico fue el compuesto que tuvo un mayor valor de área con 6,075 m/z , mientras que el ácido butanoico fue el que tuvo el menor valor de área de 0,034 m/z entre las cepas sensibles.

A partir de la “T-Test” se obtuvo un grupo de 10 metabolitos con una significancia $p < 0.05$, los cuales fueron en su gran mayoría alcanos y ácidos grasos como el ácido butanodioico (**Anexo 6**).

En el análisis de componente principales se evidenció que si hay agrupación significativa entre las muestras con antibiótico que se ubican a la izquierda y los controles de las cepas sensibles que se ubican a la derecha. El componente principal #1 contribuyó con un 54.93% de la varianza global, mientras que el componente principal #2 con el 19.88% como se observa en la **Figura 14**. Los metabolitos que tuvieron una mayor carga en el componente principal #1 fueron el ácido fosfórico, ciclopentano, prolina, ácido butenodioico, ácido aspártico, niacinamida y valina, mientras que en el componente principal #2 ocuparon los valores más altos benceno, heineicosano, ácido butanoico, 3,4-dietiltioquinolina y tetracosano.

Figura 12. Cromatograma de cepa sensible CCM-B1207



Nota. Extraído por los autores (2024)

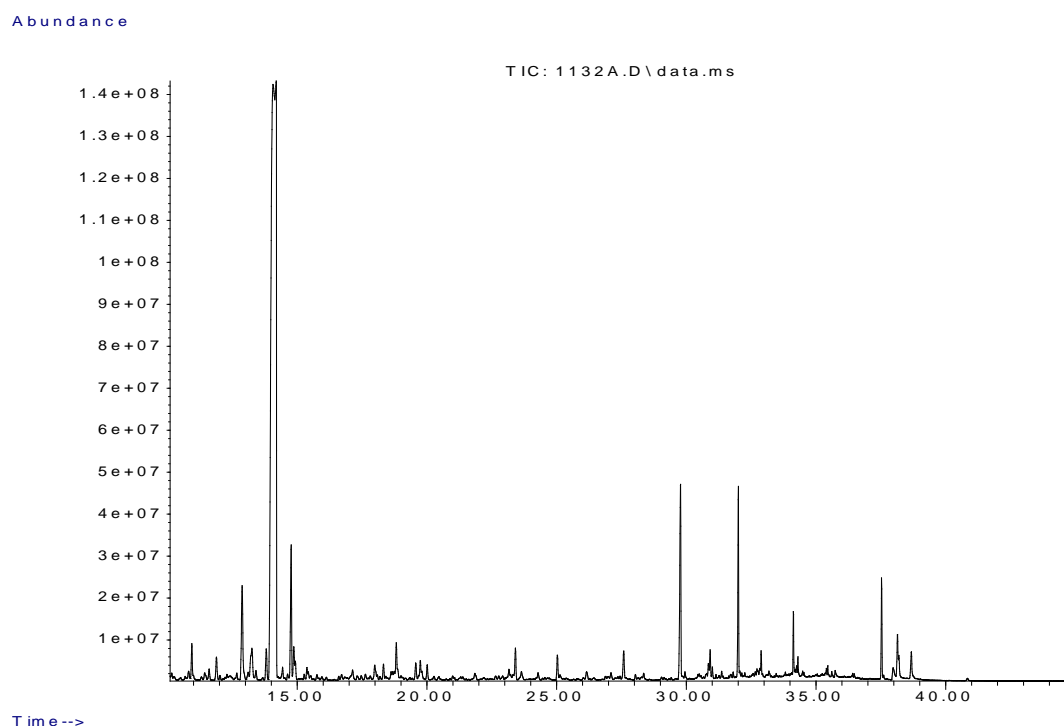
4.2.2. Perfil de metabolitos de cepas resistentes

En las muestras con concentraciones $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ se observaron 161 y 221 picos en el cromatograma obtenido (**Figura 13**). Se obtuvieron 15 metabolitos con diferencia entre su respectivo control, los principales metabolitos encontrados fueron los pertenecientes al grupo de los alcanos como el undecano, triacontano, tetracosano, hexadecano y docosano, también hubo presencia de aminoácidos como la prolina y la homoserina, otros compuestos como quinolinas y algunos ácidos grasos como el ácido pentadecanoico, ácido butanodioico, ácido propanoico y ácido hexadecanoico como se observan en la **Tabla 6** obtenida a partir del análisis “Fold Change”. El ácido hexadecanoico fue el compuesto que tuvo un mayor valor de área con 5,171 m/z , mientras que el ciclopropano fue el que tuvo el menor valor de área de 0,157 m/z entre las cepas sensibles.

A partir de la “T-Test” se obtuvo 3 metabolitos con una significancia $p < 0.05$, entre los cuales están dos alcanos y un aminoácido (**Anexo 7**).

En el análisis de componente principales se evidenció que no hay agrupación significativa entre las muestras con antibiótico y los controles de las cepas sensibles. El componente principal #1 contribuyó con un 38.01% de la varianza global, mientras que el componente principal #2 con el 30.62% como se observa en la **Figura 15**. Los metabolitos que tuvieron una mayor carga en el componente principal #1 fueron el ácido hexadecanoico, ácido propanoico y prolina, mientras que en el componente principal #2 ocuparon los valores más altos ácido butanodioico, homoserina, ácido butanoico, hexadecano y tetracosano.

