

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure holding a staff, surrounded by various symbols including a crown, a lion, and a cross. The shield is flanked by two columns. The outer ring of the seal contains the Latin text "SACRAS DIBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA GOACTEMALENSIS INTER".

**Caracterización de Microorganismos por medio de
Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas**

Tamara Zunil Claudio Méndez

QUÍMICO

Guatemala, noviembre de 2009

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

**Caracterización de Microorganismos por medio de
Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas**

Informe

Proyecto de Investigación

Presentado por

Tamara Zunil Claudio Méndez

Para optar al título de

QUÍMICO

Guatemala, noviembre de 2009

Miembros de Junta Directiva

Ph.D. Óscar Cobar Pinto	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
M.A. Lillian Raquel Irving Antillón	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS
Por haberme permitido llegar hasta aquí.
- A MI MAMÁ
Por su total apoyo a lo largo de mi vida.
- A MI ABUELITA
Por su cariño y dedicación hacia mí.
- A TODA MI FAMILIA
Por su ayuda y cariño.
- A MI NOVIO
Por su incondicional amor y soporte.
- A MI ASESOR
El Lic. Eduardo Robles, por el conocimiento y experiencias que ha compartido conmigo y por el gran apoyo que me ha dado.
- A MIS PROFESORES
Por haber compartido su sabiduría y haber contribuido en todas las maneras posibles a formar a la profesional en la que me convierto.
- Especialmente a seño Isabel y Miss Molina, por haberme mostrado la belleza del camino de la Ciencia.
- A seño Junia y mis maestras de la primaria, por su cariño y aprecio
- A seño Corina y mis profesores de básicos, que me iniciaron en el camino que decidí recorrer.
- A mis profesores del diversificado, que me enseñaron a esforzarme y cosechar triunfos.
- A mis catedráticos en la Universidad, que me enseñaron lo que sabían y me mostraron el camino para seguir aprendiendo siempre. Especialmente a los licenciados y licenciadas Silvia Coto, Bessie Oliva, Jhoni Álvarez, Pablo Oliva, Idolly Carranza, Ricardo Veliz, Silvia Echeverría, etc.
- A MIS AMIGOS
Por compartir las alegrías, consolarme en las tristezas, y estar conmigo en el camino que he recorrido para llegar aquí.
- A mis viejos amigos, que de vez en cuando veo, pero tengo siempre presentes porque han sido parte importante de mi vida. Especialmente a mis amigos del Colegio Americano de Guatemala porque compartí con ellos una de las mejores épocas de mi vida.
- A mis amigos de la Universidad, que comprenden mejor que nadie lo que significa este momento porque han recorrido el camino conmigo: a Christian que me ha exhortado a seguir cuando he

flaqueado, a Byron, Anival, Carlos, Isabel, Odra, Willy y todos mis amigos que han hecho feliz mi estancia en la USAC; a Marlen (qepd) por enseñarme el valor de cada segundo vivido en esta tierra; a todos aquellos que aprecio y no alcancé a agregar... pero saben que están en mi corazón.

A mis compañeros de OEQ, AEQ y conexos, con quienes he aprendido el poder de estar unidos y el valor de un ideal, por sencillo que parezca. En especial a Oscar Sacahuí, Francisco Carrascoza y César Conde.

A MIS COMPAÑEROS

De todos los lugares en que he trabajado, por su amistad y solidaridad. A la gente del departamento de Fisicoquímica, que me abrió las puertas de par en par; al departamento de Análisis Inorgánico, que me permitió iniciar mi carrera laboral; al Laboratorio Químico Fiscal de la SAT, que me dio el primer vistazo al mundo fuera de la U; al Ministerio de Energía y Minas, que me ha dado oportunidades y alegrías.

A MIS ALUMNOS

Por lo mucho que he aprendido gracias a ellos.

A LOS QUE ME HAN AYUDADO

Muy especialmente Lic. Abraham Mencos, Lic. Rodolfo Orozco, Dr. Francisco Pérez, Dr. Óscar Cobar, Vinicio García, Yoli, Tere, Zoily, Panchito, Edwin, la familia de Manuel...

A LOS QUE OLVIDÉ...

Pero saben que merecen estar aquí ...

INFINITAS GRACIAS

ÍNDICE

	Página
I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
II. RESUMEN.....	2
III. ANTECEDENTES	3
A. Los Microorganismos	3
1. Descripción de microorganismos seleccionados.....	3
2. Métodos actuales para la identificación de microorganismos.....	6
B. La Cromatografía.....	8
1. La cromatografía como técnica analítica	8
2. La cromatografía de gases.....	10
3. La espectrometría de masas como método de detección en cromatografía	10
4. La identificación de microorganismos por técnicas cromatográficas.....	11
IV. JUSTIFICACIÓN	14
V. OBJETIVOS.....	15
A. Objetivo General	15
B. Objetivos Específicos.....	15
VI. HIPÓTESIS.....	15
VII. MATERIALES Y MÉTODO	16
A. Materiales.....	16
1. Cristalería.....	16
2. Reactivos.....	16
3. Equipo.....	16
4. Otros materiales	17
B. Universo y Muestra.....	17
C. Diseño de Investigación.....	17
D. Procedimiento.....	17
VIII. RESULTADOS	19
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26

X. CONCLUSIONES	30
XI. RECOMENDACIONES	31
XII. REFERENCIAS	32
XIII. ANEXOS	35
A. Lista de acrónimos	35
B. Espectros de masas de compuestos seleccionados	36
C. Fotografías	50

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El proyecto de investigación macro comprende varias fases y etapas que se resumen a continuación:

- Fase 1: Obtención de material bacteriano
 - Etapa 1: Cultivo de cepas bacterianas con identificación de la ATCC
 - Etapa 2: Lisis bacteriana con calor y solventes
- Fase 2: Extracción de componentes a analizar
 - Etapa 1: Extracción de componentes lipídicos de las paredes celulares
 - Etapa 2: Fraccionamiento de extractos para análisis adicionales
- Fase 3: Derivatización de componentes a analizar
 - Etapa 1: Derivatización de triacilgliceroles y ácidos grasos libres
- Fase 4: Cromatografía
 - Etapa 1: Análisis de muestras preparadas usando un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.
 - Etapa 2: Interpretación de cromatogramas obtenidos.
- Fase 5: Aplicación a fluidos corporales
 - Etapa 1: Repetición de las fases 1 a 4 usando como matriz inicial fluidos corporales humanos de pacientes.

El trabajo de investigación comprende parte de la fase 1 y las fases 2, 3 y 4 del proyecto macro. En las fases 3 y 4 se realizarán además pruebas preliminares para la aplicación de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). La fase 3 se extenderá a las etapas que sean necesarias para derivatizar los componentes a analizar en ambas técnicas de manera que se alcancen los objetivos.

II. RESUMEN

Con el fin de identificar marcadores químicos para caracterizar y diferenciar a los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* se desarrolló una metodología para el análisis de lípidos de dichas bacterias usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para ello se preparó y analizó un extracto hexánico tras la lisis celular y derivatización de la masa bacteriana fresca con metóxido de sodio 8% en metanol.

De las series de cromatogramas y espectros de masas resultantes, se concluyó que la metodología aplicada fue adecuada para la diferenciación de los microorganismos de estudio, lográndose encontrar picos exclusivos en cuatro de las especies, que permiten su identificación. Así, los picos exclusivos de *Staphylococcus aureus* corresponden a n-nonadecanoato de metilo, n-eicosanoato de metilo y un compuesto no identificado con tiempo de retención de 36.04 minutos.

Salmonella typhi presenta un sólo pico exclusivo correspondiente a 9-Z-tetradecenoato de metilo, mientras que para *Mycobacterium smegmatis* se encontraron cinco picos útiles: n-tetradecanoato de metilo, 9-Z-hexadecenoato de metilo, un heptadecenoato de metilo y otros 2 compuestos no identificados con tiempos de retención de 25.41 y 26.01 minutos. Por otra parte, *Escherichia coli* puede identificarse por la presencia de, n-heneicosano, un compuesto que puede ser un nonadecenoato de metilo y un compuesto no identificado con tiempo de retención de 57.00 minutos.

Finalmente, la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por la ausencia de picos exclusivos y una mayor proporción de 10-Z-nonadecenoato de metilo que de 10-Z-heptadecenoato de metilo con respecto al n-hexadecanoato de metilo.

III. ANTECEDENTES

A. Los Microorganismos

1. Descripción de microorganismos seleccionados

Para la investigación se usaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Staphylococcus aureus es una bacteria de forma esférica de 0.8 a 1.0 micrones. Ocurre aislada, en parejas, en cadenas cortas y en agregados irregulares. No tiene motilidad. Es un coco gram positivo, aeróbico facultativo. (3)

Da negativa la prueba del indol. Reduce los nitratos a nitritos. Forma ácido a partir de glucosa, lactosa, sacarosa, manitol y glicerol, pero no de rafinosa, salicina o inulina. Fermenta el manitol. Forma ácido láctico inactivo o levorrotatorio. Produce ligera formación de H₂S. No hidroliza el almidón. No utiliza NH₄H₂PO₄ como fuente de nitrógeno. Produce amoniaco de peptonas. (3)

Su temperatura óptima de incubación es de 37 ° C. Licúa la gelatina, con una película amarillenta y un sedimento amarillo a naranja. Las colonias en agar son circulares, suaves, amarillentas a anaranjadas, brillantes, intactas. En agar inclinado las colonias son abundantes, opacas, suaves, planas, amarillentas a anaranjadas. En caldo el medio es turbio con un anillo amarillento y sedimento, volviéndose transparente. (3)

Es patogénico. Las cepas varían en su habilidad para producir hemolisina, coagulasa y otros productos metabólicos. Algunas cepas, bajo las condiciones adecuadas no sólo producen exotoxinas (hematoxina, dermatoxina, toxina letal, etc.) sino también una potente enterotoxina que es una causa significativa de intoxicación alimentaria. (3)

Se recomienda examinar su presencia en comidas con ingredientes altos en proteínas, como queso, carne, panadería rellena de crema, embutidos, ensaladas, etc. (17)

Se puede aislar del pus de las heridas. Su hábitat natural son la piel y las membranas mucosas. Es causante de furúnculos, abscesos, supuración en las heridas, etc. (3)

Salmonella typhi es un bacilo de 0.6 a 0.7 por 2.0 a 3.0 micrones, ocurre aislado, en parejas y ocasionalmente en cadenas cortas. Es móvil con flagelos peritricos. Es una bacteria gram negativa. Es aeróbico facultativo. (3)

Produce ácido pero no gas de la glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, maltosa, rafinosa, dextrina, glicerol, manitol y sorbitol. No actúa en la lactosa, sacarosa, inulina, ramnosa, inositol, salicina y usualmente arabinosa y dulcitol. Reduce el óxido de trimetilamina. No forma indol. Produce nitritos a partir de nitratos. Produce sulfuro de hidrógeno. (3)

Su temperatura óptima de incubación es de 37^o C. Las colonias en gelatina son grisáceas, de transparentes a opacas, con superficie de hojuela. No licúa la gelatina. Las colonias en agar son grisáceas, de transparentes a opacas. En agar inclinado el crecimiento es blanquecino a gris, brillante, completo u ondulado. En caldo el medio se vuelve turbio con sedimento moderado y una película delicada en cultivos viejos. No tiene un olor característico. (3)

Se encuentra en el intestino humano. Es causante de la fiebre tifoidea. Es patogénico para animales de laboratorio. (3)

Mycobacterium smegmatis forma células elongadas que tienen una tendencia definida a ramificarse. Es un bacilo gram positivo; no excede los 1.5 micrones y tiene mayoritariamente alrededor de 1 micrón de diámetro. En ocasiones forma estructuras ramificadas que se asemejan al micelio de los hongos; no forma esporas. (2)

Es una micobacteria de crecimiento rápido. Da positiva la prueba de alcohol ácido resistente para el ácido pero no para el alcohol. Da negativa la prueba de la arilsulfatasa y la de catalasa. Crece en agar MacConkey sin cristal violeta. Reduce los nitratos. (2)

Su temperatura óptima de crecimiento es de 28^o C. La mitad de las cepas clínicas producen una pigmentación amarillo anaranjada en cultivos viejos. Las colonias en agar son habitualmente elevadas, rugosas y de bordes festoneados, aunque algunas cepas forman colonias lisas. (2)

Se encuentra naturalmente en suelo y agua. Su potencial patógeno es escaso ya que es poco frecuente en la patología humana. En esos casos, se ha asociado a infecciones en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva, infecciones de la piel y partes blandas tras traumatismos y cirugía, infecciones articulares, bacteriemia relacionada con catéteres, endocarditis, linfadenitis e infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos. (2)

Pseudomonas aeruginosa es un bacillo recto de 0.5 a 0.6 por 1.5 micrones, ocurre aislado, en parejas o en cadenas cortas. Presenta motilidad ya que posee de uno a tres flagelos polares monotricos. Es una bacteria gram negativa, aeróbica facultativa. (3)

Usualmente da negativa la prueba de formación del indol. Reduce los nitratos a nitritos y nitrógeno. No ataca la glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrina, inulina, glicerol, manitol y dulcitol. Forma ácido de la glucosa. Provoca hemólisis. (3)

Su temperatura óptima de incubación es de 37 °C. Las colonias en gelatina son amarillentas o verdosas, corrugadas, irregulares, similares a madejas de hilo. Licúa rápidamente la gelatina. Las colonias en agar son grandes, esparcidas, grisáceas con centro oscuro y orilla translúcida, irregulares. El medio se torna verdoso. En agar inclinado las colonias son abundantes, delgadas, blancas, brillantes. El medio se torna verde a café oscuro o incluso negro, fluorescente. (3)

En caldo hay una marcada turbidez con una película gruesa y sedimento pesado. El medio se torna de amarillo verdoso a azul, con fluorescencia, posteriormente café. Produce pyocianina, fluoresceína y pyrorubrina. Los cultivos tienen un marcado olor de trimetilamina. (3)

