

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**IDENTIFICACIÓN DE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS DE CEPAS NATIVAS
DE *EESCHERICHIA COLI*, *SALMONELLA TYPHI*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
Y *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* UTILIZANDO LA TÉCNICA DE
CROMATOGRAFÍA DE GASES**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

**CÉSAR AUGUSTO GODÍNEZ MOLLINEDO
CLAUDIA LUCRECIA VALENZUELA MEJÍA
CLAUDIA MARÍA MÉRIDA ALEMÁN
LIONEL GUILLERMO ALONSO TOASPERN
MARÍA EUGENIA ZALDANA PÉREZ**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICOS BIÓLOGOS**

GUATEMALA, SEPTIEMBRE 2014

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph. D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia, por brindarnos las herramientas y los conocimientos necesarios que hoy nos hace unos profesionales.

A nuestros asesores, Licenciados Vinicio García y Eduardo Robles, que con sus conocimientos y buenos consejos llegamos al final de esta senda de conocimiento que termina pero que da paso a una nueva que comienza.

A nuestro revisor, el Doctor Rubén Velásquez, que logró explotar al máximo nuestras cualidades de investigación a manera de fortalecer nuestro desarrollo como profesionales.

Y a todos los que pusieron un granito de arena para culminar este seminario y quienes nos acompañaron en este viaje inolvidable...

Infinitas GRACIAS!!!

DEDICATORIA

A Dios,

Por habernos acompañado y guiado a lo largo de nuestra carrera, por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizajes, experiencias y bendiciones interminables.

A nuestros Padres,

Por ser un pilar importante en nuestras vidas, que nos brindaron la oportunidad de tener la mejor educación y por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A nuestros Hermanos,

Que nos apoyaron a lo largo de este camino, y quienes han compartido con nosotros nuestras alegrías y tristezas.

A nuestros Esposos y parejas,

Porque el amor es realmente el milagro más grande que un ser puede compartir, gracias por ser parte de nuestras vidas y estar allí en todo momento.

A mis hijos,

Que son el motor de mi vida. Gracias por su paciencia y apoyo incondicional en este logro que también es suyo.

A nuestras Familias, amigos y a todas esas personas especiales,

Quienes con su amor, apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre a lo largo de nuestra vida estudiantil; a ellos que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido incentivos en nuestras vidas.

ESTE TRIUNFO, ES DE USTEDES

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Características Generales de los Microorganismos seleccionados	3
3.2 Métodos utilizados para la identificación de los microorganismos	9
3.3 Cromatografía de Gases	11
3.4 Aspectos técnicos	13
3.5 Estudios previos	14
4. JUSTIFICACION	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo General	18
5.2 Objetivos Específicos	18
6 MATERIALES Y METODOS	19
6.1 Materiales	19
6.2 Recursos	21
6.3 Universo de trabajo y muestra	21
6.4 Diseño de la investigación	22
6.5 Metodología	22
7 RESULTADOS	26
8 DISCUSION DE RESULTADOS	30
9 CONCLUSIONES	36
10 RECOMENDACIONES	38

11 REFERENCIAS

39

12 ANEXOS

44

1. RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo identificar los perfiles de ácidos grasos presentes en las membranas celulares de un grupo de cepas nativas, para ello se analizaron 96 cepas de *Escherichia coli*, 96 cepas de *Salmonella typhi*, 93 cepas de *Staphylococcus aureus* y 93 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, para comparar y diferenciar cada uno de los microorganismos, utilizando la técnica de Cromatografía de gases.

Los ácidos grasos fueron determinados por cromatografía de gases, después de preparar y extraer sus derivados metilados mediante metóxido de sodio, a partir de cultivos puros de cada cepa estudiada. Las condiciones de análisis cromatográfico utilizadas habían sido optimizadas con anterioridad. La presencia y la cantidad relativa de los ácidos grasos, para cada cepa, fueron establecidos a partir del análisis de los cromatogramas de la determinación de cada cepa fueron identificados y con la ayuda del software AMDIS32 versión 2.66. Los resultados de la cuantificación de todas las cepas de una misma especie, fueron utilizados para elaborar un perfil, en donde se consignan los ácidos grasos presentes y un promedio (con sus desviaciones estándar), de su cantidad relativa expresada como porcentaje de área.

Se obtuvieron 35 ácidos grasos identificados (12 para *E. coli*, 13 para *S. typhi*, 10 para *S. aureus* y 10 para *P. aeruginosa*) con esterios metílicos de cadena saturada como insaturada a excepción de *S. aureus* que tiene únicamente cadenas saturadas. Las cepas nativas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, presentaron al menos seis ácidos grasos exclusivos que pueden servir como un importante indicador de identidad de estas especies.

2. INTRODUCCIÓN

En la taxonomía de las bacterias, hongos y levaduras, se han utilizado numerosos criterios de clasificación tales como la morfología, fisiología, actividad enzimática sobre substratos, estructura antigénica y otros recursos que se han ido acumulando empíricamente durante años. En tiempos más recientes, se han incorporado otras nuevas técnicas de identificación como los métodos cromatográficos, que determinan el perfil de los ácidos grasos. (Rev; 2001).

Los perfiles de ácidos grasos se pueden utilizar para la identificación de bacterias con un previo cultivo y aislamiento. Estos ácidos grasos son ácidos orgánicos de cadena larga que están presentes en el extracto de células bacterianas y su composición es característica en cada especie, lo cual permite la diferenciación entre ellas (Robles et al; 2002).

Esta técnica ha sido empleada exitosamente en la identificación de las familias bacterianas. En 1963 Abel et. al, sugirieron la clasificación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*. En 1967 Kaneda realizó el aislamiento e identificación de los ácidos grasos celulares de *Bacillus subtilis*. Posteriormente este método fue usado por investigadores como: Brooks, et. al. (1971); Moss y Nuñez (1978); Bousfield, et. al. (1983); Vets, et. al. (1989); Hidetoshi, et. al. (1990); Shanta y Napolitano (1992); Srinivas, et. al. (1994); Murray, et. al. (1995); Chou, et. al. (1996) (Robles 1999).

En el presente trabajo de investigación se utilizó la técnica de cromatografía de gases con el objetivo de identificar los perfiles de ácidos grasos en un grupo de cepas nativas de las especies de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mismas que fueron aisladas y caracterizadas por técnicas convencionales a partir de muestras clínicas.

3. ANTECEDENTES

3.1. Características generales de los microorganismos seleccionados

3.1.1 *Escherichia coli*

Es una de las especies bacterianas más estudiadas, no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato, modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Es una bacteria de rápido crecimiento y de amplia distribución en el suelo, agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de esta enterobacteria en patología humana puede cuantificarse constatando que constituye el 50 % aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos (Koneman 2008; Uzzau 2000; Humbert 2000; Donnenberg 2001; Neidhart 1999).

Escherichia coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, estableciendo con el huésped una relación estable de mutuo beneficio, como síntesis de vitaminas, antagonistas de elementos cancerígenos. Por el contrario cuando estas bacterias comensales son introducidas en algún otro lugar como el tracto urinario o el peritoneo y se dan condiciones para su desarrollo, la persona sufre una infección que le es perjudicial. También se le considera un microorganismo indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de bacterias coliformes. (Humbert, 2000; De la Rosa 2003).

3.1.1.1. Descripción etiológica

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, catalasa positivo, reduce el nitrato en nitrito, es móvil,

produce ácido a partir de glucosa, arabinosa y habitualmente de la lactosa y otros azúcares; crece en agar MacConkey, son de fácil cultivo y poseedor de una proporción G+C¹ de 39 a 59 % en su DNA. No produce esporas y su temperatura óptima de crecimiento es entre 22 °C y 37 °C (Donnenberg, 2001; Neidhart 1999).

3.1.1.2. Identificación

Existen diversos tipos de pruebas bioquímicas para la identificación de ésta bacteria dependiendo del medio y procedimiento que se aplique. Al identificar *Escherichia coli*, se obtiene resultados positivos en las pruebas de rojo de metilo, indol y citrato. Se observa resultados negativos en las pruebas de oxidasa, agar citrato y Vogues Proskauer (Koneman, 2008; Boop, 1999).

3.1.1.3. Clasificación

Se clasifican en más de 170 serogrupos O (según las características antigénicas de sus lipopolisacáridos) y en serotipos (por la combinación de antígenos somáticos "O" y "H" flagelares). Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación. (Koneman, 2008; Brock, 1998; Gadea, 1998)

3.1.1.4. Patogenicidad

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroinvasiva, enteropatógena, enteroagregativa y adherencia difusa. Una vez el organismo se encuentra en el tracto digestivo, se adhiere, coloniza y prolifera en la superficie del intestino delgado proximal para posteriormente producir enfermedad mediante dos mecanismos patogénicos: 1. Adhesión y 2. Producción de enterotoxinas. Los mecanismos por los cuales las cepas patógenas de *E. coli* se adhieren para colonizar la mucosa intestinal han sido

¹ Guanina y Citocina

objeto de muchas investigaciones. *E. coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes inmunocomprometidos, en situaciones de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.). (Boop, 1999; Romero, 2002).

3.1.2 *Salmonella typhi*

El género *Salmonella* sp. Fue descrito a principios del siglo XX por el bacteriólogo estadounidense Theobald Smith, recibiendo el nombre por su jefe David Salmon. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Las salmonellas son bacterias entéricas, es decir que se alojan en el intestino y su taxonomía es compleja. (Brock, 1998).

3.1.2.1. Descripción etiológica

El género *Salmonella* es Gram negativo, morfología de bacilos o cilindros con puntas redondas. La bacteria *Salmonella typhi* es anaeróbica facultativa, no produce esporas y la mayoría de cepas son móviles debido a que poseen flagelos peritricos que rodean la célula. (Brock 1998)

3.1.2.2. Identificación

Salmonella typhi produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sorbitol, sin la producción de gas; por otro lado, no fermenta la lactosa, sacarosa, ramnosa y otras azúcares. Produce nitrito a partir de nitrato también produce ácido sulfhídrico; su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. (Brock, 1998)

3.1.2.3. Clasificación

La clasificación taxonómica del género *salmonella* es problemática. Por una parte, los estudios de homología del ácido desoxirribonucleico (ADN) han demostrado que este género está formado por dos especies: *Salmonella entérica* y *Shigella bongori*. *S. entérica* se subdivide, a

su vez, en seis subespecies, y la mayor parte de los patógenos del ser humano se incluye en la primera subespecie. *S. entérica subespecie, entérica*. Lamentablemente, las dos especies se han subdividido en más de 2500 serotipos diferentes; tradicionalmente se han llamado especies a los numerosos serotipos por ejemplo. *S. typhi, typhymurium, entre otras* (Murray, 2006).