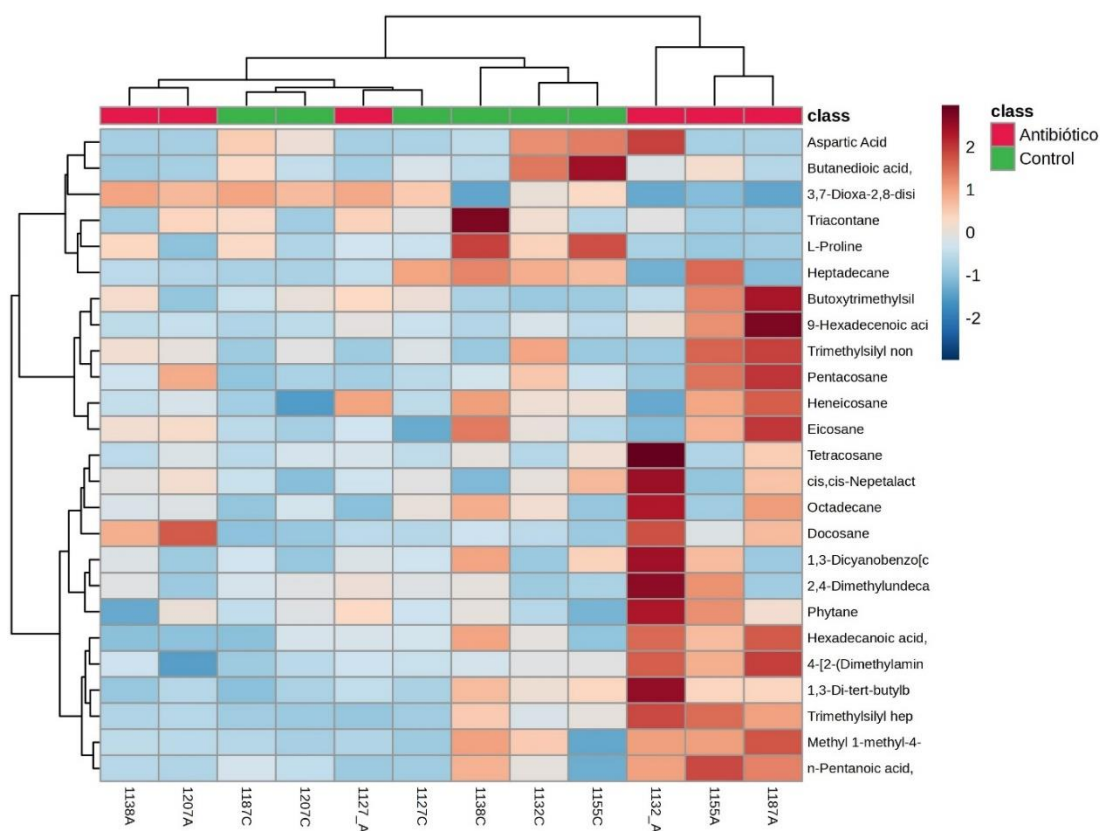
Figura 13. Cromatograma de cepa resistente CCM-B1132



Nota. Extraído por los autores (2024)

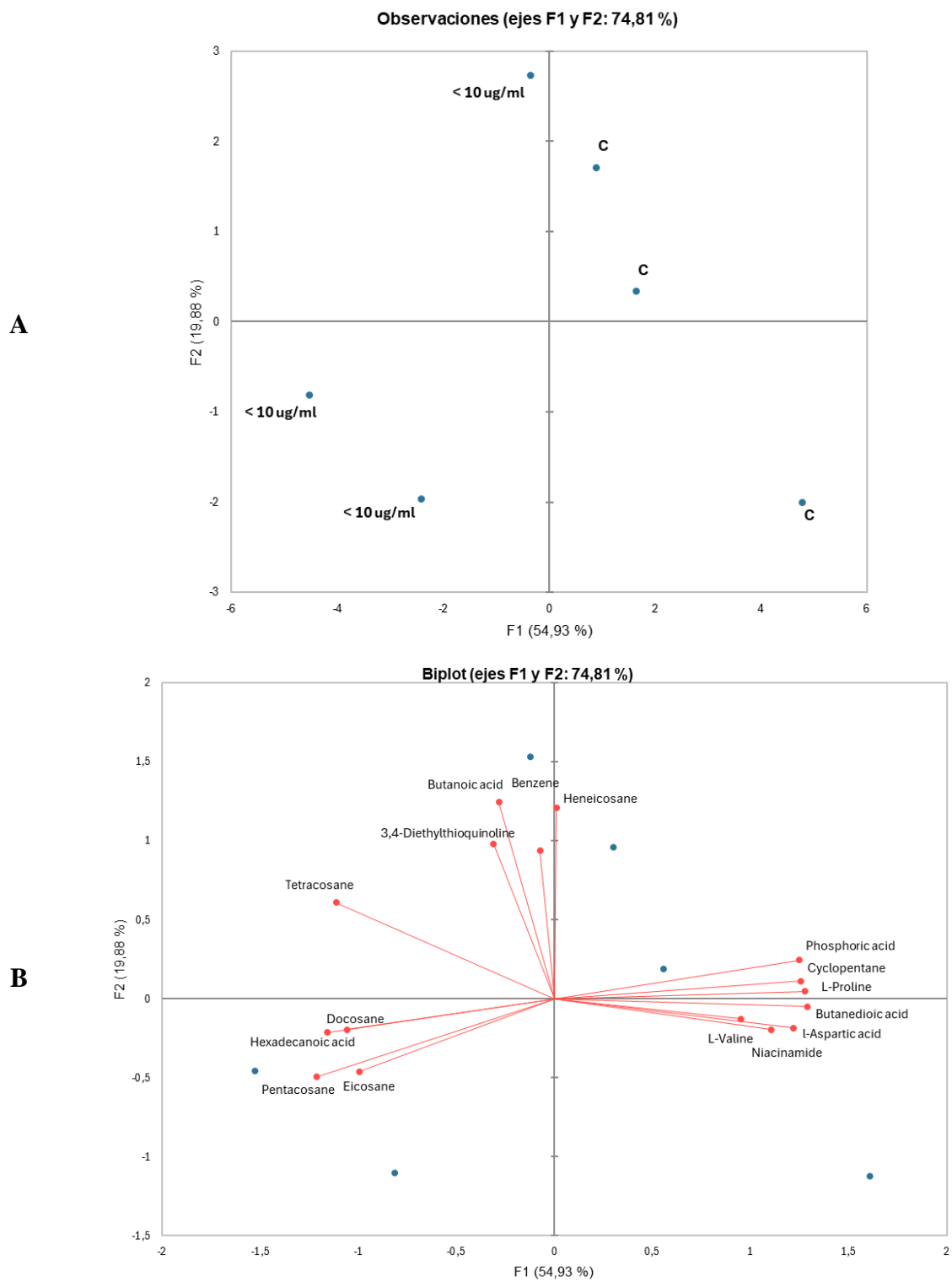
El análisis de mapas de calor nos muestra los 25 metabolitos más relevantes que se han obtenido de esta investigación, mostrando que las muestras del grupo antibiótico CCM-B1138 con concentración $>100 \mu\text{g/ml}$, CCM-B1207 y CCM-B1127 con concentración $<10 \mu\text{g/ml}$ se agrupan en un clúster en comparación a las muestras control y poseen una mayor concentración de ciertos metabolitos representados en la **Figura 14**.