Es patógena para conejos, conejillos de Indias, ratas y ratones. Se encuentra en el pus de las heridas. Es causante de lesiones en humanos y animales. Se encuentra en agua contaminada y desagües. (3)

Escherichia coli es un bacilo usualmente de 0.5 por 1.0 a 3.0 micrones, variando de casi cocoide a largos bacilos, ocurre aislado, en parejas y en cadenas cortas. Hay variedades móviles y no móviles. Las cepas móviles tienen flagelos peritricos. No usualmente encapsulada. No forma esporas. Es gram negativa, aeróbica facultativa. (3)

No utiliza ácido cítrico y sales de ácido cítrico como única fuente de carbono. No produce acetilmetilcarbinol. Da positiva la prueba del rojo de metilo. Produce dióxido de carbono e hidrógeno en volúmenes aproximadamente iguales a partir de glucosa. No utiliza ácido úrico como única fuente de nitrógeno. Puede utilizar uracilo como única fuente de nitrógeno. (3)

No produce sulfuro de hidrógeno en agar peptona hierro. Usualmente da positiva la prueba del indol. Produce nitritos a partir de nitratos. Algunas cepas son hemolíticas. Da negativo el test de Voges-Proskauer. Produce catalasa. Forma ácido y gas a partir de glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y manitol. La sacarosa, rafinosa, salicina, esculina, dulcitol y glicerol pueden o no ser fermentados. (3)

Crece en condiciones normales de laboratorio con crecimiento óptimo de 30 a 37 ° C. Las colonias en gelatina son opacas, húmedas, grisáceas a blancas, completas. No licúa la gelatina. Las colonias en agar son usualmente blancas, a veces amarillentas y raramente amarillas, amarillo-café, dorado-café, rojizo naranja o rojas, completas u onduladas, húmedas, homogéneas. En agar inclinado el crecimiento es usualmente blanco, a veces amarillento, rara vez amarillo, amarillo-café, dorado-café, rojizo anaranjado o rojo, húmedo, brillante. En caldo el medio se vuelve turbio con sedimento pesado grisáceo. No forma película; produce olor fecal. (3)

Normalmente habita el intestino del hombre y todos los vertebrados. Ampliamente distribuida en la naturaleza. Frecuentemente causa infecciones del tracto genito-urinario. Invade el sistema circulatorio en fases avanzadas de infección. Se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua y variedad de alimentos proteínicos y vegetales. (3)

2. Métodos actuales para la identificación de microorganismos

Las últimas décadas han producido una explosión de nuevos métodos en el laboratorio microbiológico. Aún en la década de los 70 los diagnósticos de laboratorio definitivos para enfermedades infecciosas eran mayoritariamente alcanzados únicamente por medio del uso de técnicas engorrosas, costosas, lentas y usualmente subjetivas, que requerían personal altamente capacitado y experimentado. (17)

Los microorganismos se visualizaban directamente por microscopía de material clínico teñido. Alternativamente o en adición, se realizaban cultivos usando métodos de un siglo de antigüedad en

medios sólidos o líquidos. Los organismos recuperados en el cultivo eran identificados por métodos convencionales laboriosos basados en el crecimiento y, cuando era necesario, se realizaban pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el procedimiento manual de difusión de discos. (17)

Varias áreas específicas han tenido un gran cambio en el laboratorio clínico microbiológico actual. En el campo de la identificación de bacterias, ésta se logra ahora en gran parte a través de sistemas de utilización de sustrato miniaturizados, muchos de los cuales son automatizados. Además el uso de pruebas basadas en el examen de ácidos nucleicos ha jugado un papel cada vez más importante en la detección y caracterización de microorganismos. Finalmente la caracterización por métodos cromatográficos comienza a utilizarse para la identificación de cultivos y detección en muestras clínicas. (17)

Por otro lado, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son comúnmente realizadas con procedimientos de microdilución de caldos de cultivo comerciales o por alguna forma instrumental. La bacteremia y fungemia son usualmente detectadas por sistemas comerciales instrumentales de cultivo en sangre. Existen nuevos métodos de inmunodiagnóstico para detección de antígenos y anticuerpos. (17)

La identificación de bacterias y levaduras por medio de sistemas de utilización de sustratos se basa en las siguientes características: reacciones que producen cambios de pH; perfiles enzimáticos, detectados visual o automáticamente por liberación de cromógenos o fluorógenos; utilización de fuentes de carbono, midiendo actividad metabólica visual o automáticamente con cambios de color; detección de productos metabólicos, por cromatografía; y, detección visual de crecimiento, variando el sustrato. (17)

Los análisis de ADN se dividen en convencionales y amplificados. Ambos han demostrado ser útiles para la caracterización de microorganismos para los cuales los métodos de cultivo y serológicos son difíciles, demasiado caros o inaccesibles. Los ensayos convencionales son particularmente adecuados para la hibridación in situ en tejido en que la localización y distribución de los organismos debe cerciorarse, o para confirmación de cultivos de microorganismos de crecimiento lento. (17)

El alto nivel de sensibilidad alcanzado con las técnicas de amplificación hace de éstas el método a escoger para la detección directa de ADN microbiano en muestras clínicas. Aunque es importante

recordar que estos procedimientos no reemplazan el cultivo convencional y los procedimientos serológicos en todas las situaciones, por varias razones. (17)

En primer lugar, las pruebas de ácidos nucleicos determinan si el ADN o ARN de un organismo en particular está presente en la muestra pero no revelan nada acerca de la viabilidad del organismo o si está implicado en un proceso infeccioso. Por otro lado para garantizar que el material genético identificado pertenece únicamente a la muestra, es necesario trabajar en un ambiente completamente limpio, libre de cualquier residuo genético contaminante y con protocolos de trabajo que eviten la contaminación de la muestra en todas las etapas de preparación y análisis. (17)

Otra parte significativa de la microbiología clínica es la caracterización fenotípica de microorganismos. El uso de métodos como la cromatografía para propósitos de identificación se ha vuelto, por lo tanto, cada vez más importante. Dependiendo del tipo de compuesto a ser detectado se utilizan diferentes métodos cromatográficos. Por ejemplo la separación de proteínas implica algún tipo de cromatografía líquida-sólida al igual que carbohidratos y polisacáridos complejos. Los ácidos grasos de cadena larga suelen separarse e identificarse por cromatografía gaseosa. Componentes separados como proteínas, ADN, ARN y carbohidratos usualmente se detectan visualmente separándolos por cromatografía de capa fina. (5, 9, 10, 14 15, 16, 19, 20)

B. La Cromatografía

1. La cromatografía como técnica analítica

La cromatografía es un método de separación basado en las diferencias de afinidad de los diferentes compuestos (analitos) entre una fase móvil y una fase estacionaria. Dado que cada analito tiene una afinidad específica en relación a estas fases, la migración entre las fases es diferente para cada uno dando origen a la separación a lo largo del desarrollo de la cromatografía. Los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. La distinta movilidad permite la separación de los componentes en bandas o zonas discretas. (21)

La cromatografía en columna fue inventada y denominada así, a principios del siglo XX, por el botánico ruso Mikhail Tswett, al aplicar la técnica para separar pigmentos vegetales. Desde entonces las

aplicaciones, cualitativas y cuantitativas, de la cromatografía se han extendido a todas las ramas de la ciencia. (6, 21)

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la cromatografía en columna un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por gravedad o presión. En la cromatografía en plano la fase estacionaria se fija sobre una placa o a los intersticios de un papel y la fase móvil se desplaza a través de ella por capilaridad. (21)

Una clasificación más fundamental de los métodos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de analitos entre las fases. Un resumen de esta clasificación se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de métodos cromatográficos

Clasificación general	Método específico	Tipo de fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía líquida	Líquido-líquido	Líquido adsorbido a soporte sólido	Reparto entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a soporte sólido	Reparto entre líquido y fase modificada
	Líquido-Sólido o de adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión	Polímero con intersticios	Distribución por exclusión según tamaño
Cromatografía de Gases	Gas-líquido	Líquido adsorbido a soporte sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a soporte sólido	Distribución entre líquido y fase modificada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de Fluidos Supercríticos		Especies orgánicas enlazadas a soporte sólido	Distribución entre líquido y fase modificada

Fuente: Skoog *et. al.* 1992. Principios de Análisis Instrumental.

2. La cromatografía de gases

La cromatografía de gases más utilizada se basa en la distribución de un analito entre una fase móvil gaseosa inerte, comúnmente argón o helio, y una líquida inmovilizada sobre una superficie sólida inerte. La muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de la fase móvil, que no interacciona con las moléculas de analito. Las sustancias se separan, en función de su punto de ebullición, por lo que el control de la temperatura de la columna es determinante. (12, 21)

La elección del gas portador a utilizar se hace en función del tipo de detector a utilizar, ya que su única función es de transporte, mientras que la elección de la columna es esencial para la separación. Existen dos tipos fundamentales de columnas para CG, 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. Las columnas obtenidas mediante esta técnica son flexibles y pueden enrollarse longitudes considerables en cilindros de unos cuantos centímetros de diámetro. Al aumentar el largo de la columna se mejora la separación. (12, 21)

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; y, polietilenglicoles, para ácidos libres, alcoholes, éteres, aceites esenciales y glicoles. (21)

3. La espectrometría de masas como método de detección en cromatografía

La primera aplicación general de la espectrometría de masas en análisis químico se produjo a principio de los años cuarenta, en la industria del petróleo, para el análisis cuantitativo en mezclas de hidrocarburos. A comienzos de los años cincuenta se empezó a utilizar para la identificación y elucidación estructural de una amplia variedad de compuestos orgánicos. Esta capacidad se aplicó posteriormente a la cromatografía como un método de detección muy valioso. (21)

Para obtener un espectro de masas se bombardea el vapor del analito con un haz de electrones que da lugar a la pérdida de un electrón del analito y la formación de un ion molecular que es una especie cargada radicalar. La colisión entre los electrones energéticos y las moléculas de analito proporcionan suficiente energía para dejarlas en estado excitado. La relajación se produce posteriormente con frecuencia mediante fragmentación de parte de los iones moleculares, que dan lugar a iones de masas más bajas. Los iones positivos producidos por impacto de electrones pasan a través de la rendija del espectrómetro de masas, de donde salen de acuerdo con su relación masa/carga originándose el espectro de masas. Al pico más alto, denominado pico base, se le asigna el valor arbitrario de 100 y se considera la altura del resto de picos como un porcentaje de la altura del pico base. (13, 21)

Como detector en cromatografía el espectrómetro de masas brinda amplia información acerca de los analitos. En primer lugar permite determinar el peso molecular. Un análisis más detallado permite la elucidación estructural del compuesto. La identificación de sustancias conocidas puede hacerse de manera más rápida al comparar el espectro de masa obtenido con una librería de espectros. En el caso de sustancias desconocidas la comparación de los espectros de masas de los analitos permite decir con certeza si un pico de un cromatograma corresponde a la misma sustancia de un pico en otro cromatograma. (13, 21, 22)

4. La identificación de microorganismos por técnicas cromatográficas

El uso de métodos cromatográficos con fines de identificación y como herramienta de caracterización fenotípica ha cobrado importancia en la microbiología recientemente. Cuando se utilizan apropiadamente estas técnicas son extremadamente útiles para identificar microorganismos de interés clínico, permitiendo la automatización y rapidez en la identificación de los mismos. (7, 17, 18, 23, 24)

Naturalmente, dependiendo del tipo de compuestos a ser separados e identificados se han aplicado diferentes métodos. Por ejemplo, la separación de proteínas de manera que no dañe las moléculas separadas, generalmente implica el uso de cromatografía líquido-líquido. Los carbohidratos complejos y polisacáridos son separados normalmente usando cromatografía líquido-sólido, al igual que fragmentos de ADN y ARN, aunque los mono y disacáridos también pueden ser separados por cromatografía gas-líquido. (10, 17)

Los ácidos grasos de cadena larga que componen las paredes celulares son identificados usualmente por cromatografía gaseosa, aunque los ácidos micólicos también han sido separados utilizando cromatografía líquida de alta resolución. (5, 11, 25)

El uso de la cromatografía de gases para la identificación de microorganismos a través del análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos celulares comienza a generalizarse, existiendo métodos comerciales y diversidad de técnicas de preparación de muestra y de análisis cromatográficos reportados. (1, 4, 7, 14, 26, 27)

Los detectores utilizados también varían dependiendo de la señal biológica y varían desde detectores espectrofotométricos, usados principalmente para proteínas y polisacáridos, hasta detectores de pH para ácidos y bases. Las tinciones de componentes separados, como proteínas, ADN, ARN y carbohidratos son usualmente detectados visualmente en cromatografía de capa fina. (17)

El método de análisis también toma en cuenta factores como la sensibilidad y especificidad de los detectores, las ventajas de los métodos no destructivos, la necesidad de derivatización, etc. (21)

Los métodos cromatográficos usados para la caracterización e identificación de microorganismos además pueden enfocarse de distintos modos para alcanzar dicho objetivo. Así se ha trabajado el análisis de productos metabólicos y el análisis de componentes estructurales de los microorganismos. (17)

La cromatografía se ha utilizado por casi 40 años como método para la detección de ácidos orgánicos de cadena corta (ácidos grasos volátiles) y alcoholes producidos por anaerobios obligados. Dado que por su incapacidad de utilizar el oxígeno como aceptor final de la cadena de electrones los anaerobios obligados han desarrollado rutas metabólicas alternativas únicas para cada género e incluso especie. La aplicación de la cromatografía para el análisis de los componentes de estas rutas ha demostrado ser una útil herramienta complementaria para la identificación de estas especies. (17)