3.1.2.4. Patogenicidad

S. typhi causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospederos. El ser humano se infecta por vía fecal-oral a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados. El período de incubación para *S. typhi* abarca de una semana a un mes, aunque se registra principalmente de dos semanas, a partir de la ingesta de la bacteria proveniente de alimentos o agua contaminada. La fiebre tifoidea prevalece principalmente en países en vías de desarrollo, donde normalmente significa un reto a las autoridades encargadas de la salud pública. (Brock, 1998)

3.1.3 *Staphylococcus aureus*

Las bacterias del género *Staphylococcus* sp. Son microorganismos ubicuos difíciles de eliminar, colonizan ambientes muy dispares formando parte de la microbiota habitual de la piel, garganta y fosas nasales de sus hospedadores vertebrados. (Brock, 1998)

3.1.3.1. Descripción etiológica

Las bacterias del género *Staphylococcus* sp. Son cocos Gram positivo, inmóviles, anaerobios facultativos y no forman esporas. Se pueden observar en pares, tétradas o formando racimos irregulares. Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y cito toxinas que incluyen 4 hemolisinas nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa. La principal

función de estas proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano. En pacientes inmunocomprometidos, *Staphylococcus aureus* se comporta como un patógeno humano. Está relacionado con un amplio espectro de infecciones (Murray, 2006; Dinges, 2000).

3.1.3.2. Identificación

El medio más empleado en los laboratorios clínicos para aislar *Staphylococcus aureus* es el medio agar manitol sal, fermenta el manitol con producción de ácido. Inicialmente la detección de catalasa permite diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* del género *Micrococcus*, que es también catalasa positivo pero no fermenta glucosa en anaerobiosis (Pahissa, 2009).

3.1.3.3. Clasificación

La mayoría de las cepas de estafilococos son productoras de enzimas (nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas) y citotoxinas (las denominadas hemolisinas α , β , δ y γ) que contribuyen a transformar los tejidos del hospedero en substrato para su crecimiento y desarrollo. (De León, 2008).

3.1.3.4. Patogenicidad

Algunas especies de estafilococos son productoras de proteínas no glúcidas de bajo peso molecular (Mr. 22,000-31,000) conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SEs). *Staphylococcus aureus* produce alrededor de 11 serotipos distintos de SEs, además de otras toxinas de gran virulencia para los mamíferos denominadas Toxinas del Síndrome del Shock Tóxico (TSST-1) y Síndrome de la Piel Escaldada ETA y ETB. Estas enterotoxinas son causa de intoxicaciones alimentarias por la ingesta de productos contaminados de origen cárnico y

lácteo. Los factores de virulencia en su mayoría, son componentes de la pared celular y una variedad de exoproteínas que facilitan la colonización de nuevos hábitats. Estas propiedades, hacen que los estafilococos sean la causa de numerosas infecciones en mamíferos, que van desde afecciones superficiales de la piel a patologías severas como neumonías, meningitis, intoxicaciones alimentarias, shock séptico y desórdenes autoinmunes, además de ser un microorganismo de gran preocupación como agente de infecciones nosocomiales fulminantes. (De León, 2008).

3.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Este género de La familia *Pseudomonadaceae*, esta conformado por una gran variedad de especies que habitan en El suelo y en las aguas estancadas, y Forman parte de la microbiota nativa Del intestino de varias especies animales. Son de vida libre, y se encuentran en el material orgánico em descomposición, donde tienen un importante papel en su degradación. Algunas especies son patógenos de plantas, mientras que otras pueden producir infecciones en animales, y solo unas pocas se han encontrado em infecciones humanas. El patógeno de mayor importancia médica es *Pseudomonas aeruginosa*, que se da em infecciones nosocomiales y em pacientes inmunodeficientes, y presenta una elevada mortalidad (Romero, 2002).

3.1.4.1. Descripción etiológica

Esta especie se ha encontrado frecuentemente em infecciones hospitalarias. Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* se observan más frecuentemente em personas con inmunidad deprimida, em los que sufren quemaduras, em enfermos con alteraciones metabólicas como la diabetes, em pacientes con neoplasias malignas y em convalecientes que han sido

sometidos a instrumentación o cateterismo. Con frecuencia se manifiesta infecciones urinarias en personas de edad avanzada y debe cuidarse de las infecciones por este agente a los pacientes sometidos a drogas inmunosupresoras (Romero, 2002).

3.1.4.2. Identificación

Catalasa y oxidasa con resultado positivo, produce amoníaco a partir de la arginina y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. (Brock, 1998)

3.1.4.3. Patogenicidad

Produce infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Puede manifestarse como infección de vías urinarias nosocomial, meningitis, septicemia, bacteriemia, ectima gangrenoso, enterocolitis, infecciones de quemaduras y heridas, neumonía primaria, neumonía necrotizantes, infecciones pulmonares crónicas, osteomielitis, infecciones de la piel y tejidos blandos, otitis crónica externa, otitis media crónica y otitis externa maligna, endocarditis, infecciones oculares, queratitis y paroniquia (Romero, 2002)

3.2. Métodos utilizados para la identificación de los microorganismos

La identificación bacteriana actualmente se realiza por medio de métodos basados en criterios morfológicos, tinciones diferenciales, pruebas bioquímicas y serológicas. (Gamero, 2005)

Los métodos basados en los criterios morfológicos han ayudado durante muchos años a clasificar a los microorganismos. La tinción diferencial de Gram aporta dos ideas básicas para la

definición “taxonómica” de las bacterias: el color que adquieren tras la tinción y la forma que presentan las células bacterianas. De aquí radica su importancia. (Gamero, 2005).

Los medios de cultivos permiten el crecimiento de los microorganismos a partir de una muestra (secreciones corporales, alimentos, agua, etc.) hasta obtener un aislamiento puro de la bacteria de interés, para lo cual se pueden utilizar medios de cultivo enriquecidos, selectivos, diferenciales, etc. (Gamero, 2005).

Las pruebas bioquímicas han sido ampliamente utilizadas para diferenciar bacterias. Estas pruebas se fundamentan principalmente en la fermentación de azúcares, presencia de enzimas, degradación de compuestos, producción de compuestos coloreados, etc. Aun bacterias fuertemente relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes con base a pruebas bioquímicas. (Gamero, 2005).

Los métodos serológicos, implican la utilización de preparaciones de inmunoglobulinas específicas provenientes del suero o de un reactivo y que pueden ser de gran utilidad en la identificación microbiana en muestras puras o biológicas. Cada uno de los métodos tiene su fundamento particular, pero en líneas generales, todos se basan en la reacción de un antígeno presente en el agente microbiano con su anticuerpo correspondiente. (Gamero, 2005).

En general, la identificación de un agente patógeno se realiza con la ayuda de la observación de los síntomas manifestados por el paciente y la combinación de estos métodos a partir de cultivos de microorganismos, obtenidos en condiciones de laboratorio sumamente controladas (Anexo No. 1). Esto conduce a procedimientos largos y meticulosos que absorben gran cantidad de tiempo (Romero, 2007).

En años recientes se han comercializado instrumentos automatizados que caracterizan microorganismos sobre la base del monitoreo espectroscópico de reacciones enzimáticas. Otra técnica para la identificación de microorganismos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la caracterización de genes basada en la amplificación del material genético (ADN) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (Fenselau, 1994).

Campo pulsado, es una técnica utilizada en la vigilancia epidemiológica molecular que sirve para asociar o discriminar un caso de otro; causado por una bacteria en particular basado en análisis de la similitud o discordancia de los patrones de ADN (Fenselau, 1994).

Instrumentos automáticos para caracterización quimiotaxonómica también han sido comercializados y están basados en el análisis del perfil de ácidos grasos presentes en las paredes celulares por cromatografía de gases. (Fenselau, 1994)

3.3. Cromatografía de Gases

3.3.1 Historia

Las investigaciones sobre los constituyentes de las células específicamente el contenido de ácidos grasos, a través de la cromatografía gas-líquido tiene sus inicios en 1952 cuando James y Martin obtuvieron por primera vez la separación de algunos ácidos grasos volátiles (James, 1952).

3.3.2 Definición

La cromatografía de gases incluye todos los sistemas cromatográficos en los que la fase móvil es un gas. Puede considerarse como el método de separación más importante. (Hernández, 2002).

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, generalmente helio o nitrógeno. En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. Actualmente, las más empleadas son las columnas capilares. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. (Hernández, 2002).

Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados (Hernández, 2002).

3.3.3 Descripción de la técnica:

3.3.3.1 Fase móvil: La fase móvil gaseosa proporciona un rápido equilibrio entre las fases con mayor eficiencia en la obtención de los análisis. Los gases más utilizados son: nitrógeno, helio, hidrógeno y argón. La fase móvil no debe interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra, debe tener bajo costo, ser compatible con el detector y tener alta pureza. Para dar una mayor reproducibilidad al análisis, la saturación del gas debe ser constante y debe ser controlada a través de válvulas de aguja (Shantha, 1992).

3.3.3.2. Sistemas de inyección: La inyección se realiza generalmente con microjeringas que contienen la muestra. El volumen inyectado no debe superar la capacidad de la columna y entre más pequeño sea el volumen usado de la muestra mayor será la eficiencia y la reproducibilidad del análisis. La temperatura aplicada debe ser suficiente para la volatilización de la muestra (Shantha, 1992).

3.3.3.3. Columnas: La columna consiste en un tubo largo que contiene la fase estacionaria. Los materiales más usados son el cobre, el acero, el aluminio, el vidrio y el teflón. El material de la columna no debe interaccionar con la fase estacionaria ni con la muestra (Shantha, 1992).