Figura 14. Diagrama de mapas de calor con los 25 metabolitos con más representación



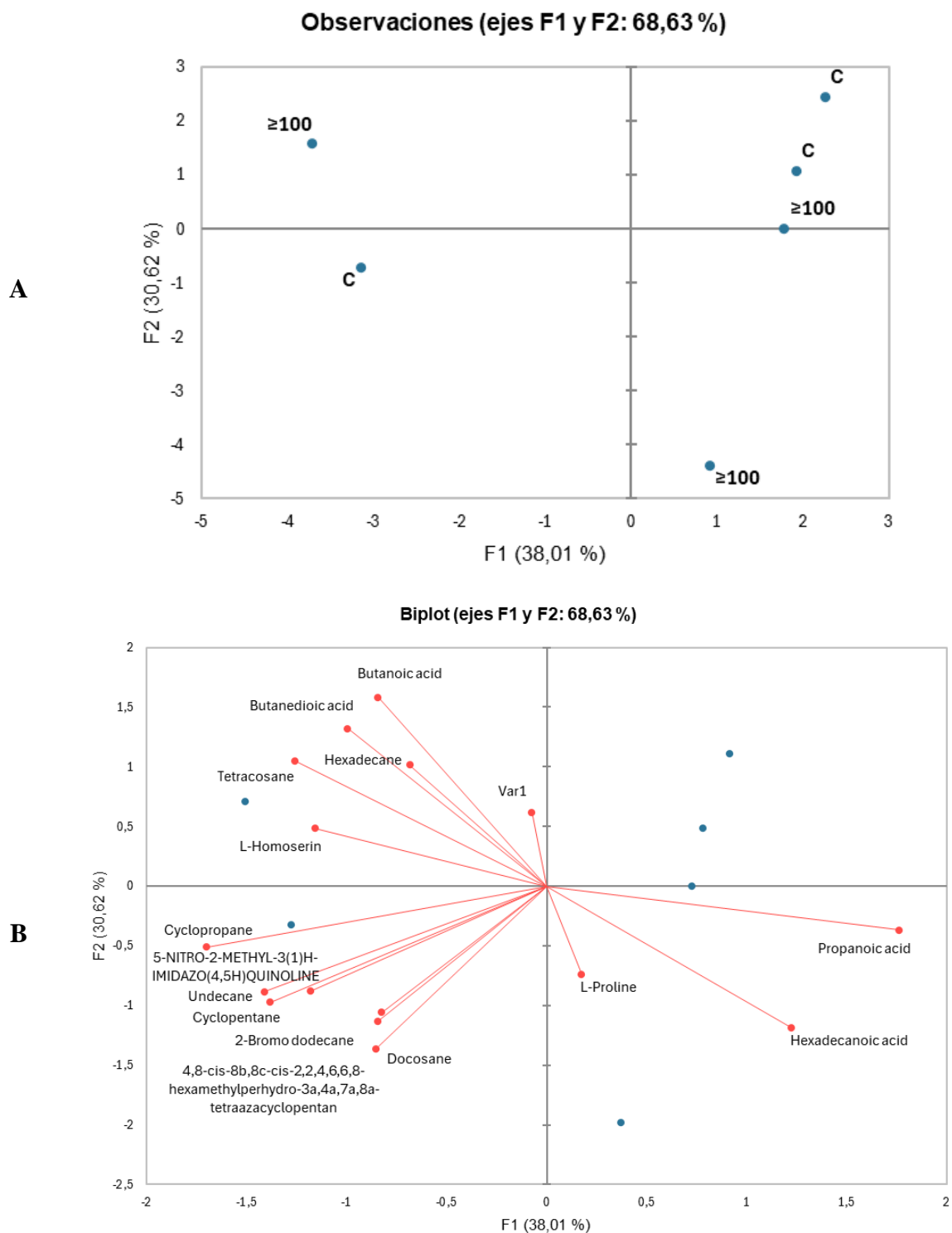
Nota. Elaborado en *MetaboAnalyst 6.0*, por los autores (2024)

Figura 15. Gráfico de puntuación de PCA (A) y carga (B) de metabolitos de cepas sensibles a ampicilina



Nota. Extraído de XLSTAT 2024, por los autores (2024)

Figura 16. Gráfico de puntuación de PCA (A) y carga (B) de metabolitos de cepas resistentes a ampicilina



Nota. Extraído de XLSTAT 2024, por los autores (2024)

Tabla 6. Principales metabolitos que mostraron diferencia significativa entre cepas control y antibiótico

| N° | Metabolito | Clase | Log2(FC) | |
|----|--|-------------|------------|-------------|
| | | | < 10 µg/ml | ≥ 100 µg/ml |
| 1 | Undecano | Alcano | N/F | 2.2579 |
| 2 | Triacontano | Alcano | N/F | -2.2365 |
| 3 | L-Prolina | Aminoácido | -1.0164 | -2.0181 |
| 4 | Ciclopropano | Cicloalcano | N/F | 1.78 |
| 5 | Tetracosano | Alcano | 1.1176 | 1.7362 |
| 6 | Ácido hexadecanoico | Ácido graso | 2.7082 | 1.7299 |
| 7 | Hexadecano | Alcano | N/F | 1.6442 |
| 8 | Ácido n-Pentadecanoico | Ácido graso | N/F | 1.5042 |
| 9 | 5-nitro-2-metil-3(1)H-imidazol(4,5H)quinolina | Quinolina | N/F | -1.4174 |
| 10 | Ciclopentano | Cicloalcano | -1.8869 | 1.336 |
| 11 | Ácido Butanodioico | Ácido graso | -2.57 | -1.312 |
| 12 | 4,8-cis-8b,8c-cis-2,2,4,6,6,8-hexamethylperhydro-3a,4a,7a,8a-tetraazacyclopentan | - | N/F | 1.3045 |
| 13 | Docosano | Alcano | 1.9485 | 1.1883 |
| 14 | L-Homoserina | Aminoácido | N/F | -1.1377 |
| 15 | Ácido propanodioico | Ácido graso | N/F | -1.0242 |
| 16 | L- Ácido aspártico | Aminoácido | -4.3546 | N/F |
| 17 | Pentacosano | Alcano | 2.3781 | N/F |

| | | | | |
|----|-----------------|-------------------|---------|-----|
| 18 | Eicosano | Alcano | 2.0748 | N/F |
| 19 | Ácido Butanoico | Ácido graso | 1.6121 | N/F |
| 20 | Heicosano | Alcano | 1.4697 | N/F |
| 21 | Ácido fosfórico | Oxoácidos | -1.3122 | N/F |
| 22 | Niacinamida | Ácido carboxílico | -1.2856 | N/F |
| 23 | L-Valina | Aminoácido | -1.1766 | N/F |