Por otra parte las bacterias y levaduras, como organismos vivos están compuestos de los cuatro tipos principales de biomoléculas: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los monómeros de estos componentes mayoritarios son 20 aminoácidos, cinco bases nitrogenadas, aproximadamente 10

azúcares y más de 300 ácidos grasos. De allí que para el análisis monomérico, los ácidos grasos presentan una gran diversidad en los microorganismos, y por tanto proveen de un amplio rango de características fenotípicas para la identificación de bacterias y levaduras. Además los ácidos grasos generalmente son parte estable de las estructuras de cualquier microorganismo y por lo tanto están siempre presentes en una forma predecible. (17)

Mientras que el análisis de ácidos grasos volátiles es complementario a la identificación bioquímica, los ácidos grasos de cadena larga pueden ser utilizados por sí solos o combinados con información bioquímica para la identificación de microorganismos. (17)

Aunque el análisis de ácidos grasos se realiza usualmente por medio de cromatografía gaseosa a través del análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de la célula completa, algunos ácidos muy grandes, como los ácidos micólicos (presentes en mycobacteria, *Nocardia spp.* Y *Rhodococcus spp.* por ejemplo) se analizan más efectivamente con CLAR. (5, 9, 15, 16, 17)

La aplicación de técnicas cromatográficas a la identificación microbiana implica varias consideraciones importantes. Temas como la estandarización en los métodos de crecimiento, extracción y derivatización, los compuestos a ser analizados, etc. son factores significativos para el éxito. El análisis de datos y el diseño de algoritmos de identificación quedan a criterio del analista. El análisis de datos puede ser tan simple como la identificación de picos o más sofisticado como reconocimiento de perfiles o análisis de cluster. (8, 16, 17)

El análisis de perfiles de carbohidratos también se ha utilizado para la identificación de microorganismos, aunque en mucho menor medida que el de ácidos grasos. Resulta útil para algunos géneros como *Cryptococcus* y *Bacillus*. (10, 19)

IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala actualmente la identificación de microorganismos para el diagnóstico de enfermedades se realiza a través de métodos convencionales. Estos generalmente incluyen cultivos, que pueden tardar de días a semanas, con lo cual el tiempo necesario para el diagnóstico adecuado se extiende mientras empeora la salud de los pacientes. Esta situación se agrava al considerar la elevada capacidad de mutación de los patógenos, su rápida difusión a través de los medios de transporte modernos y el contacto humano con nuevos vectores al ampliar su hábitat. Es necesario, por lo tanto, implementar nuevos métodos para la identificación de microorganismos que permitan resultados más rápidos, conservando la exactitud en el diagnóstico.

En este trabajo de investigación se desarrolló metodología que permite caracterizar microorganismos, por medio de la identificación de marcadores químicos, utilizando técnicas cromatográficas. Esta metodología mejorará el diagnóstico clínico al reducir el tiempo de análisis de muestras a pocas horas. Además, a largo plazo disminuye los costos de análisis, ya que ahorra el gasto en enzimas, medios de cultivo, incubadoras, y tiempo de trabajo.

La metodología desarrollada servirá además de base para futuras investigaciones en este campo, ya que puede ampliarse para otros microorganismos no incluidos en esta investigación, e incluso servir de referencia para el desarrollo de métodos de diferenciación celular en otros campos. Adicionalmente, se obtuvo información bacteriológica acerca de marcadores químicos para cada una de las especies incluidas, que puede aplicarse a otras ramas además de la microbiología clínica, como la bacteriología industrial, el control de calidad microbiológico en alimentos, agua, fármacos, entre otras.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

- Identificar marcadores químicos que permitan caracterizar y diferenciar a los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

B. Objetivos Específicos

- Desarrollar una metodología que permita caracterizar los lípidos de los microorganismos del estudio usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).
- Desarrollar una metodología que permita diferenciar a los microorganismos del estudio por medio de marcadores químicos detectables con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).

VI. HIPÓTESIS

No aplica el planteamiento de hipótesis debido al carácter descriptivo de la investigación.

VII. MATERIALES Y MÉTODO

A. Materiales

1. Cristalería

- Probetas de 25 y 100 ml
- Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25 ml
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas automáticas de 1000 y 200 μ l
- Bureta de 50 ml con llave de teflón
- Beakers de 25, 50, 250 y 500 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Tubos de cultivo de 10 ml
- Frascos ámbar de 4 ml
- Frascos ámbar de 10 ml
- Varilla de agitación

2. Reactivos

- Metanol grado CLAR
- Hexano grado CLAR
- Etanol
- Sodio metálico
- Helio 99.999 %

3. Equipo

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 II plus con detector de espectrometría de masas HP 5970, equipado con columna Restek Rtx-5¹ de 30m, 0.25 mm DI y recubrimiento 0.50 μ m.
- Refrigerador
- Microcentrífuga
- Agitador vórtex

¹ 5 % polidifenil siloxano y 95 polidimetil siloxano.

4. Otros materiales

- Asas de nicromo
- Pipeteadores
- Bulbos para pipetas Pasteur
- Puntas para micropipetas automáticas
- Jeringas para inyección en CG
- Gradilla para tubos de ensayo
- Espátulas metálicas

B. Universo y Muestra

El universo de trabajo lo constituyen las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

La muestra consiste en porciones de masa bacteriana proveniente de cultivos sobre agar tripticasa de soya de las cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

C. Diseño de Investigación

Para cada uno de los microorganismos se tomaron las colonias cultivadas en medio sólido (agar tripticasa de soya) y se realizó la lisis celular y derivatización con metóxido de sodio 8 % en metanol, agitando por 1 min, seguido de extracción con hexano.

Se realizaron pruebas para encontrar las condiciones analíticas adecuadas para la resolución de los componentes. Con los datos de las pruebas preliminares se desarrolló un método por CG/EM con el que se analizaron los extractos bacterianos. En el análisis de los cromatogramas se identificaron picos característicos de cada especie.

D. Procedimiento

Preparación de muestras:

1. Se lavó cuantitativamente toda la cristalería a utilizar, esterilizando con etanol al final.
2. Se identificó una serie de frascos de 4 y 10 ml para cada microorganismo y solución a contener.

3. Se preparó 50 ml de solución de metóxido de sodio en metanol 8 % (p/v).
4. Se agregó a cada tubo rotulado 1.500 ml de solución de metóxido.
5. Se agregó una asada llena de masa bacteriana a cada tubo correspondiente, recolectándola con un asa de nicromo y agitándola para liberarla en el vial.
6. Se agitó y dejó reaccionar por 1 minuto.
7. Se agregó 0.900 ml de hexano.
8. Se agitó por 1 minuto y se centrifugó por 3 minutos para separar las fases.
9. Se recolectó la fase orgánica y se trasvasó a un vial de 4 ml identificado.

Análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas:

1. Se realizaron pruebas preliminares con dos de los extractos utilizando diferentes condiciones de análisis en una columna DB-5, variando la temperatura del inyector, temperatura inicial del horno, temperatura final, rampa de temperatura, modo de inyección y volumen de inyección
2. Se grabó en el equipo de CG/EM un método para los extractos, tomando en cuenta las pruebas preliminares, con la siguiente descripción: Inyección: 1 μ L splitless por 30 segundos; temperatura de inyección 280 °C; temperatura inicial del horno 150 °C por 5 minutos, gradiente de 3 °C/min hasta 180 °C, gradiente de 2 °C/min hasta 220 °C y temperatura final de 220 °C por 70 minutos; temperatura de interface 280 °C; detector de espectrometría de masas en modo de barrido desde m/z 40 hasta m/z 550, con 15 minutos de tiempo muerto.
3. Se inyectaron las muestras y se recolectó los espectros y cromatogramas correspondientes.

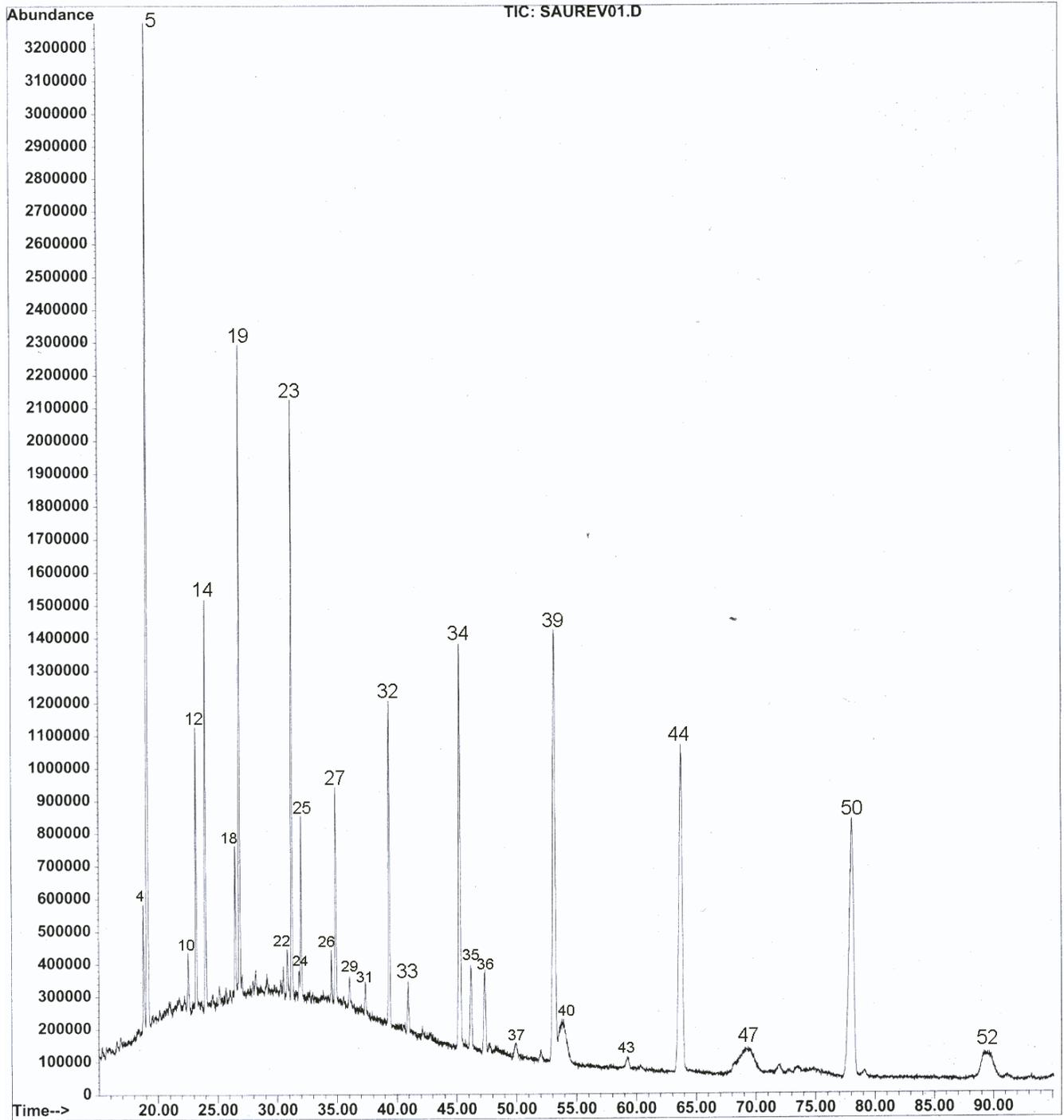
Análisis de cromatogramas:

1. Se numeró los picos de todos los cromatogramas de acuerdo a su tiempo de retención.
2. Se identificaron picos iguales y diferentes en los cromatogramas de las bacterias analizadas obtenidos en las mismas condiciones.
3. Se buscó la diferenciación de las especies de estudio basándose en la presencia y/o ausencia de picos característicos en sus cromatogramas, específicamente de picos exclusivos de cada especie.
4. Se realizó la elucidación estructural de los compuestos correspondientes a los picos exclusivos de cada especie, para su asignación como marcadores químicos.

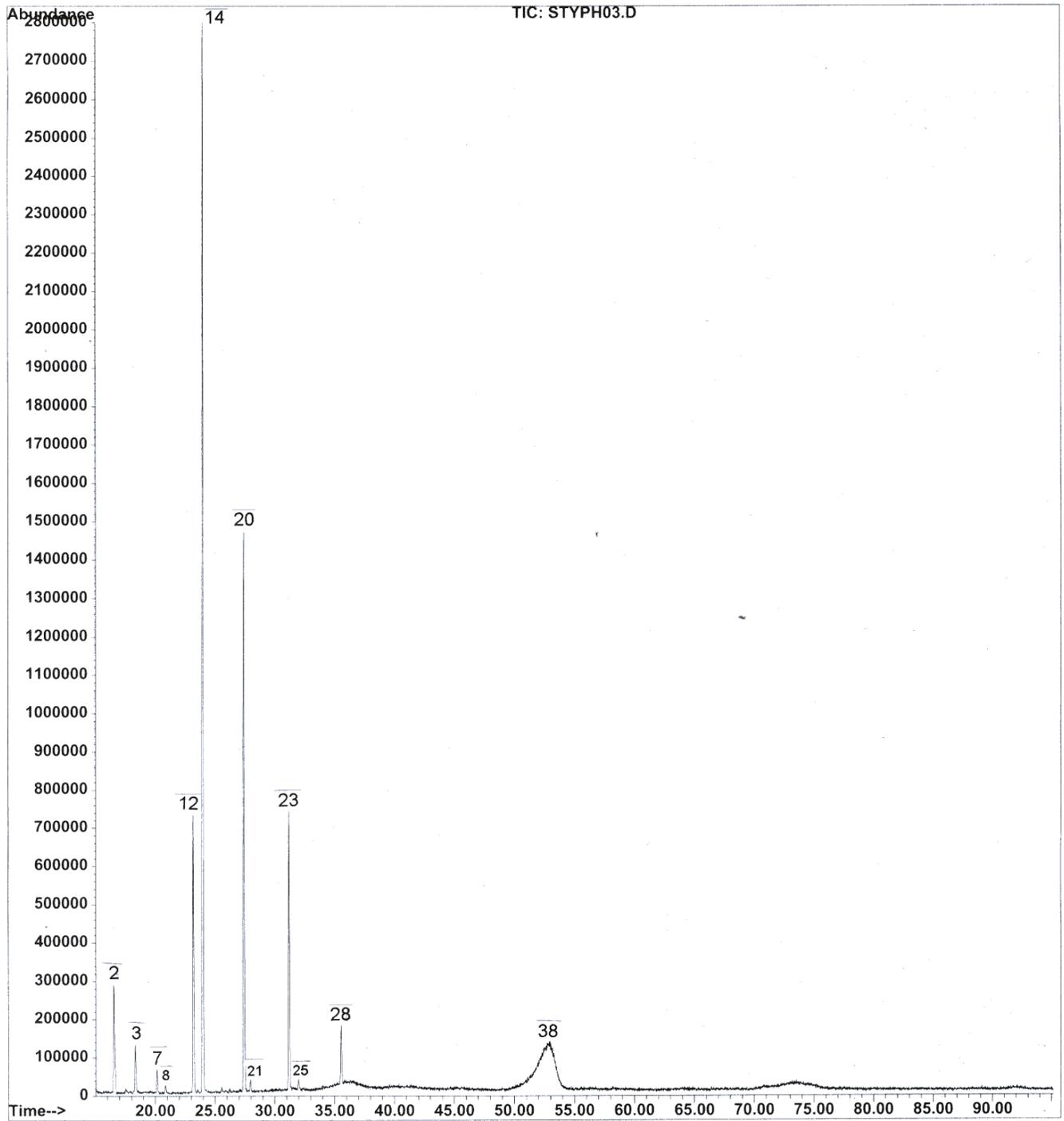
VIII. RESULTADOS

Se obtuvo un cromatograma para cada bacteria que se presentan en las gráficas 1 a la 5, a continuación:

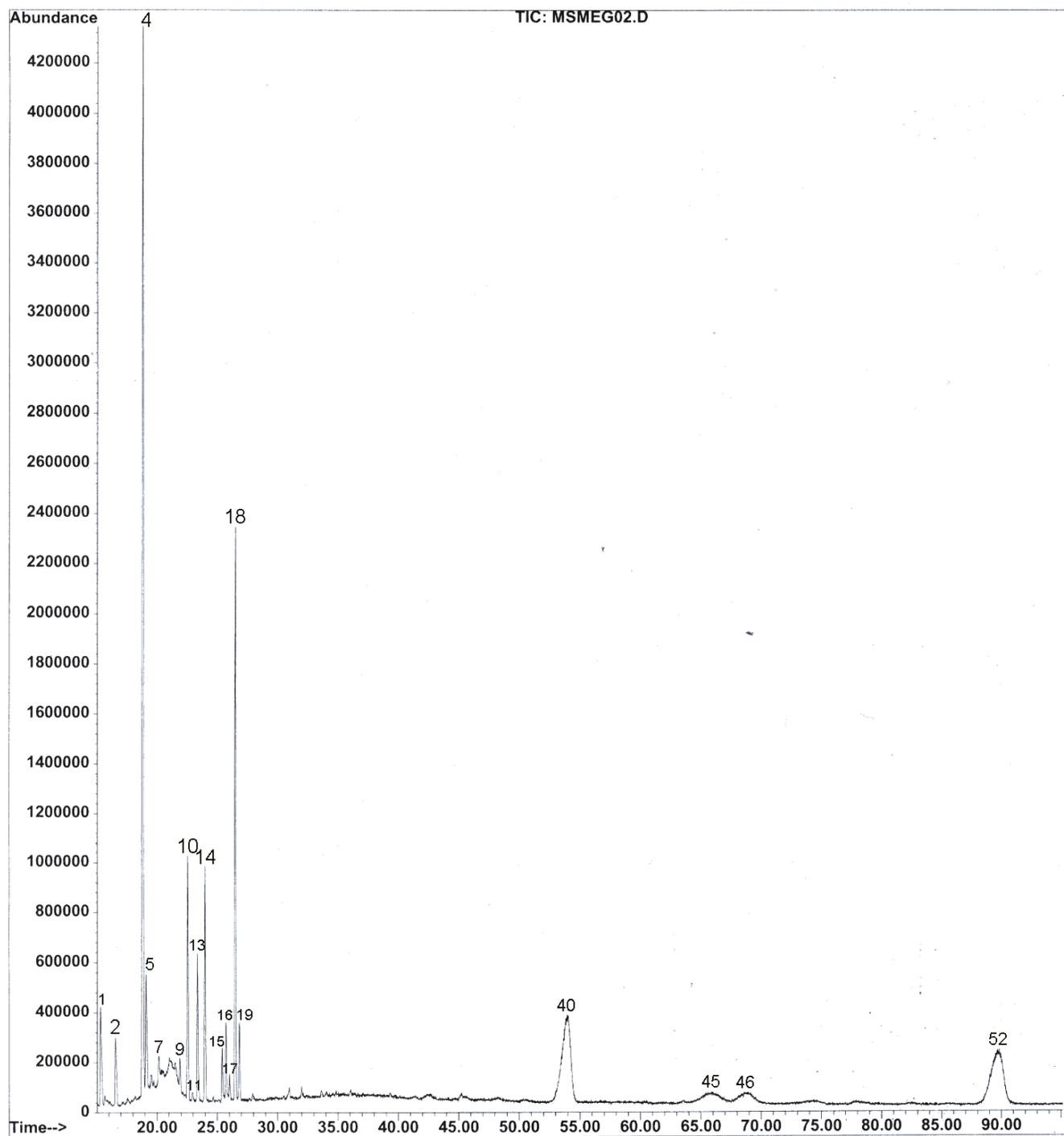
Gráfica 1. Cromatograma de la bacteria *Staphylococcus aureus*



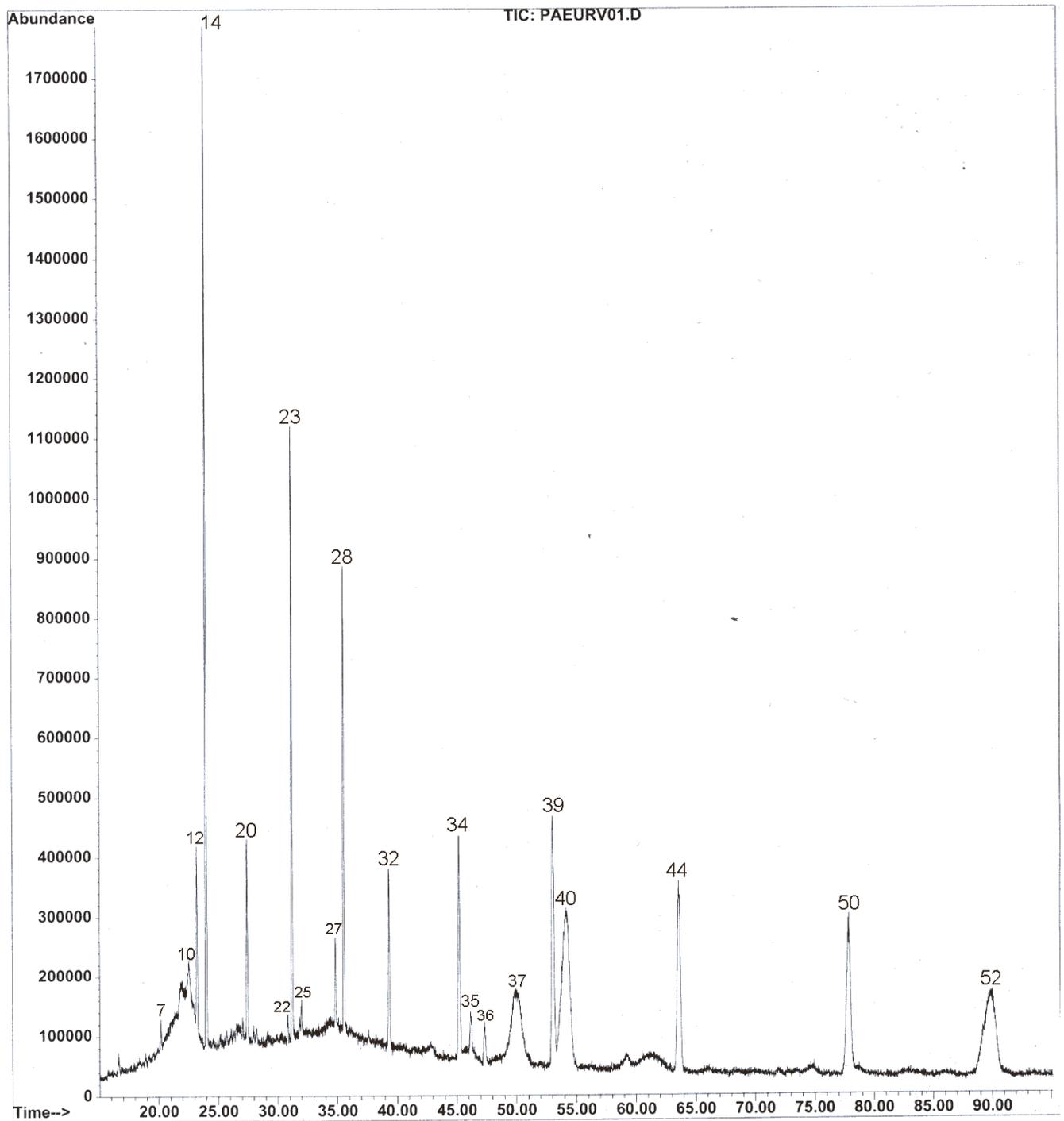
Gráfica 2. Cromatograma de la bacteria *Salmonella Thyphi*



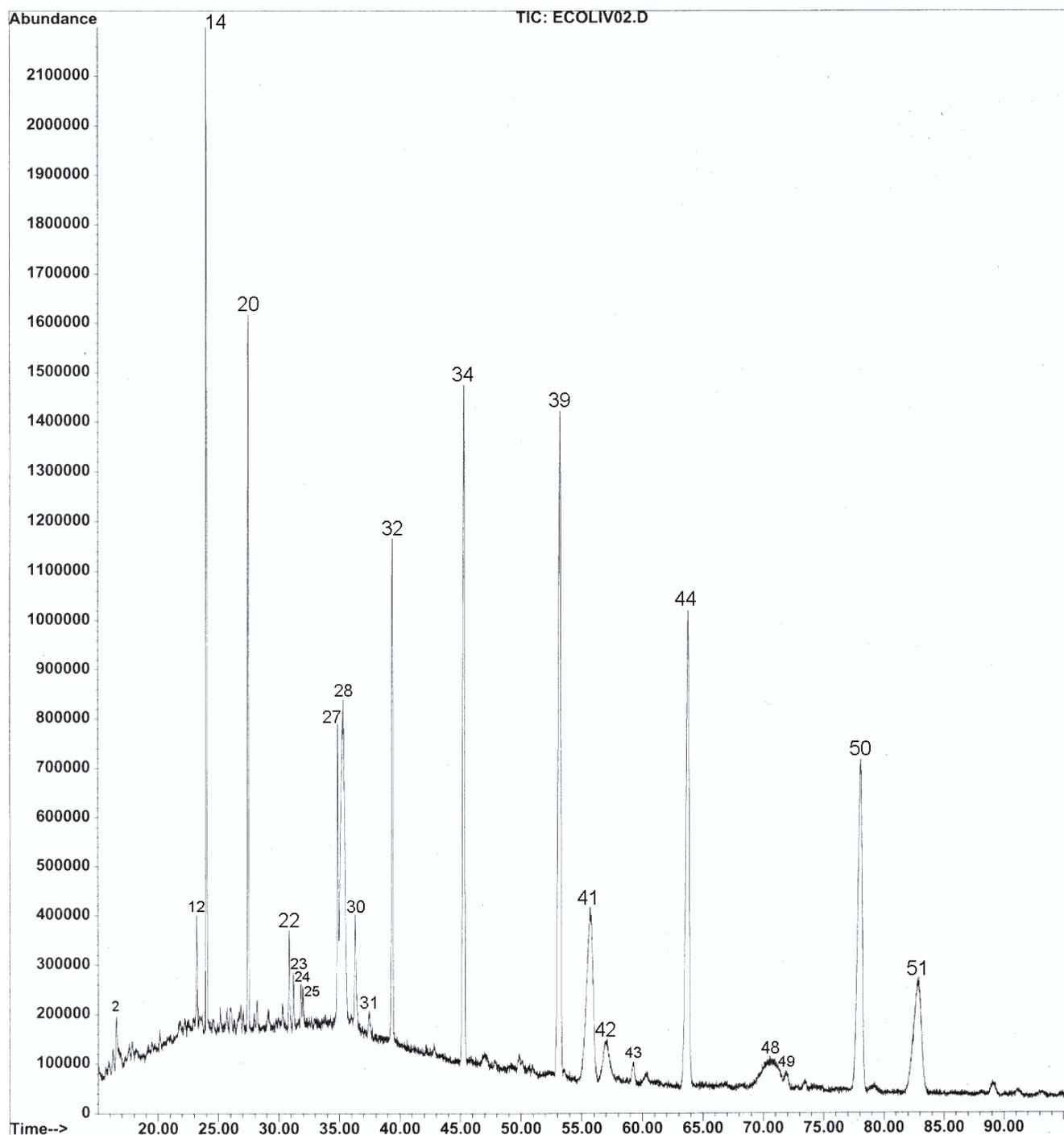
Gráfica 3. Cromatograma de la bacteria *Mycobacterium smegmatis*



Gráfica 4. Cromatograma de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*



Gráfica 5. Cromatograma de la bacteria *Escherichia coli*



Los picos exclusivos importantes encontrados para cada bacteria se detallan en la tabla a continuación y sus espectros de masa pueden encontrarse en las gráficas del Anexo B:

Tabla 2. Picos exclusivos en los cromatogramas de cada bacteria

No.	Bacteria	Tiempo de retención (min)	Compuesto al que corresponde
1	<i>M. smegmatis</i>	15.31	n-Tetradecanoato de metilo
3	<i>S. typhi</i>	18.32	9-tetradecenoato de metilo
13	<i>M. smegmatis</i>	23.36	9-Z-hexadecenoato de metilo
15	<i>M. smegmatis</i>	25.41	No identificado
16	<i>M. smegmatis</i>	25.72	heptadecenoato de metilo*
17	<i>M. smegmatis</i>	26.01	No identificado
26	<i>S. aureus</i>	34.53	n-Nonadecanoato de metilo
29	<i>S. aureus</i>	36.04	No identificado
30	<i>E. coli</i>	36.30	nonadecenoato de metilo*
33	<i>S. aureus</i>	40.94	n-Eicosanato de metilo
41	<i>E. coli</i>	55.68	Heneicosano
42	<i>E. Coli</i>	57.00	No identificado

Fuente: Datos experimentales

* Posición de la insaturación no localizada.