3.4 Aspectos técnicos

Existen varios tipos de columnas para cromatografía de gases (GC), las cuales son: empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Las columnas tubulares abiertas de sílice fundida están construidas de sílice purificada de óxidos metálicos. Los capilares así obtenidos tienen paredes mucho más delgadas que sus equivalentes de vidrio y luego se recubren con una capa de poliimida para reforzarlas. (Hernández, 2002; Synder, 1998; Ratledge, 1988).

Las columnas obtenidas mediante esta técnica son flexibles y pueden enrollarse longitudes considerables en cilindros de unos cuantos centímetros de diámetro. Los recubrimientos de las columnas para gas-líquido suelen ser: polidimetilsiloxano, el cual alcanza una temperatura máxima de 350 °C y su aplicación es de uso general, hidrocarburos, compuestos aromáticos, drogas, esteroides y PCBs. Poli(fenilmetildifenil)siloxano 10 %, para ácidos grasos, alcaloides, drogas, compuestos halogenados. Polifenilmetilsiloxano 50 %, para drogas,

esteroides, pesticidas y glicoles. Polietilenglicoles, para ácidos libres, alcoholes, éteres, aceites esenciales y glicoles. (Kates, 1999; Huang, 1992; Terrence, 1998)

Existen tres técnicas básicas de inyección de muestras (líquidas o gaseosas) en columnas capilares: split, split-less y en columna. Las dos primeras consisten en inyectar y vaporizar la muestra en una cámara de vaporización. El sistema split desvía la mayor parte de la muestra fuera del sistema cromatográfico y envía sólo una pequeña fracción a la columna. El método split-less dirige toda la muestra a la columna, por lo que resulta más adecuado para el análisis de trazas o de componentes muy volátiles. La inyección en columna se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización que podría producir la descomposición de los compuestos termolábiles (Synder, 1998).

En ocasiones, por ejemplo en el caso de muestras de tejidos, se desean analizar los componentes volátiles contenidos en muestras sólidas. En tal caso, es necesario efectuar una extracción previa con un disolvente adecuado e inyectar el extracto en la columna. (Synder, 1998).

La extracción de espacio en cabeza (HS: "head-space") es una alternativa más rápida a la extracción en Soxhlet², que además evita la pérdida de los componentes más volátiles. En este método, la muestra sólida se coloca en un vial sellado con un septum y se calienta durante un tiempo determinado a la temperatura fijada. Durante esta operación, la mayor parte de los compuestos volátiles se transfieren al aire del vial, denominado espacio de cabeza. Se calienta el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio. Seguidamente, con una jeringa se toma una

² Consiste básicamente en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente, que va "lavando o extrayendo, los componentes más solubles en el.

alícuota del aire del vial y se inyecta en el cromatógrafo. La aguja de la jeringa debe calentarse a la misma temperatura que la muestra para evitar condensaciones sobre la misma (Synder, 1998).

3.5 Estudios Previos

En 1967 Kaneda realizó el aislamiento e identificación de los ácidos grasos de *Bacillus subtilis*, en 1963 Abet *et-al* sugirieron la clasificación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*, ambos mediante el análisis de Cromatografía de Gases. (Kaneda 1967,)

Claudio T en el 2009 en su trabajo de tesis: caracterización de microorganismos por medio de cromatografía de gases acopada a espectrometría de masas. Desarrollo una metodología adecuada para el análisis de ácidos grasos celulares de los microorganismos bajo estudio, realizando diversas pruebas para optimizar diferentes parámetros en la preparación de la muestra y análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Logro identificar picos exclusivos de cada microorganismo para su rápida identificación ya que al ser propios de cada bacteria, el encontrarlos en un cromatograma permite deducir inmediatamente de que microorganismo se trata, también reporta que *Staphylococcus aureus* posee tres pequeños picos exclusivos de la misma (Claudio, 2009).

En la publicación Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography–tándem mass spectrometry reportaron la distribución de tres diferentes bacterias siendo estas *Escherichia coli*, *Francisella novicida* y *Bacillus subtilis* realizando el estudio usando la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas, logrando diferenciar ácidos grasos exclusivos a cada bacterias, observaron que ácidos grasos hidroxilos se

encuentran en *E. coli* y *F. novicida* pero no en *B. subtilis*. ácidos grasos carboxílicos se encuentran en *E. coli* pero no en *F. novicida* o *B. subtilis* concluyendo de esa manera que los resultados de analizar ácidos grasos de bacterias utilizando cromatografía de gases es altamente específica para la identificación de microorganismos siendo también un método rápido y sensible (Yanyan 2010,).

4. JUSTIFICACIÓN

La presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* representa un problema de salud pública a nivel mundial. En países en desarrollo como Guatemala, la identificación de estas bacterias patógenas transmitidas por alimentos y agua contaminada es de vital importancia para la toma de decisiones en acciones de prevención, manejo y tratamiento de la salud de la población.

Actualmente, una gran cantidad de métodos de detección han sido desarrollados utilizando las propiedades ópticas, electroquímicas, bioquímicas y físicas de los diferentes microorganismos de importancia en la industria clínica, alimentaria y ambiental. A través del tiempo, estas técnicas microbiológicas han sido mejoradas y aplicadas en las áreas de preparación de muestras, procedimientos de cultivo, recuentos y elaboración de kits comerciales de identificación, entre otras. El uso de métodos cromatográficos con fines de identificación, recientemente han cobrado importancia en la microbiología.

La cromatografía de gases se ha convertido en una valiosa herramienta para la identificación de ácidos grasos de células bacterianas, siendo esta composición característica en cada especie, lo cual permite su diferenciación.

En Guatemala, existen trabajos previos en los que se han empleado los perfiles de ácidos grasos para la caracterización de bacterias en cepas ATCC. Sin embargo, no se habían realizado en “cepas nativas del país” por lo que esta investigación aportará datos que podrán ser útiles en futuras investigaciones acerca de la identificación de microorganismos por cromatografía de gases.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Identificar los perfiles de ácidos grasos de cepas nativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la técnica de Cromatografía de Gases.

5.2. Objetivos Específicos

5.2.1. Determinar los ácidos grasos característicos de cepas nativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2.2. Establecer los perfiles característicos de cepas nativas para las especies de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2.3. Determinar las diferencias y/o similitudes entre los perfiles de cepas nativas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.1.1. Cristalería

- Viales de 2 mL
- Probetas de 25 y 100 mL
- Pipetas Pasteur
- Beackers de 100 mL
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapas de rosca
- Tubos para cultivo de 10 mL
- Varillas de agitación
- Frascos ámbar de 100mL
- Vidrio de reloj

6.1.2. Reactivos

- Metanol grado CLAR (99.99% de pureza)
- Hexano grado CLAR (99.99% de pureza)
- Etanol (grado reactivo)
- Sodio metálico
- Helio 99.999 %

6.1.3. Equipo

- Campana de Bioseguridad tipo II Marca Telstar BV-30/70
- Incubadora Lab-line a 35 - 37 °C
- Incubadora Fischer Scientific a 42 °C

- Congelador Biomedical Freezer Sanyo a -20 °C
- Congelador Biomedical Freezer Sanyo a -70 °C
- Balanza marca Mettler –Toledo,estilo Classic Plus. máximo: 1500g y mínimo 0.5 g
- Microcentrifuga marca IEC Clinical
- Agitador Automático
- Agitador Vortex VWR, Scientific Products
- Micropipetas automáticas Thermo Scientific de 100-1000 µL
- Cromatógrafo de gases Hewlett- Packard 5890 II plus. (Anexo 3. Condiciones Cromatográficas)

6.1.4 Otros

- Asas de nicromo
- Puntas para micropipetas automáticas
- 1 Jeringa para inyección en CG (1µL)
- Gradilla para tubos de ensayo
- Agitadores magnéticos (2)
- Varillas de agitación (2)
- Espátula metálica
- Pinzas
- Bisturí o navaja
- Medios de cultivo: agar sangre, Muller Hinton, caldo tripticasa soya.
- Software AMDIS32 versión 2.66, utilizando la biblioteca NIST08.

6.2. Recursos

6.2.1. Institucionales

- Laboratorio de Fisicoquímica, Escuela de Química
- Unidad de Análisis Instrumental de la Escuela de Química, Facultad de CCQQ y Farmacia
- Laboratorio Nacional de Salud
- Facultad de CCQQ y Farmacia
- Biblioteca de la Facultad de CCQQ y Farmacia
- Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala

6.2.1. Humanos

Asesores:

- Licenciado Eduardo Robles
- Licenciado Vinicio García

Seminaristas

- César Augusto Godinez Mollinedo
- Claudia Lucrecia Valenzuela Mejía
- Claudia María Mérida Alemán
- Lionel Alonso Toasperm
- María Eugenia Zaldaña Pérez

6.3. Universo de Trabajo y muestra

6.3.1. Universo

El universo de trabajo está constituido por cepas nativas de *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* referidas al Laboratorio Nacional de Salud por los diferentes centros hospitalarios de la red Nacional de Salud en el año 2009.

6.3.1. Muestra

96 cepas nativas de *E. coli* y *S. typhi*.

93 cepas nativas de *S. aureus* y *P. Aeruginosa*

6.3.3. Unidad Muestral

Bacterias provenientes de cultivos re aislados en el área de bacteriología de la Unidad Central de Referencia y Vigilancia Epidemiológica del LNS.

6.4. Diseño de Investigación

6.4.1. Tipo de diseño: Descriptivo

6.4.3. Variables: cepas nativas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

- **Variable dependiente:** ácidos grasos características de cada cepa nativa.
- **Variable Independiente:** *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

6.5 Metodología

6.5.1 Recolección de cepas

Se recolectaron muestras con presencia de bacterias de *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* referidas por diferentes centros hospitalarios al Laboratorio Nacional de Salud

(LNS) en el año 2009. Se re aislaron las cepas nativas de cada especie en el área de bacteriología de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica del LNS.

6.5.2. Re aislamiento de cepas

Se tomó una asada de cepas almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación, y reconstituyéndola en caldo de tripticasa soya, luego se incubó a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para *E. coli*), de 2 a 3 horas y posterior inoculación en medios de cultivo de Agar sangre y Muller Hinton.