Nota. N/F (No encontrado). Datos extraídos de *MetaboAnalyst 6.0* por los autores (2024)

Existe un vínculo intrínseco entre el metabolismo y la resistencia bacterianos, que todo esto se da en la fase de adaptación de la bacteria aún sin incluir un antibiótico, por eso es importante reconocer los cambios ocurridos entre una cepa con tratamiento y otra sin tratamiento (Martínez & Rojo, 2011). Por eso en este estudio se abordó la importancia de conocer un valor adecuado para tratamiento, como es el caso del IC₅₀ obtenido, reconocer los cambios que ocurrieron entre ambas partes e identificar si existió diferencia significativa entre grupo de metabolitos, en nuestra investigación la prolina tuvo una significancia alta en el grupo control de las cepas resistentes, por esto en otro estudio se menciona la prolina es intrínseca de la patogenicidad del microorganismo y no asociado directamente como un metabolito vinculado a la fase de adaptación (Christgen & Becker, 2019).

En otras investigaciones se menciona que los aminoácidos pueden producir compuestos los cuales puedan interferir en la respuesta antibiótica (Dixon et al., 2022). La prolina tiene capacidad de producir giros en algunas proteínas como la DnaK, esta proteína desempeña un rol fundamental en la respuesta al estrés y resistencia a los antibióticos, sus estructuras proteicas se ven afectadas y su capacidad de plegarse correctamente, debido a la interacción DnaK-Prolina como se menciona en (Li et al., 2014).

En investigaciones previas, Dixon et al., (2022) menciona que la respuesta metabolómica de la resistencia y susceptibilidad a la ampicilina en *E. coli* se ve mediada por ácidos grasos apareciendo estos con mayor abundancia en cepas que son catalogadas como susceptibles, y que hidrocarburos y alcanos son los principales metabolitos que se agrupan en las cepas resistentes. Los ácidos grasos producidos en las cepas susceptibles podrían deberse al resultado del metabolismo de los ácidos grasos por medio de una vía de β -oxidación, que a lo largo de esta se van produciendo otros compuestos como alcanos (Schulz & Dickschat, 2007). Como se mencionó previamente el proceso de β -oxidación no solo podría estar asociado a la producción de ácidos grasos, sino que también podría vincularse a la producción de otros compuestos como los alcanos, que en nuestros resultados fueron una mayoría, de igual manera los ácidos grasos prevalecían y fueron los compuestos con un mayor número de área (m/z) que se observaron, podría existir alguna relación sobre su producción. En otro estudio se menciona que los otros mecanismos de acción que tiene los ácidos grasos son la fosforilación oxidativa, alteración de las propiedades y de la permeabilidad de la membrana y la inhibición de enzimas implicadas en la respuesta antibiótica (MacDermott-Opeskin et al., 2022). Estas causas pueden ayudar a comprender un poco más sobre las posibles explicaciones de la abundancia de ácidos grasos en cepas susceptibles.

El ácido hexadecanoico, puede desempeñar un papel en la resistencia bacteriana al modular la actividad de las enzimas implicadas en la conjugación bacteriana afectando a la unión de proteínas de membrana (García-Cazorla et al., 2018). Este compuesto dio uno de los mayores valores de área (m/z), por lo que con lo antes mencionado podría influir directamente en interacciones a nivel molecular, dando capacidad de la bacteria para tener resistencia.

No se han encontrado estudios que establezcan una conexión directa entre el docosano y la resistencia, pero si tiene propiedades antimicrobianas cuando prueba como

un compuesto puro (Lammers et al., 2021). Este fue uno de los compuestos más relevantes dentro de las muestras tanto sensibles como resistentes, habría que realizar futuras investigaciones centrándose en el papel de los alcanos en la resistencia antimicrobiana.

Capítulo 5

Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Esta investigación reveló una variedad significativa en la composición metabólica de la resistencia a la ampicilina en cepas de *E. coli*, indicándonos que la resistencia a este antibiótico está vinculado a un grupo de perfiles metabólicos específicos.

A partir del IC_{50} se obtuvieron un 33,80% de cepas sensibles con un $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ y un 66,20% de cepas resistentes con un $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$.

Los resultados de metabolitos identificados en CG-MS de cepas las cepas sensibles y resistentes en *E. coli*, se encontraron alrededor de 15 metabolitos que tuvieron mayor diferencia entre grupo antibiótico y grupo control, por otro lado en las cepas sensibles se obtuvieron 13 metabolitos.

5.2. Recomendaciones

Con base en los hallazgos y análisis realizados, se proponen las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en el campo de estudio:

Ampliar la cantidad de cepas utilizadas en el estudio para asegurar una representación adecuada de las cepas sensibles en comparación con las resistentes, esto garantizará una evaluación más completa de las diferencias metabólicas.

Realizar un análisis detallado de la curva de crecimiento de las cepas de *E. coli* antes de la extracción de metabolitos para identificar los tiempos de mayor producción de la bacteria.

Durante la derivatización de las muestras es fundamental evitar el uso de tubos húmedos durante la lectura de muestras, ya que la humedad puede interferir con la reacción de derivatización y afectar los análisis cromatográficos.

Complementar los resultados obtenidos mediante técnicas como la resonancia magnética nuclear. Esta validación independiente permitirá confirmar la identificación de metabolitos y las diferencias observadas entre las cepas.

Realizar un análisis exhaustivo de las vías metabólicas asociadas a la resistencia antibiótica en *E. coli*. Esto incluye la identificación de biomarcadores metabólicos específicos o la exploración de rutas metabólicas que puedan estar asociadas directamente en la respuesta de la bacteria al antibiótico.