De los demás picos, aquellos que son útiles para la diferenciación entre las especies bajo investigación se detallan a continuación:

Tabla 3. Relación al pico mayoritario de picos útiles para la diferenciación de *P. aeruginosa* en las muestras analizadas

No.	Tiempo de retención (min)	Compuesto al que corresponde	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
20	27.44	10-Z-heptadecenoato de metilo		52.4 %		20.0 %	71.4 %
28	35.55	10-Z-nonadecenoato de metilo		5.3 %		46.1 %	32.6 %
14	24.00	n-hexadecanoato de metilo	42.2 %	100 %	21.9 %	100 %	100 %

Fuente: Datos experimentales

De acuerdo con el análisis de los datos anteriores, la lista de picos para la diferenciación de las especies bacterianas estudiadas se resume a continuación:

Tabla 4. Resumen de picos para diferenciación de las bacterias *S. aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*

Bacteria	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhi</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
No.	26	3	1	20	30
	29	21	13	28	41
	33	20	15		42
		28	16		20
			17		28

Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de desarrollar una metodología adecuada para el análisis de ácidos grasos celulares de los microorganismos bajo estudio, se realizaron diversas pruebas para optimizar diferentes parámetros en la preparación de muestras y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Para la derivatización de las muestras, con el fin de obtener como analitos ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares, se probaron diferentes concentraciones de metóxido de sodio en metanol, tiempos y modos de agitación para la transesterificación y la extracción con hexano. Después de varias pruebas se determinó que para la preparación de muestras era adecuada una concentración del 8 % de metóxido de sodio en metanol, ya que concentraciones mayores no incrementaban la respuesta.

También se encontró que es suficiente un minuto de agitación al utilizar un agitador vórtex, tanto para la transesterificación como para la extracción. En el caso de la transesterificación, en menos de un minuto se puede obtener una suspensión homogénea de una asada llena de masa bacteriana en 1500 μ L de metóxido 8 % en metanol. También se encontró que aplicar ultrasonido en esta fase del procedimiento, como se había planteado originalmente, resulta contraproducente ya que aumenta la cantidad de subproductos de bajo peso molecular en los cromatogramas.

Para la extracción con hexano, puede utilizarse un tiempo de agitación menor a un minuto con buenos resultados. Sin embargo se tomó este valor por comodidad, al ser fácilmente reproducible. Luego de la extracción, las fases se separan por gravedad, pero se optó por la centrifugación para hacer más rápido y reproducible el procedimiento. El extracto obtenido es directamente inyectable al cromatógrafo, bajo las condiciones establecidas para los análisis.

Para la determinación de las condiciones de operación del cromatógrafo se realizaron varias corridas con los extractos de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* tras lo cual se fijaron los parámetros descritos en el procedimiento. Se eligió estas bacterias como representativas de los bacilos gram negativos y los cocos gram positivos, respectivamente. El tiempo de retraso para el encendido del detector se fijó

en 15 minutos para evitar la serie de picos correspondientes a compuestos de bajo peso molecular que no tienen utilidad analítica, ya que son comunes a todas las bacterias del estudio. La programación de temperatura utilizada permite la resolución adecuada de picos manteniendo bajo el ruido de fondo.

Una vez obtenidos los cromatogramas para todos los microorganismos bajo estudio se procedió a numerar los picos de acuerdo a su tiempo de retención. De esta manera se determinó cuáles son los picos exclusivos para cada bacteria, que se enlistan en la Tabla 2, y los picos comunes a dos o más de los microorganismos.

Los picos exclusivos de cada microorganismo permiten su rápida identificación ya que al ser propios de cada bacteria, el encontrarlos en un cromatograma permite deducir inmediatamente de qué microorganismo se trata, bajo las condiciones analíticas especificadas.

La única bacteria que no presentó picos exclusivos fue *Pseudomona aeruginosa*, por lo que para identificarla se utilizó la relación entre algunos picos importantes, que se describen en las Tablas 3 y 4, y el pico mayoritario. Este microorganismo se caracteriza entonces por la ausencia de los picos exclusivos de las demás bacterias bajo estudio y una relación en las alturas de picos 20 y 28 respecto al 14, muy distinta a la de otras bacterias con estos componentes, para las muestras analizadas.

Se encontró que la bacteria *Staphylococcus aureus* posee tres pequeños picos exclusivos de la misma. Dos de ellos fueron identificados como n-nonadecanoato de metilo y n-eicosanoato de metilo, mientras que el compuesto con un tiempo de retención de 36.04 minutos no fue identificado. Para ambos compuestos identificados se comparó visualmente el espectro de masas obtenido experimentalmente con el espectro del compuesto correspondiente encontrado en la biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) y se corroboró por interpretación de los picos principales. Los espectros pertinentes corresponden a las gráficas 15-17, 19 y 20 del Anexo B.

Para la bacteria *Salmonella typhi* se identificó como exclusivo un pico pequeño pero bien definido correspondiente al 9-Z-tetradecenoato de metilo. El espectro de masas experimental se comparó

con el de referencia y se corroboró la correspondencia por interpretación de los picos principales. Ambos espectros se muestran en las gráficas 8 y 9 del Anexo B.

La bacteria *Mycobacterium smegmatis* presentó una cantidad considerable de picos exclusivos. De los cuales se identificaron 3 compuestos y quedaron 2 pendientes de identificar. Los picos con 1 y 13 corresponden a los compuestos n-tetradecanoato de metilo y 9-Z-hexadecenoato de metilo respectivamente. Esto se comprobó al comparar sus espectros de masa con los espectros de referencia de las sustancias mencionadas y por la interpretación de picos principales, como se puede comprobar en las gráficas 6, 7, 10 y 11 del Anexo B.

Para los picos 15 al 17 no se encontró ningún espectro de referencia que coincidiera con el espectro de masas experimental. En el caso del pico con 16 y tiempo de retención de 25.72 minutos, la interpretación espectral llevó a la conclusión de que se trata de un heptadecenoato de metilo, no siendo posible la localización certera de la insaturación sin el uso de otras técnicas analíticas.

En el caso de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* no se encontró ningún pico exclusivo de la misma. Esto es en sí mismo una característica que permite su diferenciación de las demás bacterias bajo estudio. Como complemento, sin embargo, se midió el porcentaje de dos picos principales de esta bacteria con respecto al pico mayoritario y se encontró que el patrón de las proporciones en este microorganismo es distintivo del de las otras bacterias que poseen los mismos picos.

Las proporciones mencionadas, expresadas como porcentaje se encuentran en la tabla 3 de la sección de resultados. Como se puede observar, mientras que en las muestras analizadas de las bacterias *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* el porcentaje de 10-Z-heptadecenoato de metilo con respecto a la cantidad de n-hexadecanoato de metilo es mayor que el porcentaje de 10-Z-nonadecenoato de metilo con respecto al mismo, para *Pseudomonas aeruginosa* sucede lo contrario.

Finalmente, la bacteria *Escherichia coli* se distingue de las demás bajo estudio por la presencia de picos correspondientes a heneicosano, un compuesto que puede ser un nonadecenoato de metilo y un compuesto no identificado con tiempo de retención de 57.00 minutos. El heneicosano se identificó por medio de la comparación del espectro de masas del pico experimental con el espectro

de referencia de dicho compuesto, mostrándose éstos en las gráficas 21 y 22 del Anexo B, y corroborándose por medio de la interpretación de los picos principales.

En el caso del pico 30, con tiempo de retención de 36.30 minutos, no se encontró ningún espectro de referencia que correspondiera al espectro de masas obtenido, por lo que se procedió a la interpretación espectral y se encontró que puede corresponder a un nonadecenoato de metilo, no pudiéndose localizar la instauración sin el uso de otras técnicas analíticas. El pico 42, con tiempo de retención de 57.00 minutos, no se logró identificar.

Adicionalmente a la diferenciación de las especies, el análisis por espectrometría de masas de los extractos bacterianos mostró otros datos interesantes. Así, el pico mayoritario de todos los microorganismos descritos como bacilos gram negativo fue el 14, correspondiente a n-hexadecenoato de metilo.

El pico mayoritario de *Mycobacterium smegmatis*, que es un bacilo gram positivo, en cambio, fue el número 4, que corresponde a n-pentadecanoato de metilo. Mientras que el pico mayoritario del coco gram positivo *Staphylococcus aureus* fue el 5, que constituye un isómero del compuesto anterior, no siendo posible la localización certera de la ramificación sin el uso de otras técnicas analíticas. Los espectros de masas pertinentes se encuentran en las gráficas 30 a 32 del Anexo B.

X. CONCLUSIONES

1. Se encontró que una metodología adecuada para la diferenciación de los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es la derivatización con metóxido de sodio 8 % en metanol y extracción con hexano para análisis de lípidos por CG/EM.
2. Se encontró que la bacteria *Staphylococcus aureus* puede identificarse al aplicar la metodología analítica propuesta por la presencia de los picos correspondientes a n-nonadecanoato de metilo, n-eicosanoato de metilo y un compuesto no identificado con tiempo de retención de 36.04 minutos.
3. Se encontró que la bacteria *Salmonella typhi* puede identificarse al aplicar la metodología analítica propuesta por la presencia de un pico correspondiente a 9-Z-tetradecenoato de metilo.
4. Se encontró que la bacteria *Mycobacterium smegmatis* puede identificarse al aplicar la metodología analítica propuesta por la presencia de los picos correspondientes a n-tetradecanoato de metilo, 9-Z-hexadecenoato de metilo y un heptadecenoato de metilo, así como otros 2 compuestos no identificados con tiempos de retención de 25.41 y 26.01 minutos.
5. Se encontró que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede identificarse al aplicar la metodología analítica propuesta por la ausencia de picos característicos y una mayor proporción de 10-Z-nonadecenoato de metilo que de 10-Z-heptadecenoato de metilo con respecto al n-hexadecanoato de metilo.
6. Se encontró que la bacteria *Escherichia coli* puede identificarse al aplicar la metodología analítica propuesta por la presencia de los picos correspondientes a n-heneicosano, un compuesto que puede ser un nonadecenoato de metilo, y un compuesto no identificado con tiempo de retención de 57.00 minutos.

XI. RECOMENDACIONES

1. Aplicar la metodología utilizada a otras cepas de los microorganismos bajo estudio para evaluar y validar las variaciones en los resultados obtenidos en esta investigación.
2. Aplicar la metodología utilizada a otros microorganismos para evaluar su capacidad como método de caracterización e identificación en un rango más amplio.
3. Aplicar y ampliar la metodología utilizada al análisis de diferentes cepas de los microorganismos estudiados.

XII. REFERENCIAS

1. *Analysis of fatty acids*. Disponible en: <http://www.cyberlipid.org/fattyt/fatt0001.htm>. Fecha de actualización: No disponible. Fecha de consulta: 12/12/2008.
2. Azna Martin, J. *Mycobacterium smegmatis*. Servicio de Microbiología, Hospitales universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. Disponible en http://www.seimc.org/control/revi_Micobac/msmeg.htm. Fecha de actualización: No disponible. Fecha de consulta: 03/07/2008.
3. Breed, R. 1948. The Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 6th. Ed. USA. The Williams & Wilkinson Company.
4. Bryan, B. and Gardner, E. 1967. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography. *Applied Microbiology*. Vol 15, No. 6, pp 1499-1500.
5. Butler, W. 1987. High Performance Liquid Chromatography Analysis of Mycolic Acids as an Aid in Laboratory Identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 25, No. 11, pag. 2126.
6. Cazes, J. 2004. Encyclopedia of Chromatography. USA. Marcel Dekker Inc.
7. David, F., Tienpont, B. y Sandra P. 2008. Chemotaxonomy of Bacteria by Comprehensive GC and CG/EM in electron impact and chemical ionization Mode. *Journal of Separation Science*. Volume 31, issue 19, pp 3395-3403.
8. Eeerola, E. y Lehtonen, O. 1988. Optimal Data Processing Procedure for Automatic Bacterial Identification by Gas-Liquid Chromatography of Cellular Fatty Acids. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 26, No. 9, pag. 1745.
9. Floyd, M. 1992. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by Using High-Performance Liquid Chromatography of Mycolic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 30, No. 5, pag. 1327.
10. Fox, A. 1993. Determination of Carbohydrate Profiles of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* Including Identification of O-Methyl Methylpentoses by Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 31, No. 4, pag. 887.