6.5.3. Obtención de la fase orgánica

a. Preparación de Metóxido de Sodio al 8% (p/v).

Con pinzas, se tomó una porción (aproximadamente 1g.) de sodio metálico y colocó en un vidrio de reloj retirando las partes oxidadas con un bisturí. Se cortó el resto de sodio en trozos pequeños hasta obtener aproximadamente 1g. La porción de sodio metálico se introdujo en 50mL de metanol grado absoluto contenido en un beacker de 100 mL. Con un agitador magnético, se homogenizó hasta disolver el sodio. Esta solución fue almacenada en tubos de ensayo con tapas de rosca a temperatura ambiente y en un lugar seco.

b. Extracción

Se agregaron 1500 μL de solución de Metóxido de Sodio al 8 % en un vial con tapa de rosca. Se disolvió dentro de este vial una asada de colonias re aisladas, agitándose en un

vortéx por aproximadamente un minuto, dejando reaccionar por otro minuto más. A esta solución, se agregaron 900 μL de hexano, agitándose por un minuto y centrifugando posteriormente. Se dejó reposar por varios minutos para lograr la sedimentación y separación de sus fases. La fase orgánica, en cuyo contenido se encuentran los derivados metilados para su análisis fue extraída con pipetas y se almacenó en viales con tapón de rosca.

6.5.4 Acondicionamiento de equipo

El equipo se acondicionó bajo las siguientes especificaciones: anexo No. 2.

- La temperatura del inyector: 230 °C
- Split ratio: 1:75
- Temperatura del horno: inicial 60 °C, gradiente de temperatura 2 °C/min. y final 280 °C.
- Tiempo total por corrida: 90 min.
- Volumen de inyección: 0.2 μL .
- Columna: Restek Rtx – 51 de 30 m, 0.25 mm diámetro interno y recubrimiento 0.5 μm .
- Flujo en columna: 20 ml/min.

Antes de realizar la inyección de las muestras, se corrió el método sin muestra (denominado blanco de aire) y posteriormente se inyectó el solvente sin muestra

(denominado blanco de solvente). Esto determinaría que las condiciones del equipo son óptimas para las muestras que se desean identificar y caracterizar.

6.5.5 Inyección

Agitando el vial de la muestra, se succionó 1 μL con la jeringa de cromatografía de gases asegurándose que no quedara aire dentro de la misma, inyectándola posteriormente en el cromatógrafo, de manera que atravesara el septum del puerto de inyección.

6.5.6 Interpretación y análisis

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados a través del software AMDIS32 versión 2.66, identificando los ácidos grasos en base a la biblioteca NIST. Los ácidos grasos fueron determinados como derivados metilados.

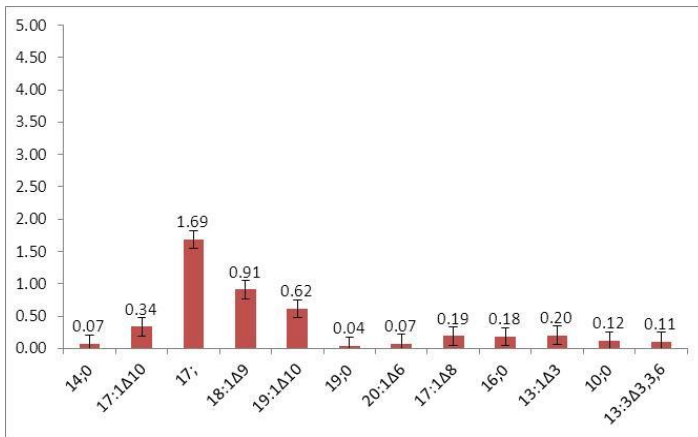
7. RESULTADOS

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos en cepas nativas de *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, expresados en promedio de porcentaje de área (%), \pm desviación estándar (SD).

Abreviatura	Fórmula	Nombre del ácido graso	<i>E. coli</i>		<i>S. typhi</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
			%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	n-tridecanoato	0.07	0.03	-	-	-	-	0.06	0.04
17:1 Δ ¹⁰	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	(trans)-9-hexadecenoato	0.34	0.33	-	-	-	-	-	-
17:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	n-hexadecanoato	1.73	1.21	3.92	0.08	0.28	0.2	0.06	0.06
8:4 Δ ^{2,2,4,5}	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	8-(2-hexilciclopropil) octanoato	1.03	0.79	1.53	0.93	-	-	-	-
19:1 Δ ¹⁰	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	(trans)-9-octadecenoato	0.48	0.63	-	-	-	-	-	-
19:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	n-octadecanoato	0.12	0.2	0.53	0.8	0.26	0.31	-	-
20:1 Δ ⁶	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	5-(2-undecilciclopropil)-pentanoato	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-
17:1 Δ ⁸	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	(trans)-7-hexadecanoato	0.16	0.21	-	-	-	-	-	-
16:0	C ₁₆ H ₃₄	Hexadecano	0.44	0.4	-	-	-	-	-	-
13:1 Δ ³	C ₁₃ H ₂₈	2-dodecanoato	0.42	0.45	-	-	-	-	-	-
10:0	C ₁₀ H ₂₂	Decano	0.2	0.19	-	-	-	-	-	-
13:3 Δ ^{3,3,6}	C ₁₃ H ₂₈	2,2,5-trimetildecano	0.16	0.08	-	-	-	-	-	-
15:0	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	n-tetradecanoato	-	-	0.41	0.12	-	-	-	-
16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	n-pentadecanoato	-	-	-	-	0.55	0.93	0.34	0.47
11:1 Δ ³	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	(cis)-2-decenoato	-	-	0.12	0.06	-	-	-	-
16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	3-metoxitetradecanoato	-	-	0.12	0.15	-	-	-	-
19:1 Δ ⁴	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	(trans)-13-octadecenoato	-	-	1.19	0.23	-	-	-	-
18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Heptadecanoato	-	-	-	-	0.15	0.09	-	-
18:1 Δ ¹⁵	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	14-metil hexadecanoato	-	-	-	-	0.5	0.47	-	-
20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	n-nonadecanoato	-	-	-	-	0.35	0.52	-	-
20:1 Δ ¹	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	11-metil-octadecanoato	-	-	-	-	0.28	0.19	-	-
17:1 Δ ¹⁰	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	trans 9-hexadecanoato	-	-	-	-	-	-	0.06	0.03
18:2 Δ ^{3,6}	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2,5-hexadecanoato	-	-	-	-	-	-	0.17	0.06
17:3 Δ ^{3,7,11}	C ₁₇ H ₃₆	2,6,10-tetradecanoato	-	-	-	-	-	-	0.79	0.46
21:0	C ₂₁ H ₄₄	Heneicosano	-	-	0.5	0.15	-	-	2.31	2.07
14:0	C ₁₄ H ₂₉ NO	N,N-Dimetildodecanamida	-	-	-	-	-	-	0.06	0.05
20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	Nonadecano	-	-	-	-	-	-	1.44	1.76
12:1 Δ ³	C ₁₂ H ₂₆	2-undecanoato	-	-	-	-	-	-	0.11	0.15
20:0	C ₂₀ H ₄₄	Eicosano	-	-	0.37	0	-	-	-	-
24:0	C ₂₄ H ₅₀	Tetracosano	-	-	0.57	0.01	-	-	-	-
28:0	C ₂₈ H ₅₈	Octacosano	-	-	0.78	0.74	-	-	-	-
24:2 Δ ^{2,3}	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	1,2-Bencendicarboxilato de disooctilo	-	-	0.27	0.55	-	-	-	-
21:0	C ₂₁ H ₄₄	n-Heneicosano	-	-	-	-	0.87	0.78	-	-
36:0	C ₃₆ H ₇₄	Hexatriacontano	-	-	-	-	0.63	0.69	-	-
44:0	C ₄₄ H ₉₀	Tetratetracontano	-	-	-	-	0.22	0.27	-	-

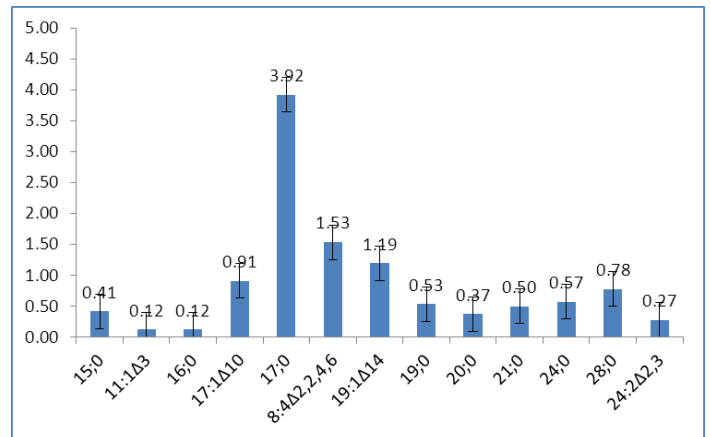
Fuente: resultados obtenidos en laboratorio de Físico-Química FACCQQ y farmacia, X* Promedio para un número de muestras, Los ácidos grasos fueron determinados como derivados metilados. Datos expresados como promedio de porcentaje de área + desviación estándar.