Finalmente, investigar las posibles interacciones metabólicas entre cepas de *E. coli* resistentes y otros microorganismos presentes en el mismo entorno. El realizar estudios de co-cultivos o comunidades microbianas puede ser útil para proporcionar información sobre la complejidad de sistemas biológicos estudiados y mejorar la comprensión de mecanismos subyacentes a la resistencia en entornos naturales o clínicos.

Referencias Bibliográficas

- Ahmad, A., Zachariassen, C., Christiansen, L. E., Græsbøll, K., Toft, N., Matthews, L., Nielsen, S. S., & Olsen, J. E. (2016). Modeling the growth dynamics of multiple *Escherichia coli* strains in the pig intestine following intramuscular ampicillin treatment. *BMC Microbiology*, *16*(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0823-3>
- Aminov, R. (2022). Metabolomics in antimicrobial drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *17*(9), 1047–1059. <https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2113774>
- Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, *508*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00417>
- Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. En *Escherichia coli - Old and New Insights*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105508>
- Basavaraju, M., Gunashree, B. S., Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. *Escherichia coli - Old and New Insights*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.105508>
- Cáceres Rojas, R., Galeano Burgos, A., Legal Arias, J., Monges Alonso, C., Battaglia Petersen, P., & Santa Cruz Segovia, F. (2019). Sensitivity profile of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of patients of the Regional Hospital of Villarrica from July 2013

to August 2015. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, 52(2), 17–22.
[https://doi.org/10.18004/anales/2019.052\(02\)17-022](https://doi.org/10.18004/anales/2019.052(02)17-022)

Carrera-Garcés, F. P., Cevallos-Cevallos, J. M., & Noceda-Alonso, C. M. (2021). *Caracterización del perfil metabolómico en bananos musa AAAcv. Williams que presentan variación somaclonal* [Tesis Doctoral, Escuela Superior Politécnica del Litoral].
<http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/55232>

Castle, S. S. (2007). Ampicillin. En *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61227-9>

CDC. (2022, octubre 5). *How Antibiotic Resistance Happens* / CDC.
<https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>

Cevallos-Cevallos, J. M., Danyluk, M. D., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2011). GC-MS Based Metabolomics for Rapid Simultaneous Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Salmonella Muenchen, and Salmonella Hartford in Ground Beef and Chicken. *Journal of Food Science*, 76(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02132.x>

Cevallos-Cevallos, J. M., García-Torres, R., Etxeberria, E., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2011). GC-MS Analysis of Headspace and Liquid Extracts for Metabolomic Differentiation of Citrus Huanglongbing and Zinc Deficiency in Leaves of ‘Valencia’ Sweet Orange from Commercial Groves. *Phytochemical Analysis*, 22(3), 236–246.
<https://doi.org/10.1002/pca.1271>

- Charpentier, E., & Tuomanen, E. (2020). Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes and Infection*, 2(15), 1855–1864. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01345-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01345-9)
- Cho, H., Uehara, T., & Bernhardt, T. G. (2014). Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell*, 159(6), 1300–1311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.017>
- Christgen, S. L., & Becker, D. F. (2019). Role of Proline in Pathogen and Host Interactions. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(4), 683–709. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7335>
- Coral, D., Yauri-Bucheli, M., & Alcocer, I. (2021). Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 42(1). <https://doi.org/10.26807/remcb.v42i1.886>
- Cox, S. E. (2012). Energy Metabolism. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2–4, 177–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00091-X>
- Diez-Simon, C., Mumm, R., & Hall, R. D. (2019). Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products. *Metabolomics*, 15(3), 41. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1493-6>
- Dixon, B., Ahmed, W. M., Mohamed, A. A., Felton, T., & Fowler, S. J. (2022a). Metabolic phenotyping of acquired ampicillin resistance using microbial volatiles from *Escherichia coli* cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2445–2456. <https://doi.org/10.1111/jam.15716>

- Dixon, B., Ahmed, W. M., Mohamed, A. A., Felton, T., & Fowler, S. J. (2022b). Metabolic phenotyping of acquired ampicillin resistance using microbial volatiles from *Escherichia coli* cultures. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(4), 2445–2456. <https://doi.org/10.1111/jam.15716>
- Elmassry, M. M., & Piechulla, B. (2020). Volatilomes of Bacterial Infections in Humans. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00257>
- Erb, A., Stürmer, T., Marre, R., & Brenner, H. (2007). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *26*(2), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0248-2>
- Estrada-Garcia, T., & Tarr, P. I. (2023). *Escherichia coli* Infection. *Foodborne Infections and Intoxications*, 125–163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00018-9>
- Fiehn, O. (2016a). Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, *114*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fiehn, O. (2016b). Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, *114*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fortuin, S., & Soares, N. C. (2022). The Integration of Proteomics and Metabolomics Data Paving the Way for a Better Understanding of the Mechanisms Underlying Microbial Acquired Drug Resistance. *Frontiers in Medicine*, *9*, 849838. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.849838>

- Galindo-Méndez, M. (2020). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. En L. Rodrigo (Ed.), *E. Coli Infections - Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment* (pp. 179–198). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93115>
- Galindo-Méndez, M., & Galindo-Méndez, M. (2020). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *E. Coli Infections - Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.93115>
- García-Cazorla, Y., Getino, M., Sanabria-Ríos, D. J., Carballeira, N. M., de la Cruz, F., Arechaga, I., & Cabezón, E. (2018). Conjugation inhibitors compete with palmitic acid for binding to the conjugative traffic ATPase TrwD, providing a mechanism to inhibit bacterial conjugation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16923–16930. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004716>
- Habboush, Y., & Guzman, N. (2023). Antibiotic Resistance. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- Händel, N., Schuurmans, J. M., Brul, S., & ter Kuile, B. H. (2013). Compensation of the Metabolic Costs of Antibiotic Resistance by Physiological Adaptation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3752–3762. <https://doi.org/10.1128/AAC.02096-12>
- Idle, J. R., & Gonzalez, F. J. (2007). Metabolomics. *Cell Metabolism*, 6(5), 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.005>
- ISO 20776-1. (2021). *Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana*.