11. Huys, G., Kesters, L., Vancanneyt, M, Coopman, R., Janssen, P y Kesters, K. 2008. Diversity of *Aeromonas* sp. In Flemish Drinking Water Production Plants as Determined by Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Cellular Fatty Acid Methyl Esters (FAMES). *Journal of Applied Microbiology*. Volume 78, issue 4, pp 445-455.
12. Jennings, W.Mittlefehldt, E., Stremple, P.1996. Analytical Gas Chromatography. 2nd. Ed. USA.
13. Kitson, F., Larsen,B. y McEwen, C. 1996. Gas Chromatography and Mass Spectrometry A practical guide. 1st. ed. USA, Academic Press.
14. Kunitsky, C., Osterhout, G. y Sasser, M . 2006. *Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the Midi Sherlock microbial identification system* in Encyclopedia of rapid microbiological methods. USA. Vol 3, pp 1-56.
15. Lévy-Frébault, V. 1986. Mycolic Acid Analysis for Clinical Identification of *Mycobacterium avium* and Related Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 24, No. 5, pag. 835.
16. Maliwan, N. 1988. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* Cultures by Gas-Liquid Chromatography and a Computer-Aided Pattern Recognition Model. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 26, No. 2, pag. 182.
17. Murray. P. 1995. Manual of Clinical Microbiology. 6th Ed. USA. American Society of Microbiology Press.
18. Piñeiro-Vidal, M., Pazos, F. y Santos, Y. 2008. Fatty Acid Analysis as a Chemotaxonomic Tool for Taxonomic and Epidemiological Characterization of Four Fish Pathogenic *Tenacibaculum* species. *Letters in Applied Microbiology*. Volume 46, issue 5, pp 548-554.
19. Pritchard, D. 1981. Carbohydrate Fingerprints of Streptococcal Cells. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 13, No. 1, pag. 89.
20. Sasser, M. 1990. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acids methyl esters (GC-FAME). MIDI Technical note # 101, last revised july 2006.
21. Skoog, D. 1992. Principios de Análisis Instrumental. 5ta. Ed. España. MCGraw Hill.
22. Silverstein, R., Webster, F. y Kiemle, D. 2005. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th Ed. USA.

23. Stenerson, K. 2004. Fast GC analysis of bacterial acid methyl esters (BAMEs) on Equity-1 columns. *The Reporter*. Vol 22.2.
24. Termonia, M., Wybau, M., Bronckart, J. y Jacobs H. 1989. Automatic Identification of Microorganisms by CGC Analysis of Cellular Fatty Acids. *Journal of High Resolution Chromatography*. Volume 12, issue 10, pp 685-688.
25. Thompson, I. 1993. Subgrouping of Bacterial Populations by Cellular Fatty Acid Composition. *FEMS Microbiology Letters*. Volume 102, issue 2, pp 75-84.
26. Wayne, C., Lambert, M. y Merwin, W. 1974. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *Applied Microbiology*. Vol. 28, No. 1, pp 80-85.
27. Vannieuwenhuyze, F. 1987. Selectivity Optimization for the Capillary Gas Chromatographic Analysis of Bacterial Cellular Fatty Acids. *Chromatographia*. Vol. 23, No. 11.

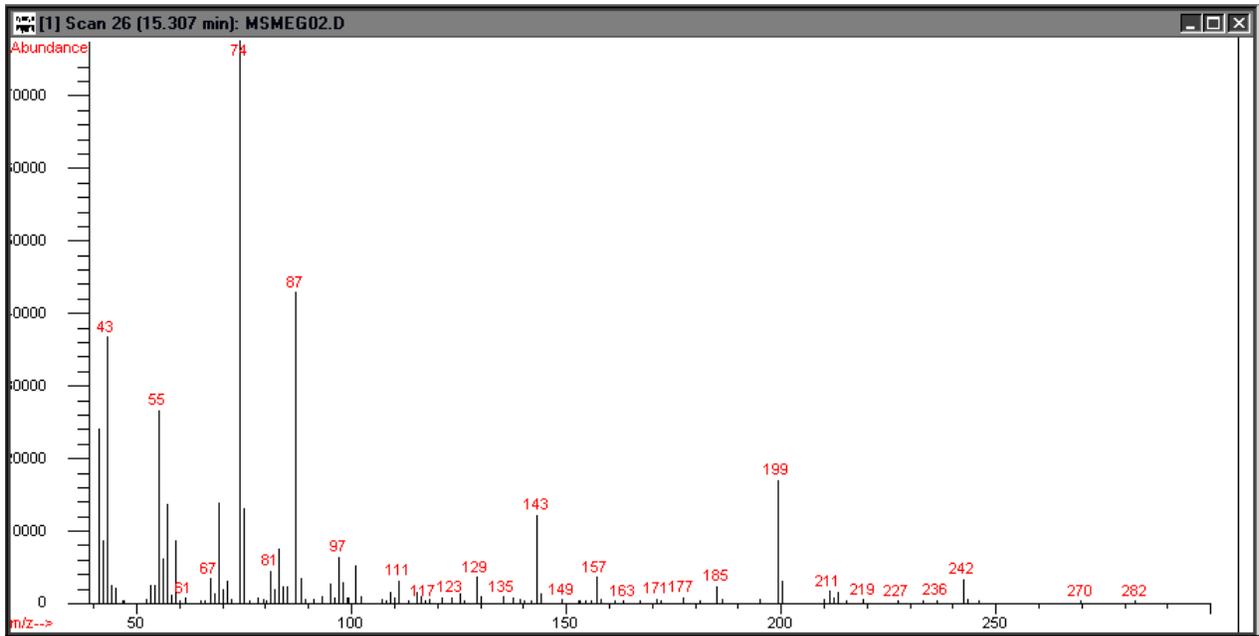
XIII. ANEXOS

A. Lista de acrónimos

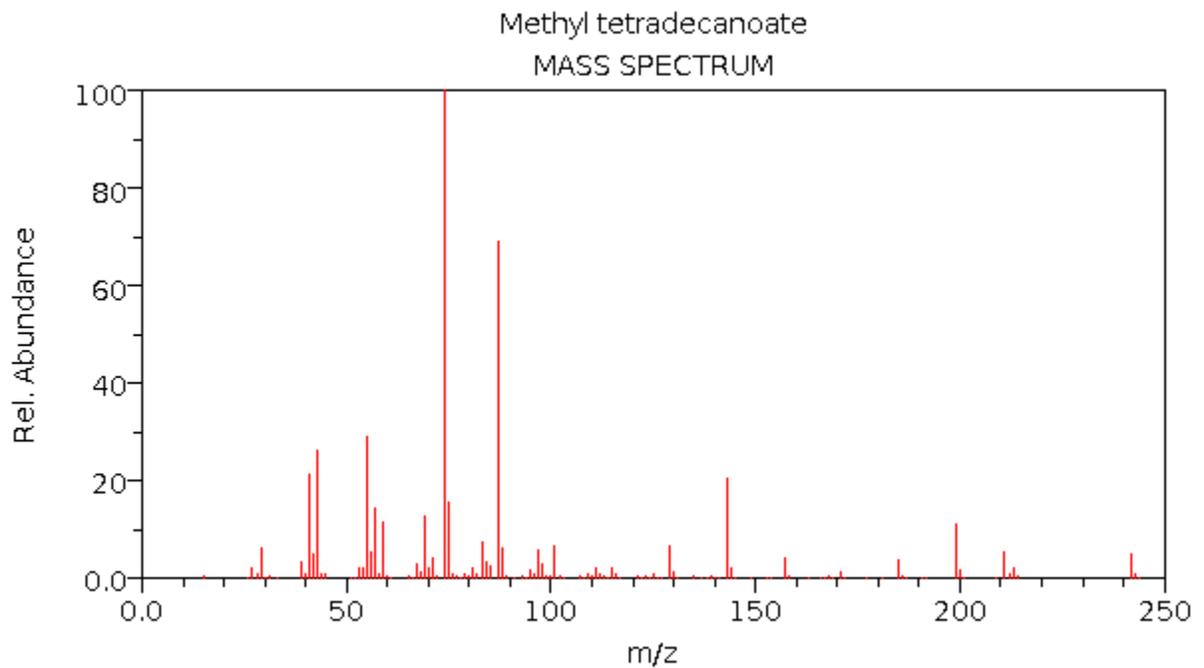
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipos Celulares)
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
PCBs	Bifenilos policlorinados (PCBs por sus siglas en inglés)

B. Espectros de masas de compuestos seleccionados

Gráfica 6. Espectro de masas del pico No. 1

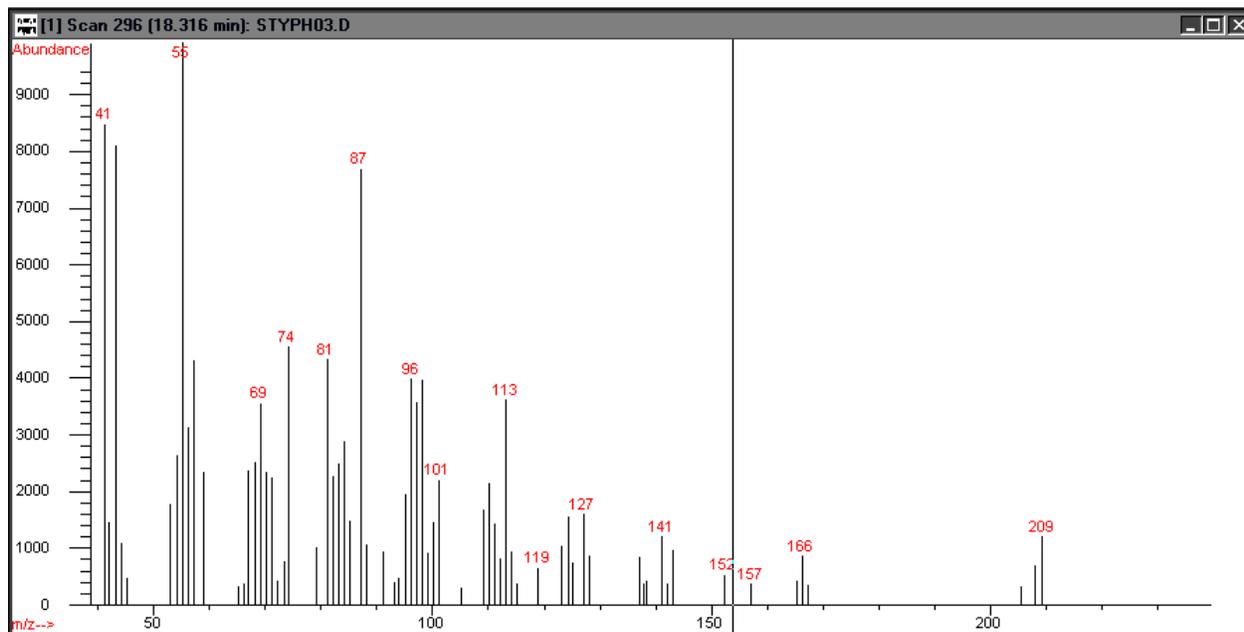


Gráfica 7. Espectro de masas del n-tetradecanoato de metilo

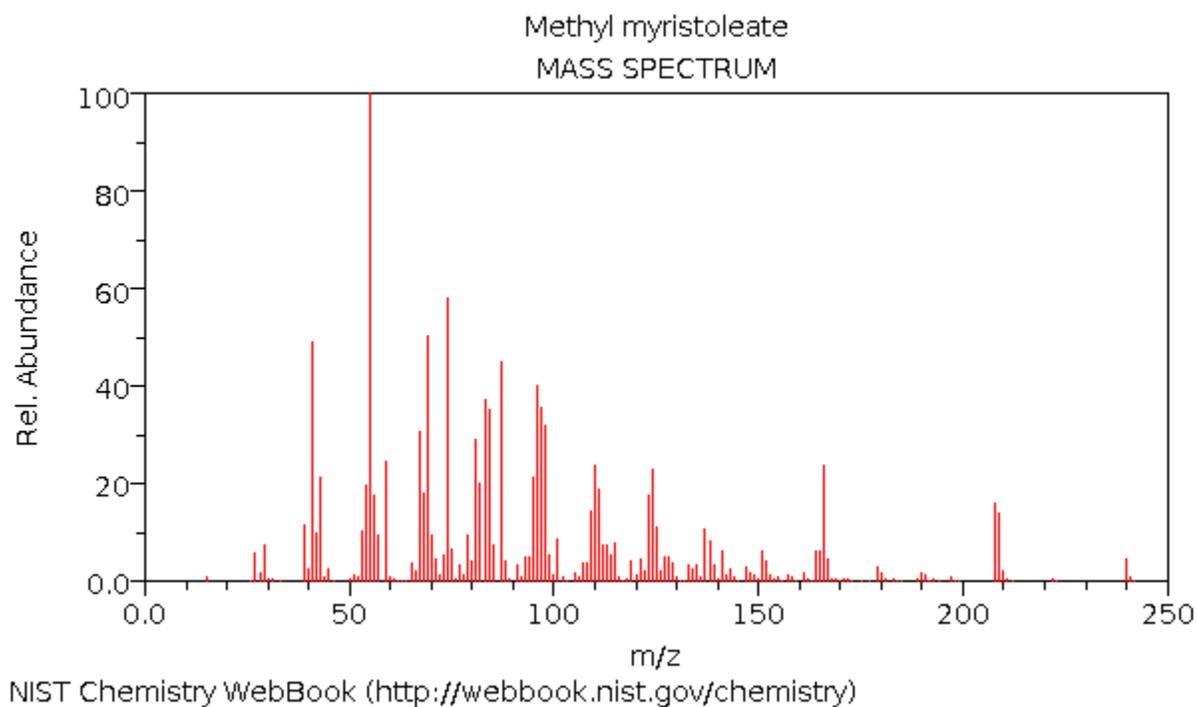


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

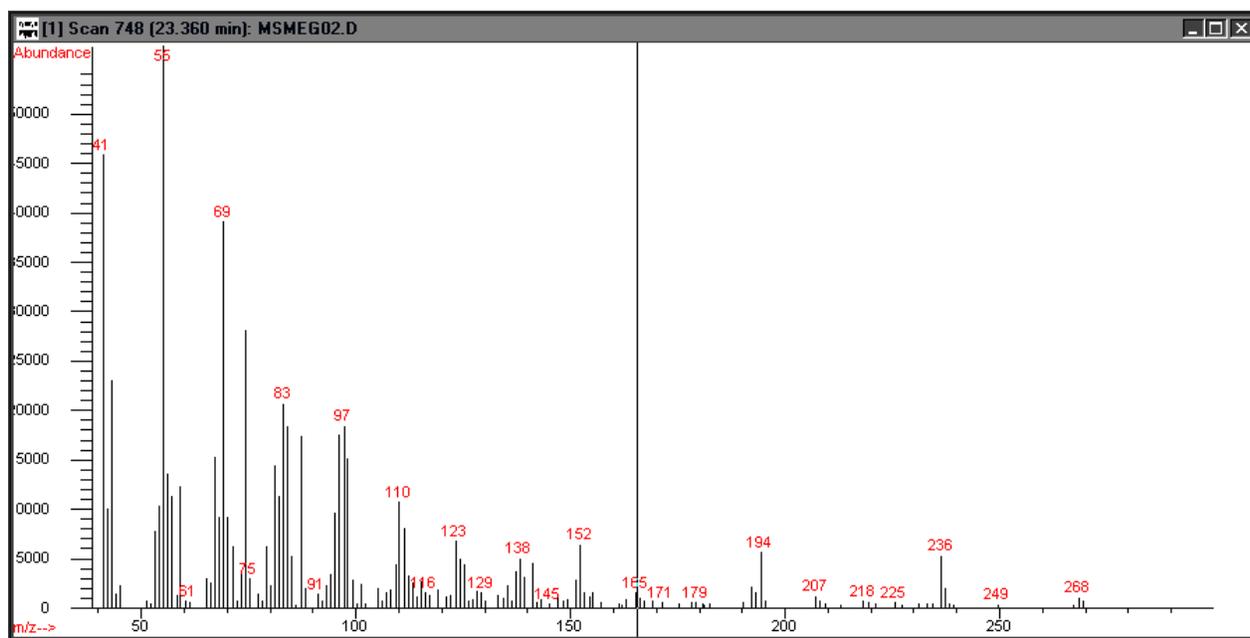
Gráfica 8. Espectro de masas del pico No. 3