Gráfica 1. Perfil de ácidos grasos de *Escherichia coli*



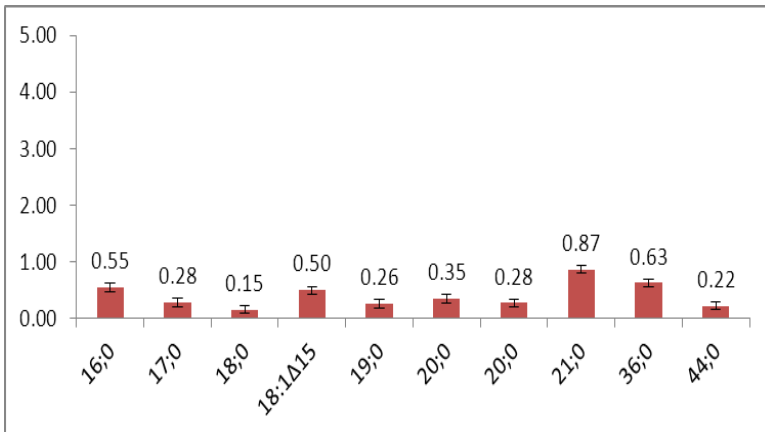
Fuente: resultados obtenidos de las bacterias *E. coli* Laboratorio de Físico-Química FACCQQ y Farmacia USAC. (n=96)

Gráfica 2. Perfil de ácidos grasos de *Salmonella typhi*



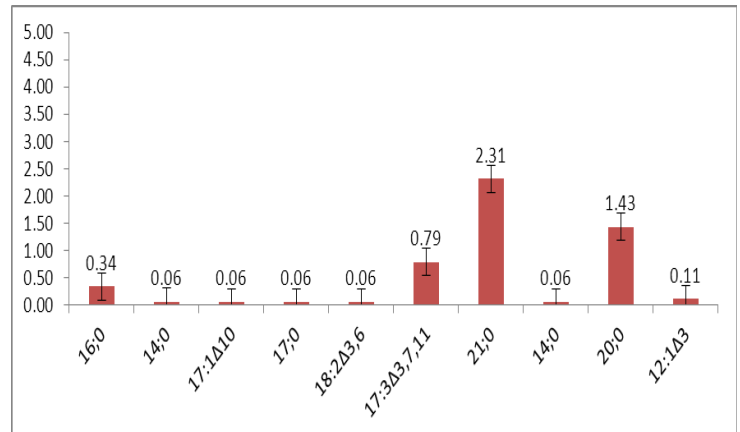
Fuente: resultados obtenidos de las bacterias *S. typhi* Laboratorio de Físico-Química FACCQQ y Farmacia USAC. (n=96)

Gráfica 3. Perfil de ácidos grasos de *Staphylococcus aureus*



Fuente: resultados obtenidos de las bacterias *S. aureus* Laboratorio de Físico-Química FACCQQ y Farmacia USAC. (n=93)

Gráfica 4. Perfil de ácidos grasos de *Pseudomonas aeruginosa*



Fuente: resultados obtenidos de las bacterias *P. aeruginosa* Laboratorio de Físico-Química FACCQQ y Farmacia USAC. (n=93)

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de *Escherichia coli* (n=96)

Abreviatura	Formula	Compuesto	X* porcentaje de área	STDEV*
14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	n-Tridecanoato	0.07	0.03
17:1Δ ¹⁰	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	(trans)-9-Hexadecenoato	0.33	0.33
17:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	n-Hexadecanoato	1.73	1.21
8:4Δ ^{2,2,4,5}	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	8-(2-Hexilciclopropil) octanoato	1.03	0.79
19:1Δ ¹⁰	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	(trans)-9-Octadecenoato	0.48	0.63
19:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	n-Octadecanoato	0.12	0.20
20:1Δ ⁶	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	5-(2-Undecilciclopropil)-pentanoato	0.20	0.20
17:1Δ ⁸	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	(trans)-7-hexadecanoato	0.16	0.21
16:0	C ₁₆ H ₃₄	Hexadecano	0.44	0.40
13:1Δ ³	C ₁₃ H ₂₈	2-dodecanoato	0.42	0.45
10:0	C ₁₀ H ₂₂	Decano	0.20	0.19
13:3Δ ^{3,3,6}	C ₁₃ H ₂₈	2,2,5-trimetil decano	0.16	0.08

Fuente: resultados obtenidos de la bacteria *Escherichia coli* laboratorio de Físico-Química FCCQQ y Farmacia USAC. *X promedio para una numero de 96 muestras *STDEV**Desviación estándar

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de *Salmonella typhi* (n=96)

Abreviatura	Formula	Compuesto	X* porcentaje de área	STDEV*
15:0	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	Tetradecanoato	0.41	0.12
11:1Δ ³	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	(cis)-2-Decenoato	0.12	0.06
16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	3-Metoxitetradecanoato	0.12	0.15
17:1Δ ¹⁰	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	(trans)-9-Hexadecenoato	0.90	0.32
17:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	n-hexadecanoato	3.92	0.08
8:4Δ ^{2,2,4,5}	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	8-(2-Hexilciclopropil) octanoato	1.53	0.93
19:1Δ ⁴	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	(trans)-13-octadecenoato	1.19	0.23
19:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	n-Octadecanoato	0.53	0.80
20:0	C ₂₀ H ₄₄	Eicosano	0.37	0.00
21:0	C ₂₁ H ₄₄	Heneicosano	0.49	0.15
24:0	C ₂₄ H ₅₀	Tetracosano	0.57	0.01
28:0	C ₂₈ H ₅₈	Octacosano	0.77	0.74
24:2Δ ^{2,3}	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	1,2-Bencendicarboxilato de diisooctilo	0.27	0.55

Fuente: resultados obtenidos de la bacteria *Salmonella typhi*, laboratorio de Físico-Química FACCQQ y Farmacia USAC. X* promedio para una numero de 96 muestras. *STDEV**Desviación estándar. . Los ácidos grasos fueron determinados como derivados metilados.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos de *Staphylococcus aureus* (n=93)

Abreviatura	Formula	Compuesto	X* porcentaje de área	STDEV*
16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	n-Pentadecanoato	0.55	0.93
17:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	n-Hexadecanoato	0.28	0.20
18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Heptadecanoato	0.15	0.09
18:1 Δ ¹⁵	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	14-Metil-hexadecanoato	0.50	0.47
19:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	Octadecanoato	0.26	0.31
20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	Nonadecanoato	0.35	0.52
20:1Δ ¹	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	11-Metil-octadecanoato	0.28	0.19
21:0	C ₂₁ H ₄₄	n-Heneicosano	0.87	0.78
36:0	C ₃₆ H ₇₄	Hexatriacontano	0.63	0.69
44:0	C ₄₄ H ₉₀	Tetratetracontano	0.22	0.27

Fuente: resultados obtenidos de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, laboratorio de Físico-Química FACCQQ y farmacia X* Promedio para un numero de muestras n=93USAC. *STDEV** Desviación estándar. . Los ácidos grasos fueron determinados como derivados metilados.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de *Pseudomonas aeruginosa* (n=93)

Abreviatura	Formula	Compuesto	X* porcentaje de área	STDEV*
16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Pentadecanoato	0.34	0.47
14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Tridecanoato	0.06	0.04
17:1Δ ¹⁰	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	trans 9-hexadecanoato	0.06	0.03
17:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Hexadecanoato	0.06	0.06
18:2Δ ^{3,6}	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2,5-hexadecanoato	0.06	0.06
17:3Δ ^{3,7,11}	C ₁₇ H ₃₆	2,6,10-tetradecanoato	0.79	0.46
21:0	C ₂₁ H ₄₄	Heneicosano	2.31	2.07
14:0	C ₁₄ H ₂₉ NO	N,N-Dimetildodecanamida	0.06	0.05
20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	Nonadecano	1.44	1.76
12:1Δ ³	C ₁₂ H ₂₆	2-undecanoato	0.11	0.15

Fuente: resultados obtenidos de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, laboratorio de Físico-Química FACCQQ y farmacia USAC. X* promedio para una numero de 93 muestras. *STDEV** Desviación estándar

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Con el fin de identificar los perfiles de ácidos grasos en un grupo de cepas nativas se analizaron 96 cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* y 93 de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos ácidos grasos conforman los fosfolípidos de las membranas celulares bacterianas, al no encontrarse libres, fue necesaria la lisis bacteriana y la derivatización de los ácidos grasos a metil ésteres. La derivatización es el proceso mediante el cual se transforma el analito por una reacción química a un derivado más fácil de analizar. En el caso de la cromatografía de gases se derivatiza para obtener especies más volátiles y no tener que usar temperaturas demasiado altas que puedan descomponer los analitos en el equipo. Otra posible razón por la que se usa la derivatización es para la inserción de un grupo funcional que aumente la resolución en la detección. La desviación estándar se refiere a la probabilidad de encontrar el ácido graso en la bacteria. Una vez obtenidos los cromatogramas, se analizaron los promedios de los porcentajes de áreas con su respectiva desviación estándar, con el que se logró determinar un perfil característico para cada una de las especies analizadas.

La cromatografía cuantitativa se basa en una comparación ya sea de la altura o del área de los picos cromatográficos producidos por los analitos en comparación con uno o más patrones. Si las condiciones están perfectamente controladas, ambos parámetros varían linealmente con la concentración. La altura de un pico cromatográfico se obtiene conectando la línea de base de cada lado del pico por medio de una línea recta y dividiendo la distancia perpendicular entre esta línea y el pico. Esta medida puede tomarse generalmente con una precisión razonablemente grande y proporciona buenos resultados. Las áreas de los picos son independientes de los

ensanchamientos debidos a la temperatura, velocidad de inyección o de flujo. Por lo tanto, desde este punto de vista, las áreas de los picos constituyen un parámetro analítico mucho más satisfactorio que sus alturas, por otra parte, la altura de los picos se mide con mucho más facilidad y en el caso de los picos estrechos se obtiene una mayor precisión.

Los ácidos grasos obtenidos en el análisis fueron esteres metílicos de ácidos grasos de cadena saturada, cadena insaturada, cadena con ramificación metilo, cadena con sustitución del grupo funcional metóxido y con cadena carboxilo.

En la tabla No. 1 se presentan los ácidos grasos identificados y el promedio del porcentaje de área, encontrados en las cepas analizadas. El porcentaje de área indica la concentración en la cual se encuentra cada compuesto identificado. Esta tabla muestra una comparación de los ácidos grasos presentes en cada cepa. Se identificaron un total de 35 ácidos grasos en las 4 especies analizadas (12 para *E. coli*, 13 para *S. typhi*, 10 para *S. aureus* y 10 para *P. aeruginosa*). El ácido graso n-hexadecanoato se encuentra presente en las cuatro especies bacterianas analizadas. Este ácido graso, también se encontró presente en las cepas ATCC de dichas especies según estudio previo (Claudio, 2009). Por otro lado, para *P. aeruginosa* también se reporta este ácido graso (Rodriguez, et. al. 2000).