- Iyer, G., Brandenburg, M., Patsalis, C., Michailidis, G., & Karnovsky, A. (2023). CorrelationCalculator and Filigree: Tools for Data-Driven Network Analysis of Metabolomics Data. *Journal of Visualized Experiments*, 201. <https://doi.org/10.3791/65512>
- Jiang, M., Su, Y., Ye, J., Li, H., Kuang, S., Wu, J., Li, S., Peng, X., & Peng, B. (2023). Ampicillin-controlled glucose metabolism manipulates the transition from tolerance to resistance in bacteria. *Science Advances*, 9(10). <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade8582>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Kok, M., Maton, L., van der Peet, M., Hankemeier, T., & van Hasselt, J. G. C. (2022). Unraveling antimicrobial resistance using metabolomics. *Drug Discovery Today*, 27(6), 1774–1783. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.03.015>
- Lammers, A., Zweers, H., Sandfeld, T., Bilde, T., Garbeva, P., Schramm, A., & Lalk, M. (2021). Antimicrobial Compounds in the Volatilome of Social Spider Communities. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700693>
- Le Berre, M., Gerlach, J. Q., Dziembała, I., & Kilcoyne, M. (2022). *Calculating Half Maximal Inhibitory Concentration (IC50) Values from Glycomics Microarray Data Using GraphPad Prism* (pp. 89–111). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2148-6_6
- Lechuga-Varela, I. (2018). *Sensibilidad bacteriana a los antibióticos comerciales Amoxicilina y Ciprofloxacino*. [Tesis de grado, Universidad de A Coruña]. https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21169/LechugaVarela_Isabel_TFG_201

8.pdf?sequence=2&isAllowed=y#:~:text=El%20valor%20IC50%20es%20la,bacteria%20en%20ausencia%20del%20antibi%C3%B3tico.

Li, W., Tailhades, J., O'Brien-Simpson, N. M., Separovic, F., Otvos, L., Hossain, M. A., & Wade, J. D. (2014). Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. *Amino Acids*, 46(10), 2287–2294. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1820-1>

Lin, Y., Li, W., Sun, L., Lin, Z., Jiang, Y., Ling, Y., & Lin, X. (2019). Comparative metabolomics shows the metabolic profiles fluctuate in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains. *Journal of Proteomics*, 207, 103468. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103468>

MacDermott-Opeskin, H. I., Gupta, V., & O'Mara, M. L. (2022). Lipid-mediated antimicrobial resistance: a phantom menace or a new hope? *Biophysical Reviews*, 14(1), 145–162. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00912-8>

Maridueña-Zavala, M. G., Freire-Peñaherrera, A., Cevallos-Cevallos, J. M., & Peralta, E. L. (2017a). GC-MS metabolite profiling of *Phytophthora infestans* resistant to metalaxyl. *European Journal of Plant Pathology*, 149(3), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1204-y>

Maridueña-Zavala, M. G., Freire-Peñaherrera, A., Cevallos-Cevallos, J. M., & Peralta, E. L. (2017b). GC-MS metabolite profiling of *Phytophthora infestans* resistant to metalaxyl. *European Journal of Plant Pathology*, 149(3), 563–574. <https://doi.org/10.1007/S10658-017-1204-Y/METRICS>

- Martínez, J. L., & Rojo, F. (2011). Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 768–789. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00282.x>
- Mora-Ochomogo, M., & Lohans, C. T. (2021). β -Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates. *RSC Medicinal Chemistry*, 12(10), 1623–1639. <https://doi.org/10.1039/D1MD00200G>
- Morar, M., & Wright, G. D. (2010). The Genomic Enzymology of Antibiotic Resistance. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163517>
- OMS. (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. *World Health Organization.*, 256.
- OMS. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- OMS. (2022). *Un informe pone de relieve el aumento de la resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas que afectan al ser humano y la necesidad de mejorar los datos al respecto*. Comunicado de prensa. <https://www.who.int/es/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>
- Patil, S., Chen, H., Chen, Y., Dong, S., Mai, H., Lopes, B. S., Liu, S., & Wen, F. (2023). Trends in Antibiotic Resistance Patterns and Burden of Escherichia Coli Infections in Young Children: A Retrospective Cross-Sectional Study in Shenzhen, China from 2014–2018.

Infection and Drug Resistance, Volume 16, 5501–5510.

<https://doi.org/10.2147/IDR.S425728>

Putri, S. P., Ikram, M. M. M., Sato, A., Dahlan, H. A., Rahmawati, D., Ohto, Y., & Fukusaki, E. (2022). Application of gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics in food science and technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 133(5), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.01.011>

Radoš, D., Donati, S., Lempp, M., Rapp, J., & Link, H. (2022). Homeostasis of the biosynthetic E. coli metabolome. *iScience*, 25(7), 104503. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104503>

Ramírez-Condoy, O., Jerves-Andrade, L., Abril, A., & Redrován-Berrezueta, M. (2022). Determinación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales frente a *Enterococcus faecalis*. *MASKANA*, 13(1), 52–57. <https://doi.org/10.18537/mskn.13.01.07>

Reyes S, M., Durán T, C., & Prado J, V. (2004). Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de E coli productoras de Shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. *Revista médica de Chile*, 132(10). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872004001000008>

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.3.482>

Ross, J., Larco, D., Colon, O., Coalson, J., Gaus, D., Taylor, K., & Lee, S. (2020). Índices de resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos en Santo Domingo, Ecuador. *Práctica Familiar Rural*, 5(1). <https://doi.org/10.23936/pfr.v5i1.144>

- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., & Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, *18*, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006>
- Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, *24*(4), 814. <https://doi.org/10.1039/b507392h>
- Soni, V., Wang, Z., & Singh, V. (2023). Editorial: Bacterial metabolomics approach towards antimicrobials and resistance. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1222594>
- Sykes, J. E., & Papich, M. G. (2014). Antibacterial Drugs. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 66–86. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00008-9>
- Upmanyu, N., & Malviya, V. N. (2020). Antibiotics: mechanisms of action and modern challenges. En *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 367–382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00018-8>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, *40*(4), 277. <https://doi.org/Article>
- Voigt, M., Bartels, I., Nickisch-Hartfiel, A., & Jaeger, M. (2019). Determination of minimum inhibitory concentration and half maximal inhibitory concentration of antibiotics and their degradation products to assess the eco-toxicological potential. *Toxicological &*