Gráfica 9. Espectro de masas del 9-Z-tetradecenoato de metilo

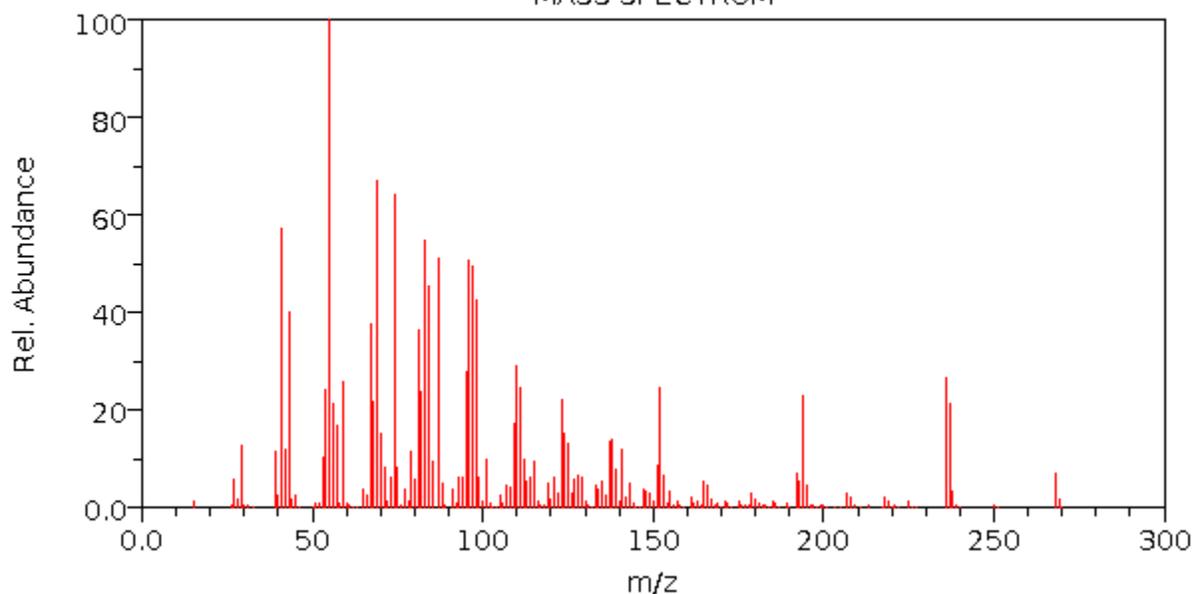


Gráfica 10. Espectro de masas del pico No. 13



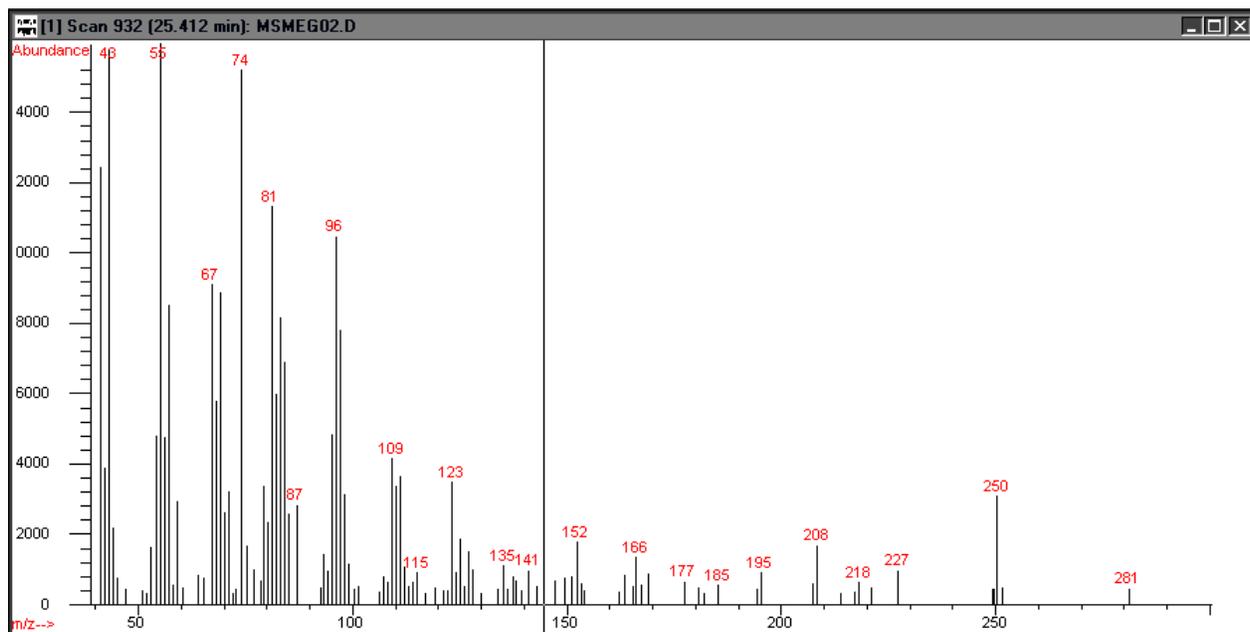
Gráfica 11. Espectro de masas del 9-Z-hexadecenoato de metilo

9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
MASS SPECTRUM

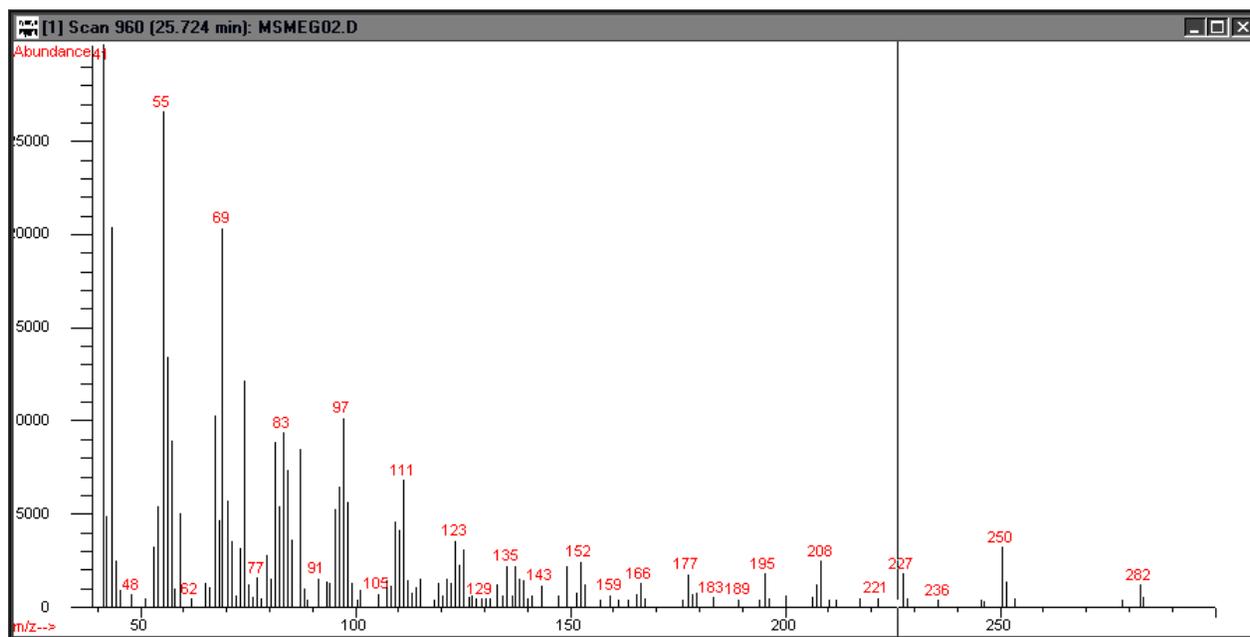


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

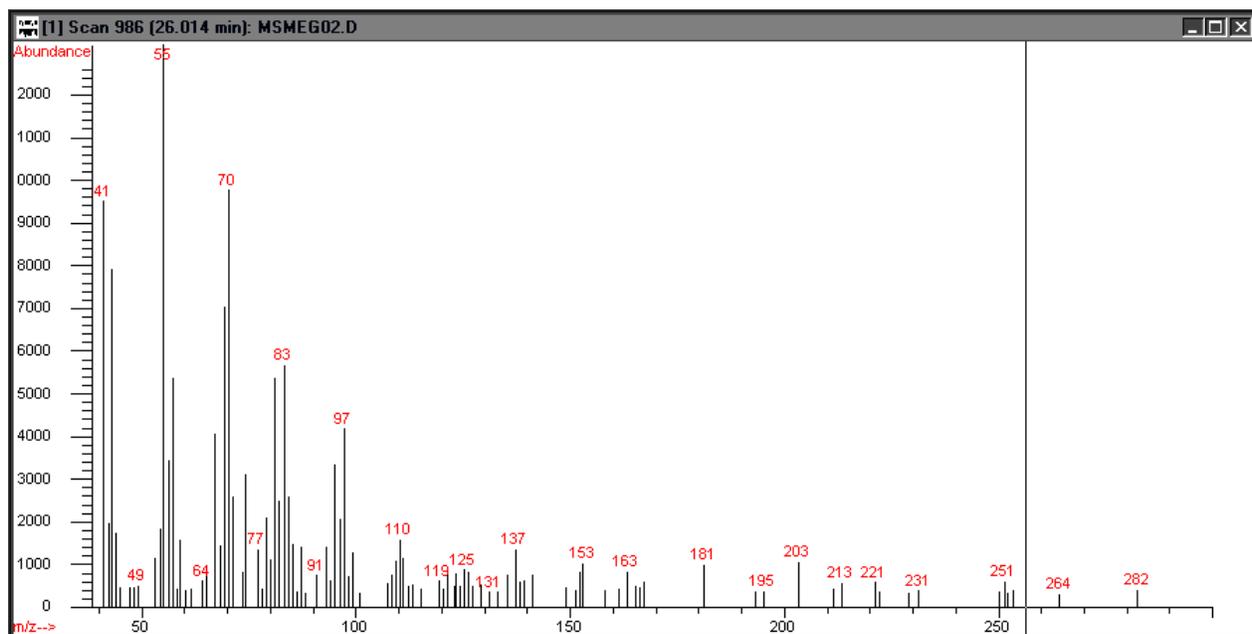
Gráfica 12. Espectro de masas del pico No. 15



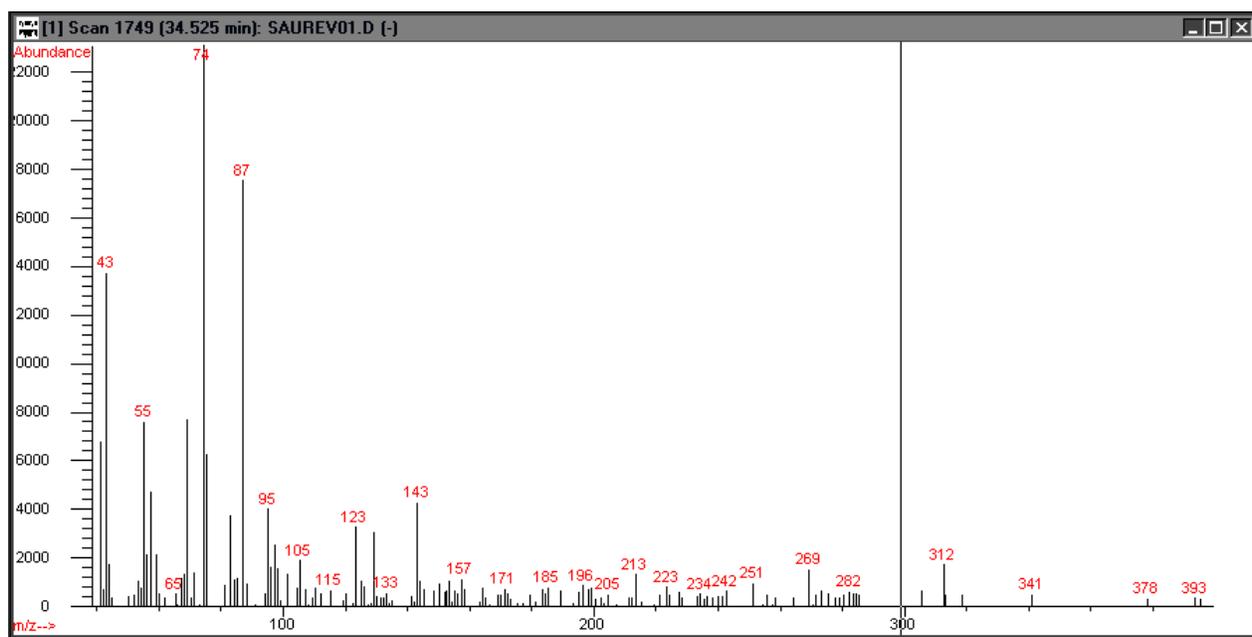
Gráfica 13. Espectro de masas del pico No. 16