Se puede notar que algunos ácidos grasos son considerados característicos para cada cepa. *E. coli* posee 8 ácidos grasos característicos: trans-9 hexadecanoato de metilo, trans 9-octadecanoato de metilo, 5-(2-undecilciclopropil)-pentanoato, (trans)-7-hexadecanoato, hexadecano, 2 dodecanoato, decano y 2,2,5-trimetildecano. En otros estudios (Rodriguez, et. al

2000) se identificaron los ácidos grasos saturados y ramificados (trans 9-octadecanoato y 2 dodecanoato) en *E. coli*.

En *S. typhi*, se identificaron 8 ácidos grasos específicos, n-tetradecanoato de metilo, (cis)2-decenoato de metilo, 3 metoxitetradecanoato de metilo, (trans)-13-octadecanoato de metilo, eicosano, tetracosano, octacosano y 1,2-bencendicarboxilato de disooctilo. Para *S. aureus* son característicos 8 ácidos grasos, 14-metil pentadecanoato de metilo, heptadecanoato de metilo, 14 metilhexadecanoato de metilo, n-nonadecanoato de metilo, 11-metil octadecanoato de metilo, n-heneicosano, hexatriacontano y tetra tetracontano y en el caso de *P. aeruginosa* los ácidos característicos son: 6 (trans) 9-hexadecanoato de metilo, 2,5 hexadecanoato de metilo, 2,6,10-tetradecanoato de metilo, n,n,dimetildodecanamida, nonadecano y 2, undecanoato de metilo.

E. coli, comparte con *P. aeruginosa* los ácidos grasos n-hexadecanoato y tridecanoato. Con *S. typhi* n-hexadecanoato, 8- (2 hexilciclopropil) y el n-octadecanoato. Con *S. aureus*, comparte n-hexadecanoato y n-octadecanoato. *S. typhi* con *P. aeruginosa* comparte el ácido graso heneicosano.

E. coli, *S. typhi* y *S. aureus* comparten en su perfil de ácidos grasos el compuesto n-octadecanoato a diferencia de *P. aeruginosa*, esta diferencia podría deberse a que es una bacteria no fermentadora. *E. coli* y *P. aeruginosa* comparten el ácido graso n-tridecanoato, en la mayoría de las cepas analizadas.

En las gráficas de la 1 a la 4, se presentan los perfiles de ácidos grasos propios para cada una de las cepas analizadas.

En la gráfica No. 1, se observa que el ácido graso en mayor proporción es Hexadecanoato para las cepas de *E. coli*, con un promedio de porcentaje de área de 1.73 y una desviación estándar de 1.21; la mayor desviación estándar presentada para esta cepa, lo que indica que no detectó en todas las muestras analizadas. El n-tridecanoato de metilo presenta un promedio de porcentaje de área de 0.07, ácido graso en menor proporción, sin embargo tiene una desviación estándar de 0.03 lo que indica que se encuentra presente en la mayoría de las muestras analizadas de esta cepa.

En la gráfica No. 2, *S. typhi* presenta los siguientes ácidos grasos exclusivos en mayor proporción n-hexadecanoato de metilo con un promedio de porcentaje de área de 3.92 y una desviación estándar de 0.08 y 3-metoxitetradecanoato de metilo con un promedio de porcentaje de área de 0.12 y una desviación estándar de 0.15. Este ácido graso corresponde a un éster metílico con una sustitución de un grupo metóxilo en la cadena. En esta gráfica, los compuestos heicosano y tetracosano presentan una desviación estándar de 0.01, lo que indica que fueron encontrados en la mayoría de muestras analizadas.

En la gráfica No. 3, para *S. aureus* el ácido graso n-heneicosano es el que se presenta en mayor proporción, con un porcentaje de área de 0.87 y una desviación estándar de 0.78. El ácido graso que presenta menor proporción es el heptadecanoato de metilo, con un porcentaje de área de 0.15

siendo también el ácido graso con menor desviación estándar de 0.09. El n-pentadecanoato de metilo es el ácido graso que presenta mayor desviación estándar. Todos los compuestos de esta cepa se presentan con ramificación metilo, siendo la que presenta la mayor cantidad de este tipo de ácidos grasos entre las cepas analizadas. *S. aureus* tiene una diferencia marcada entre sus ácidos grasos y el resto de especies. Esta especie es la única bacteria Gram positivo analizada en este estudio. Su diferencia radica en el tipo de cadenas que presentan sus ácidos grasos constituyentes, ausencia de cadenas con insaturaciones y presencia de cadenas con ramificación metilo.

En la gráfica No. 4, para *P. aeruginosa* el compuesto que se presenta en mayor proporción es el heneicosano, con un porcentaje de área de 2.1 y una desviación estándar de 2.07, lo que significa que no es un ácido graso presente comúnmente en esta cepa. Se presentan 5 ácidos grasos (tridecanoato de metilo, (trans)-9-hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de metilo, 2,5-hexadecanoato de metilo y n,n-trimetildodecanamida) en bajas concentraciones pero con desviaciones estándar desde 0.03 hasta 0.06, lo que indica un patrón de ácidos grasos establecidos para esta cepa.

S. typhi y *P. aeruginosa* presentan la menor desviación estándar, lo que es indicativo que fue detectado en la mayoría de las cepas analizadas.

La obtención de perfiles de ácidos grasos definidos para las cepas nativas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* permite su utilización como referencia para nuevos estudios, evidenciando que podría ser utilizada como análisis de

identificación, con fines de investigación de cepas bacterianas. Los perfiles de los ácidos grasos celulares de los microorganismos pueden ser usados para estimar la biomasa microbiana y proveer pautas dentro de la diversidad taxonómica funcional y estatus nutricional de los microorganismos en diversos ambientes (Baath, *et. al.* 1992).

9. CONCLUSIONES

- 9.1. Se identificaron los ácidos grasos de las cepas nativas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas*, obteniéndose 35 ácidos grasos identificados con esteres metílicos de cadena saturada como insaturada a excepción de *S. aureus* que tiene únicamente cadena saturada.
- 9.2. Los ácidos grasos característicos para *E. coli* son: trans-9 hexadecanoato de metilo y trans 9-octadecanoato de metilo, siendo el Hexadecanoato el ácido graso en mayor proporción mientras que para *S. typhi* son: n-tetradecanoato de metilo, (cis)2-decenoato de metilo, 3 metoxitetradecanoato de metilo, (trans)-13-octadecanoato de metilo, eicosano, tetracosano, octacosano y 1,2-bencendicarboxilato de disooctilo. Por pertenecer a la familia de Enterobacterias, ambas especies presentan en común el ácido Hexadecanoato en mayor proporción con respecto al resto de los identificados. Las cepas que representan a la familia de las enterobacterias en este estudio, presentan en mayor proporción el ácido Hexadecanoato.
- 9.3. Los ácidos grasos característicos para *S. aureus* son: 14-metil pentadecanoato de metilo, heptadecanoato de metilo, 14 metilhexadecanoato de metilo, n-nonadecanoato de metilo, 11-metil octadecanoato de metilo, hexatriacontano, tetra tetracontano y n-heneicosano, siendo este último el ácido graso encontrado en mayor proporción.
- 9.4. Los ácidos grasos característicos para *P. aeruginosa* son: (trans) 9-hexadecanoato de metilo, 2,5 hexadecanoato de metilo, 2,6,10-tetradecanoato de metilo, n,n-

dimetildodecanamida, nonadecano y 2, undecanoato de metilo. Para esta bacteria, el ácido graso en mayor concentración fue el heneicosano.

- 9.5. El ácido graso n-hexadecanoato se encuentra presente en las cuatro especies bacterianas analizadas.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1. Realizar otros estudios en donde se incluyan bacterias Gram positivo y Gram negativo de interés clínico e industrial.

- 10.2. Realizar estudios que permitan establecer si la técnica de Cromatografía de Gases puede aplicarse directamente a muestras biológicas o de alimentos como una metodología rápida de análisis de microorganismos.

11. REFERENCIAS

Baath, E.; A. Frostegard; and H. Fritze (1992). Soil Bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in area polluted with alkaline dust deposition. *App. Environ. Microbiol.* 58:4026-4031.

Boop; Brenner, Wells. (1999). *Escherichia, Shigella and Salmonella. Manual of clinical microbiology.* (7ma. ed.). 459-474.

Brock; Madigan, J.M. Martinko y J. Parjer. (1998). *Biología de los microorganismos.* (8ª. Edición) Prentice Hall. 150-200, 243-252

Claudio. T. (2009). *Caracterización de Microorganismos por medio de Cromatografía de Gases Acoplada a espectrometría de Masas.* Guatemala. P26.

De Leon FR., Otto MI. (2008). *An antidote for Staphylococcus aureus pneumonia.* The Journal of Experimental Medicine. 205-287.

De la rosa, Manuel Prieto José. (2003). *Microbiología para Ciencias de la Salud.* (2da. ed.). España. Elseiver. p92

Díaz S. 2005. “Control microbiológico de Enterobacterias de las ensaladas preparadas en el servicio de alimentación del hospital general de enfermedad común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS)” USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Tesis.

Dinges M., Orwin P. y Schlievert P. (2000). *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews. (vol. 13.). 16-34.

Donnenberg M., Whitman T. (2001). *Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic Escherichia coli*. The Journal of Clinical Investigation. 539-548.

Fenselau C. (1994). *Mass Spectrometry for Characterization of Microorganisms*. EEUU: University of Maryland Baltimore County. p541.

Gadea P. et. al. (1998). *E. coli en infecciones intestinales de niños; Caracterización de las cepas involucradas y optimización de su estudio*. 4to. Encuentro Nacional de Microbiólogos. Instituto de Higiene. 174-192.

Gamaro C., Díaz R. (2005). *Manual Práctico de Microbiología*. (3.ed.) Barcelona, España: Masson S. A. 47-49.

Hernández, L, González, C. (2002). *Introducción al Análisis Instrumental*. España: Editorial Ariel. p23.

Humbert J. et. al. (2000). *Electron Microscopic Improvement in the study of Diarrheagenic Escherichia coli. Microscopy Research and Technique.* 383-393.

Huang Z. (1992). *Máss Spectrom. C.C.J. Am. Soc* p3, 71-78.