Environmental Chemistry, 101(3–6), 315–338.
<https://doi.org/10.1080/02772248.2019.1687706>

Wang, J. H., Byun, J., & Pennathur, S. (2010). Analytical Approaches to Metabolomics and Applications to Systems Biology. *Seminars in Nephrology*, 30(5), 500–511.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.07.007>

Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>

Yang, X., & Wang, H. (2014). Escherichia Coli: Pathogenic E. coli (Introduction). *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 695–701.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00383-9>

Zampieri, M., Zimmermann, M., Claassen, M., & Sauer, U. (2017a). Nontargeted Metabolomics Reveals the Multilevel Response to Antibiotic Perturbations. *Cell Reports*, 19(6), 1214–1228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.002>

Zampieri, M., Zimmermann, M., Claassen, M., & Sauer, U. (2017b). Nontargeted Metabolomics Reveals the Multilevel Response to Antibiotic Perturbations. *Cell Reports*, 19(6), 1214–1228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.002>

Anexos

Anexo 1. *Equipos empleados en el proceso experimental de extracción de metabolitos e IC₅₀*

| Equipo | Marca |
|---|-------------------|
| Incubadora | Lab-Line™ |
| Centrífuga refrigerada | Thermo Scientific |
| Microcentrífuga | Eppendorf |
| Espectrofotometro UV-Vis | |
| Densitómetro McFarland | Biomérieux |
| Refrigeradora | |
| Baño María | KACIL™ |
| Cabina de Flujo Laminar | LabConco™ |
| Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas | Alligent T. |
| Balanza analítica | JY™ |
| Cabina de Bioseguridad | |
| Autoclave | |

Nota. Elaborado por los autores (2024)

Anexo 2. Reactivos empleados en el proceso experimental de extracción de metabolitos

| Reactivos | Fórmula |
|--------------------------|--|
| Metanol | CH ₃ OH |
| Cloroformo | CHCl ₃ |
| Hexano | C ₆ H ₁₄ |
| MSTFA | CF ₃ CON(CH ₃)Si(CH ₃) ₃ |
| Ampicilina 300 000 µg/ml | C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S |

Nota. Elaborado por los autores (2024)

Anexo 3. Medios de cultivos utilizados para reactivación y cultivo de cepas

| Medio de cultivo | Casa comercial |
|-------------------------|-------------------------------|
| Medio LB | Invitrogen™ |
| Agar TSA | Difco™ |
| Medio TSB | Merck Millipore Sigma-Aldrich |

Nota. Elaborado por los autores (2024)

Anexo 4. Soluciones utilizadas en el proceso experimental de extracción de metabolitos

| Soluciones | Composición |
|----------------------------------|---|
| Solución Salina | NaCl al 0,85% en H ₂ O |
| Solución Metanol/Cloroformo/Agua | 80% de Metanol, 10% de Cloroformo y 10% de Agua. |

Nota. Elaborado por los autores (2024)

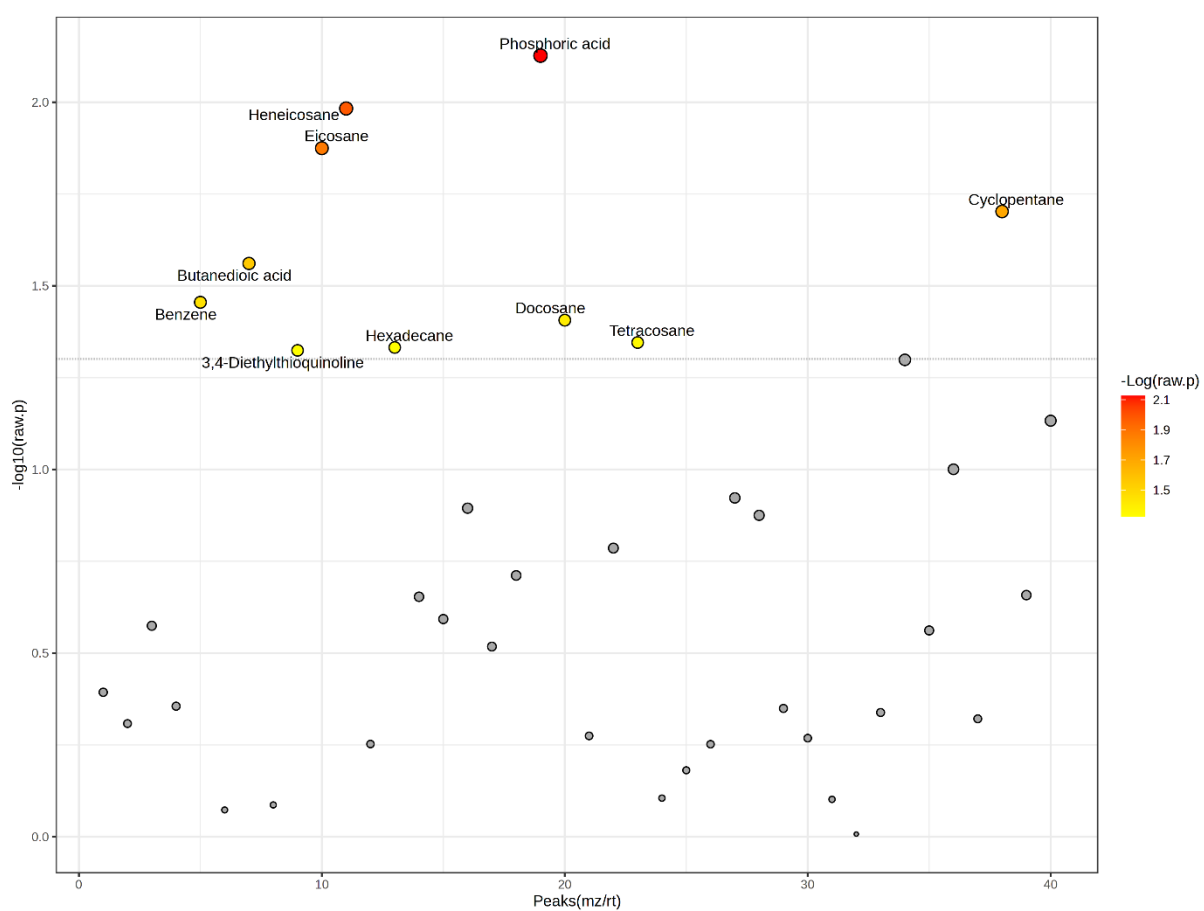
Anexo 5. Concentraciones de ampicilina usadas en cada cepa

| Cepa <i>E. coli</i> | Concentración de antibiótico | Volumen de Antibiótico | Volumen de medio LB |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Grupo 1 | S1 | 700 μ l | 29,30 ml |
| Grupo 2 | S1 | 58,04 μ l | 29,94 ml |
| Grupo 3 | S1 | 30,46 μ l | 29,97 ml |
| Grupo 4 | S1 | 71,96 μ l | 29,93 ml |
| Grupo 5 | S1 | 848,35 μ l | 29, 15 ml |
| Grupo 6 | S1 | 71,96 μ l | 29,93 ml |
| Grupo 7 | S1 | 539,98 μ l | 29,46 ml |
| Grupo 8 | S1 | 934 μ l | 29,06 ml |
| Grupo 9 | S1 | 718,5 μ l | 29,28 ml |
| Grupo 10 | S1 | 666.4 μ l | 29.33 ml |
| Grupo 11 | S1 | 243 μ l | 29,75 ml |
| Grupo 12 | S1 | 361 μ l | 29,63 ml |
| Grupo 13 | S1 | 145,1 μ l | 29,85 ml |
| Grupo 14 | S1 | 1553 μ l | 28,47 ml |
| Grupo 15 | S1 | 1250 μ l | 28,75 ml |
| Grupo 16 | S1 | 1740 μ l | 28,26 ml |
| Grupo 17 | S3 | 58 μ l | 29,94 ml |
| Grupo 18 | S1 | 3000 μ l | 27 ml |
| Grupo 19 | S3 | 329 μ l | 29,67 ml |
| Grupo 20 | S3 | 687 μ l | 29,31 ml |
| Grupo 21 | S1 | 104 μ l | 29,89 ml |

| | | | |
|----------|----|-------------|----------|
| Grupo 22 | SC | 304 μ l | 29,69 ml |
| Grupo 23 | SC | 750 μ l | 29,24 ml |
| Grupo 24 | SC | 883 μ l | 29,11 ml |

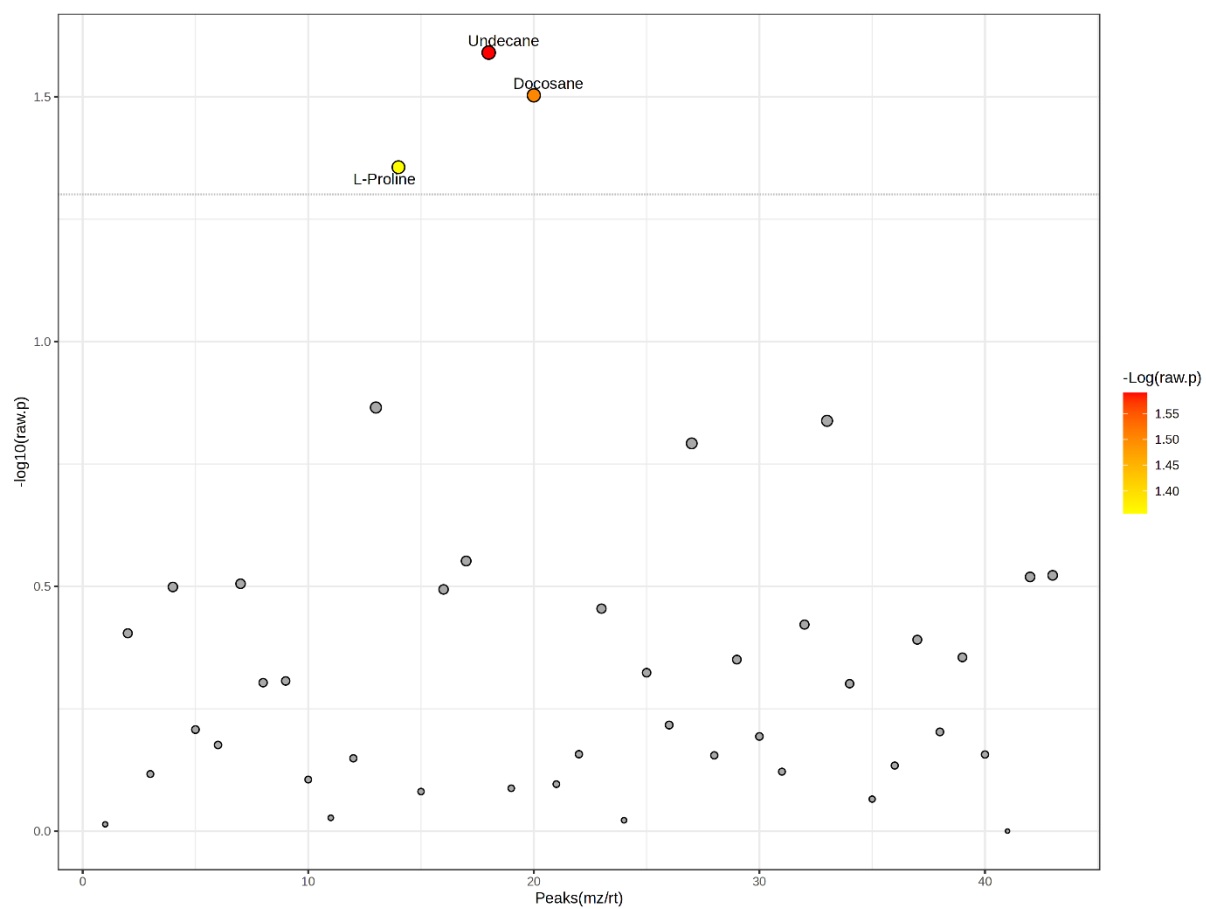
Nota. Elaborado por los autores (2024)

Anexo 6. Metabolitos más significantes de cepas sensibles a partir de T-Test con un $p < 0.05$



Nota. Extraído de *MetaboAnalyst 6.0*, por los autores (2024)

Anexo 7. Metabolitos más significantes de cepas resistentes a partir de T-Test con un $p < 0.05$



Nota. Extraído de *MetaboAnalyst 6.0*, por los autores (2024)