James, A. T. and A.J. T. Martín 1952. Gas liquid partition Chromatography: the separation and microestimation of volatile fatty acids from formic to dodecanoic acid. *J. Biochem.* 50:679-690

Kaneda T. (1967). *Fatty acids in genus Bacillus, iso and anteiso fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species.* *J. Bacteriol.* 93: 894-893.

Kates M. (1999). *Advances in Lipid Research.* (Vol. 2). EEUU. New York: Academic Press. Cap. 1.

Koneman. E, Stephen A. (2008). *Diagnóstico Microbiológico; texto y atlas a color.* (6ta. ed). España: Editorial Médica Panamericana. p39 270, 282 285

Murray, P, P faller, M. (2006). *Microbiología Médica.* España: Elseiver. p976

Neidhart FC. (1999). *Escherichia coli and Salmonella; cellular and molecular Biology.* (2.ed.). Washington: ASM Press. 542-560.

Pahissa. A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. España: ICG Marge SL. p21.

Ratledge C. (1988). *Microbial Lipids*. (Vol. 1). EEUU, San Diego: Academic Press. CA. P360

Robles, E., Hurtado, M., González, M., Ramírez, P., Durán, A., Ayala, R. y Martínez, M. 2002. Determination of the profile of fatty acids of 4 species of *Shigella* spp. by chromatography of gases. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 44, No2, abril-junio: 69-79.

Romero, R Herrera, I. (2002). *Síndrome Diarreico Infeccioso*. España: Editorial panamericana. P. 99.

Rodriguez, W.; Moreno, G. López, L. 2000. Caracterización de la biomasa de un reactor anaerobio/aerobio con base en el análisis del perfil de los ácidos grasos. México, D.F. Federación mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. P1-10 [T III]. Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.

Shantha N. C. y G. Napolitano. 1992. Review gas chromatography of fatty acids. *J. Chromatogr.* 624:37-51

Snyder P. (1998). *Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Detection of biological Warfare Agents*. EEUU. U.S.: Army Edgewood Research, Development and Engineering Center, Aberdeen Proving Ground. MD 21010-5423.

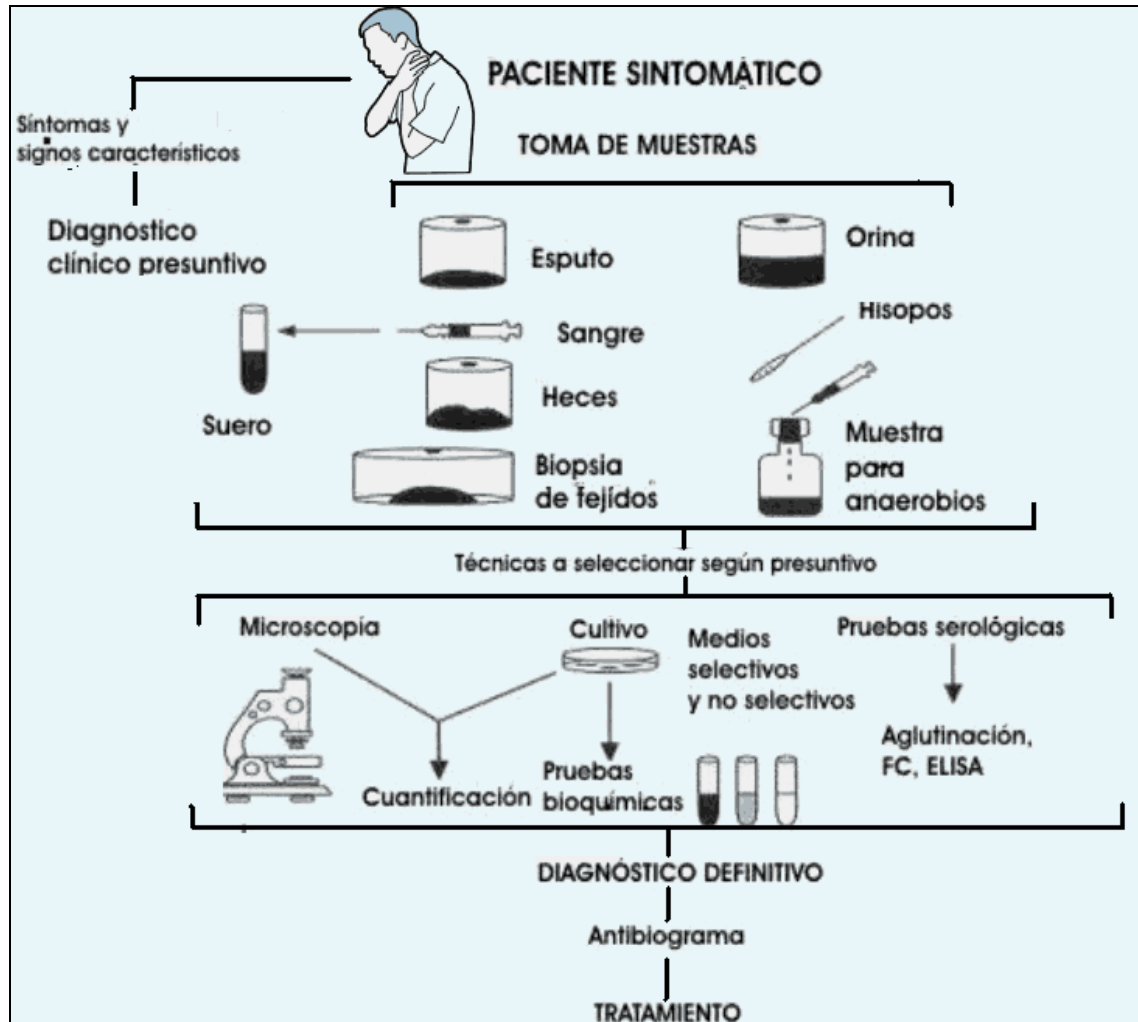
Terrence A. (1998). *A Beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation*. EUA: John Wiley & Sons Ltd.

Uzzau S., Fasano A. (2000). *Cross-talk between enteric pathogenic and the intestine*. *Cellular Microbiology*. 83-89.

Yanyan. L. Shengfang. W. Liping. W. Ye. L. Feng. S. Xiaoyuan. W. (2009). *Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatograph tandem mass spectrometry*

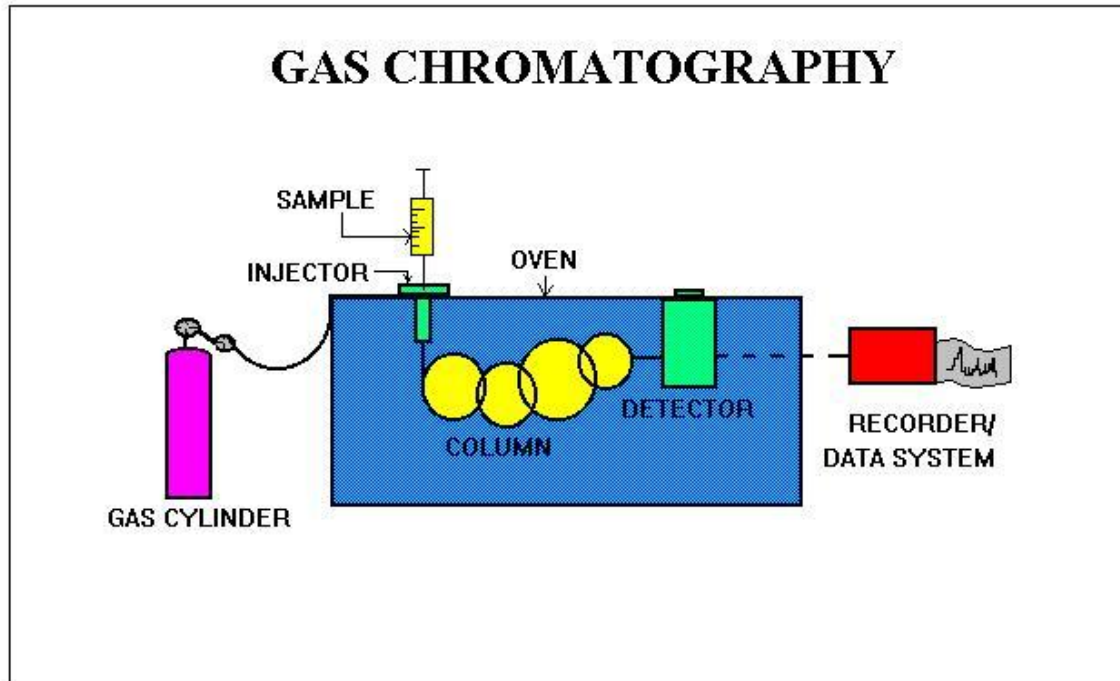
12. ANEXOS

Anexo 1. Marcha de identificación bacteriana



Fuente: BREED, R. 1948. The Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 6th. Ed. USA. The Williams & Wilkinson Company.

Anexo 2. Modo de operación de un cromatógrafo de gases



: Fenselau C. (1994). *Mass Spectrometry for Characterization of Microorganisms*. EEUU: University of Maryland Baltimore County

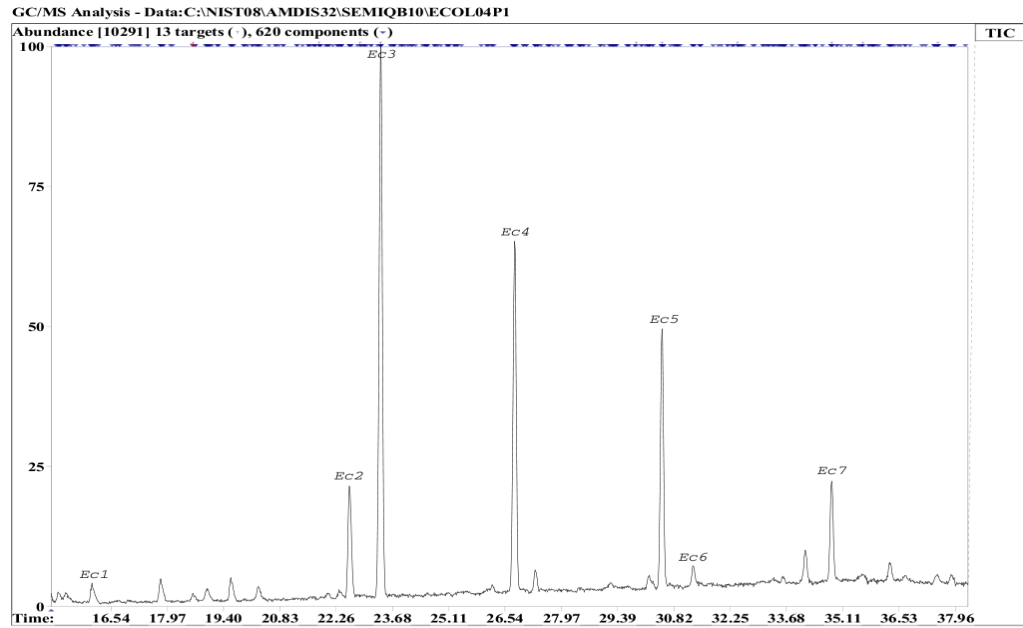
Fuente

Anexo 3. Condiciones Cromatográficas

Parámetro	Características
Temperatura del inyector	230 °C
Split ratio	1:75
Temperatura del horno	Inicial: 60 °C. Gradiente de temperatura 2 °C/min. Final: 280 °C.
Tiempo total por corrida	90 min.
Volumen de inyección	0.2µL.
Columna	Restek Rtx – 51 de 30m, 0.25mm diámetro interno y recubrimiento 0.5µm.
Flujo en columna	20 ml/min.

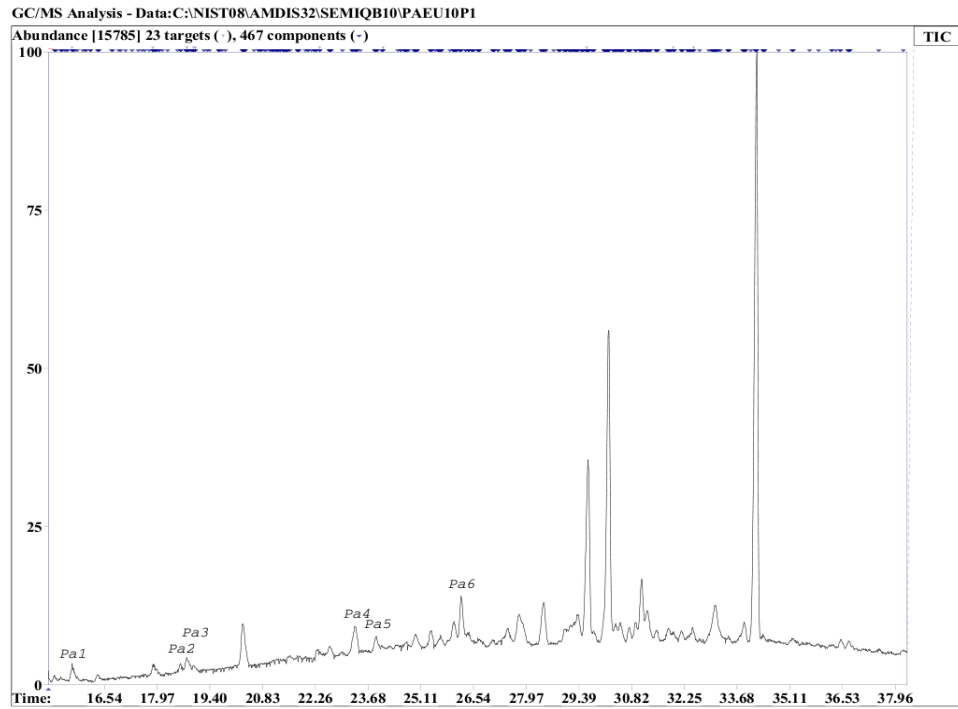
Fuente: Claudio. T. (2009). *Caracterización de Microorganismos por medio de Cromatografía de Gases Acoplada a espectrometría de Masas*. Guatemala. USAC. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Anexo 4: Típico cromatograma de ésteres de ácidos grasos de membrana celular de *Escherichia coli*.



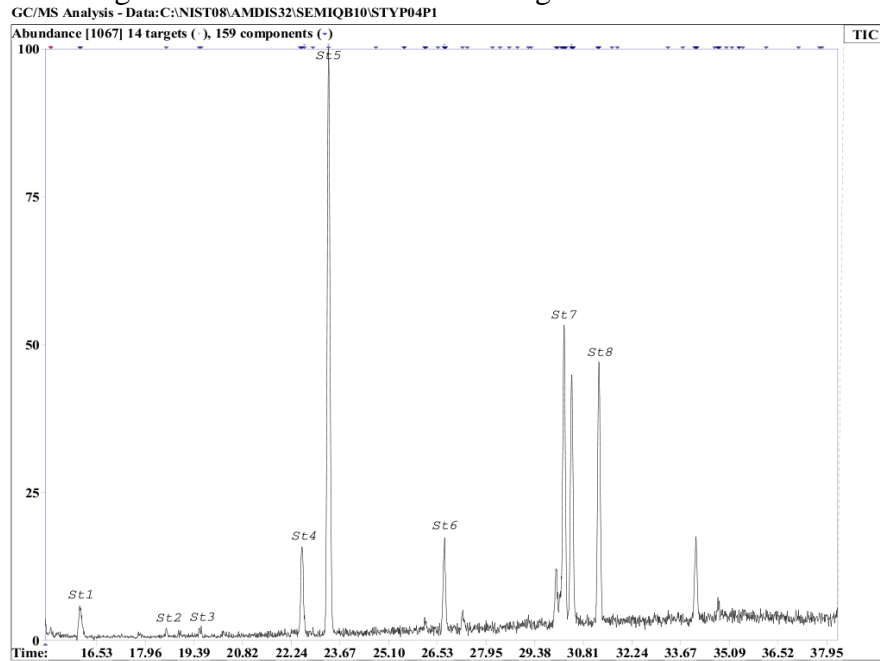
Fuente: resultados obtenidos de una corrida de la bacteria *Escherichia coli* laboratorio de Físico-Química FCCQQ y Farmacia USAC. + TIC = Total Ion Current

Anexo 5: Cromatograma TIC⁺ de ésteres de ácidos grasos de cepa de *P aeruginosa*



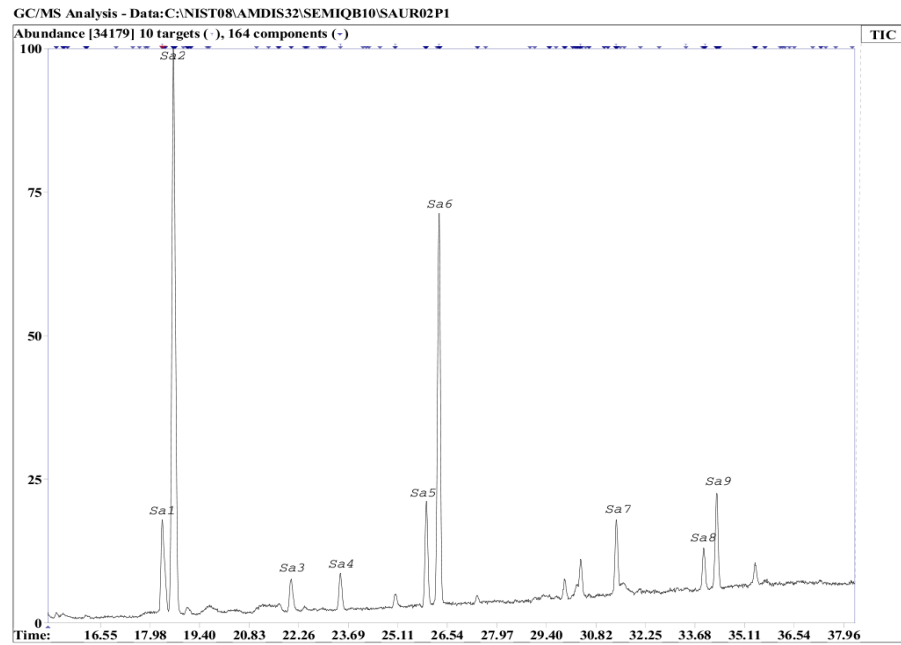
Fuente: resultados obtenidos de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* laboratorio de Fisico-Química FACCQQ y Farmacia USAC. + TIC = Total Ion Current

Anexo 6: Cromatograma TIC⁺ de ésteres de ácidos grasos de membrana celular de *S. typhi*



Fuente: resultados obtenidos de la bacteria *Salmonella typhi* laboratorio de Fisico-Química FCCQQ Y FARMACIA USAC. + TIC = Total Ion Current


Anexo 7: Cromatograma TIC⁺ de ésteres de ácidos grasos de membrana celular de *Staphylococcus aureus*.



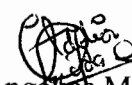
Fuente: resultados obtenidos de la bacteria *Staphylococcus aureus* laboratorio de Fisico-Química FCCQQ Y FARMACIA USAC. + TIC = Total Ion Current




César Augusto Godínez Mollinedo
Autor




Claudia Lucrecia Valenzuela Mejía
Autora



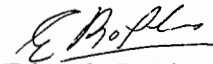
Claudia María Angélica Mérida Alemán
Autora



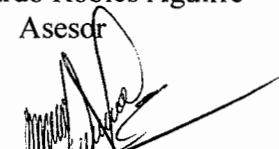
Lionel Guillermo Alonso Toasperm
Autor



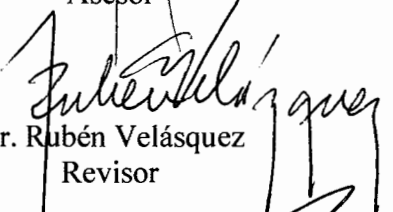
María Eugenia Zaldaña Pérez
Autor



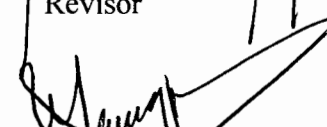
Lic. Eduardo Robles Aguirre
Asesor



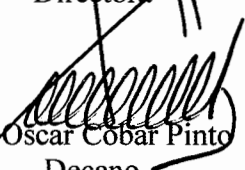
Lic. Marco Vinicio García Saran
Asesor



Dr. Rubén Velásquez
Revisor



M.A. María Eugenia Paredes
Directora



Dr. Oscar Cobar Pinto
Decano