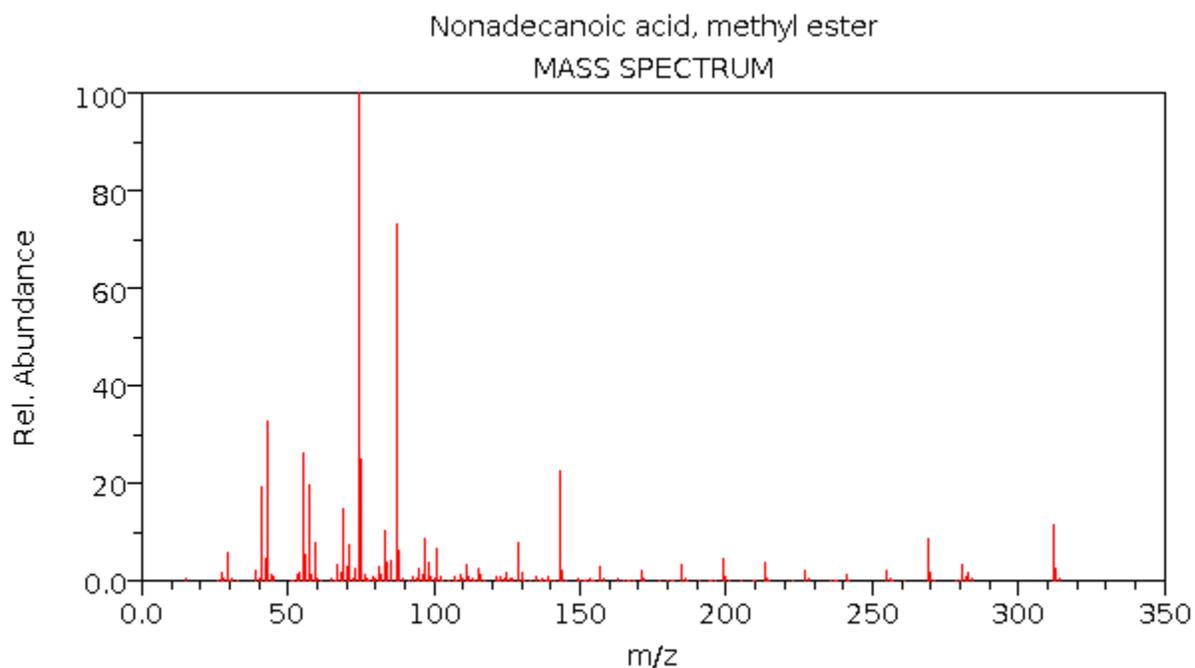
Gráfica 14. Espectro de masas del pico No. 17



Gráfica 15. Espectro de masas del pico No. 26

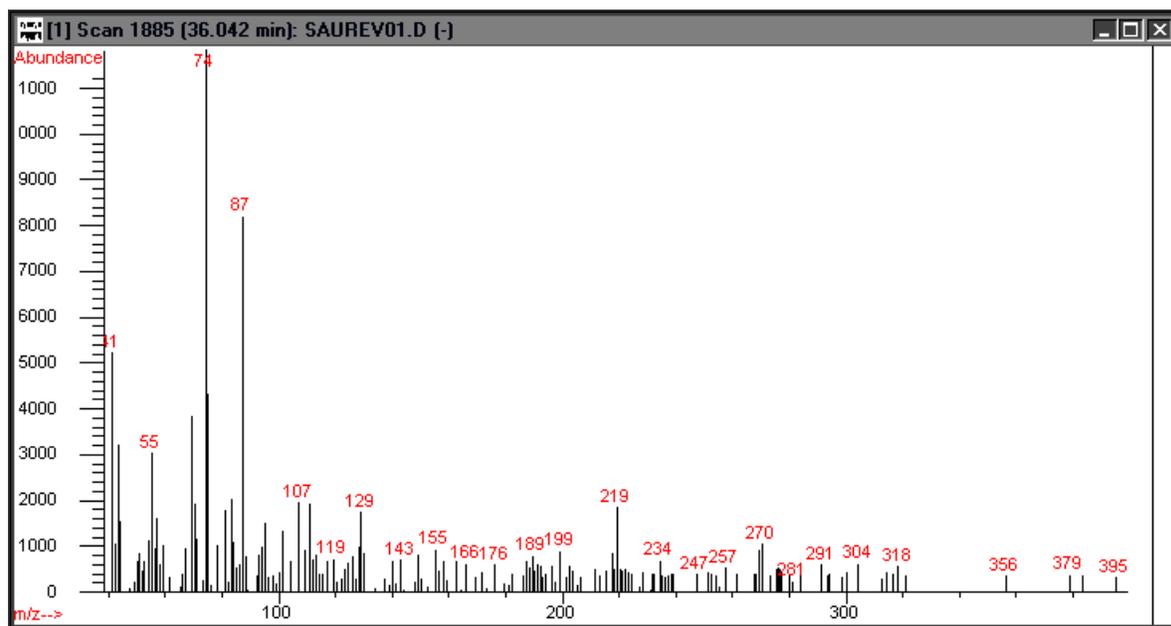


Gráfica 16. Espectro de masas del n-nonadecanoato de metilo

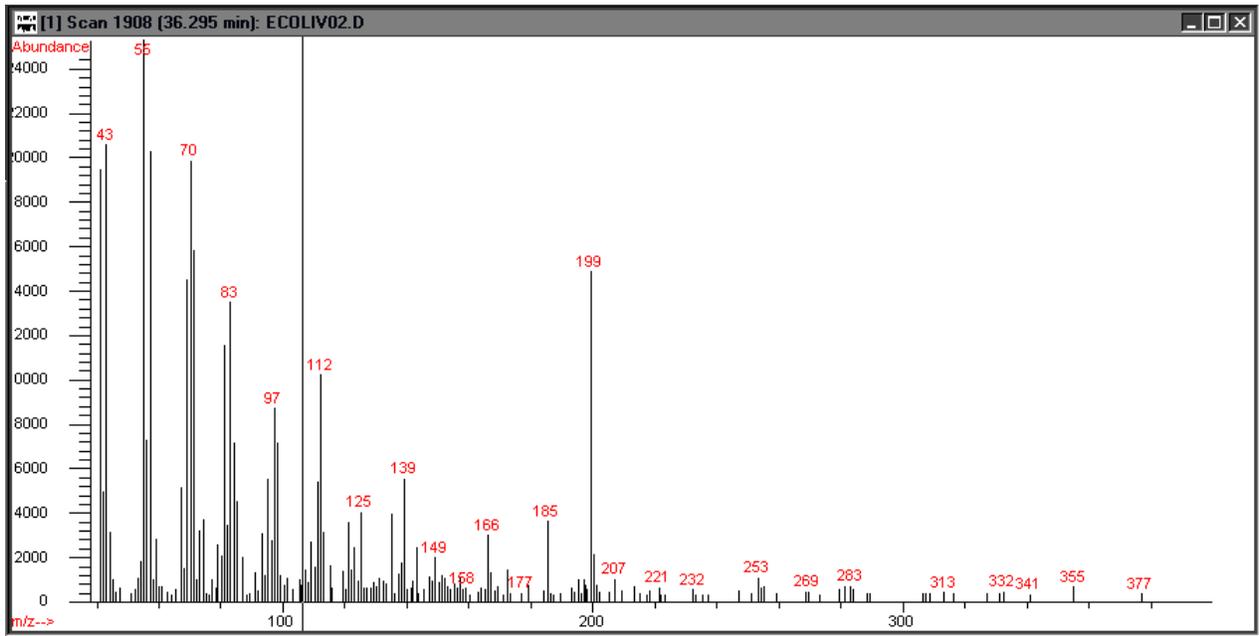


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

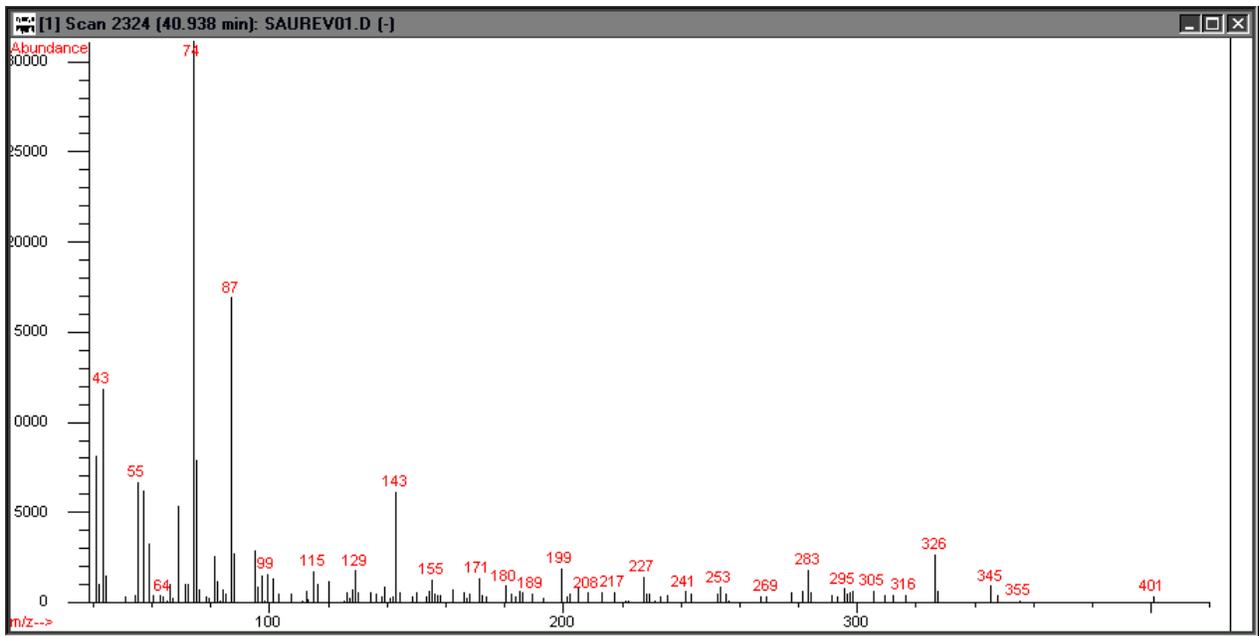
Gráfica 17. Espectro de masas del pico No. 29



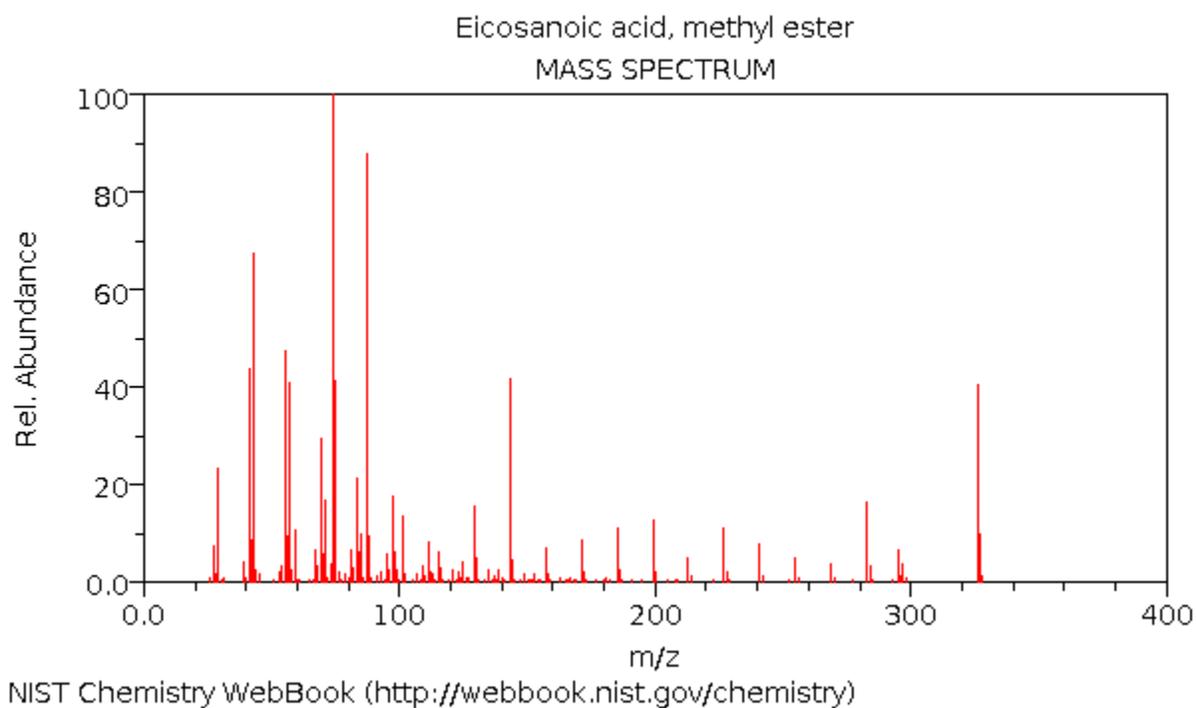
Gráfica 18. Espectro de masas del pico No. 30



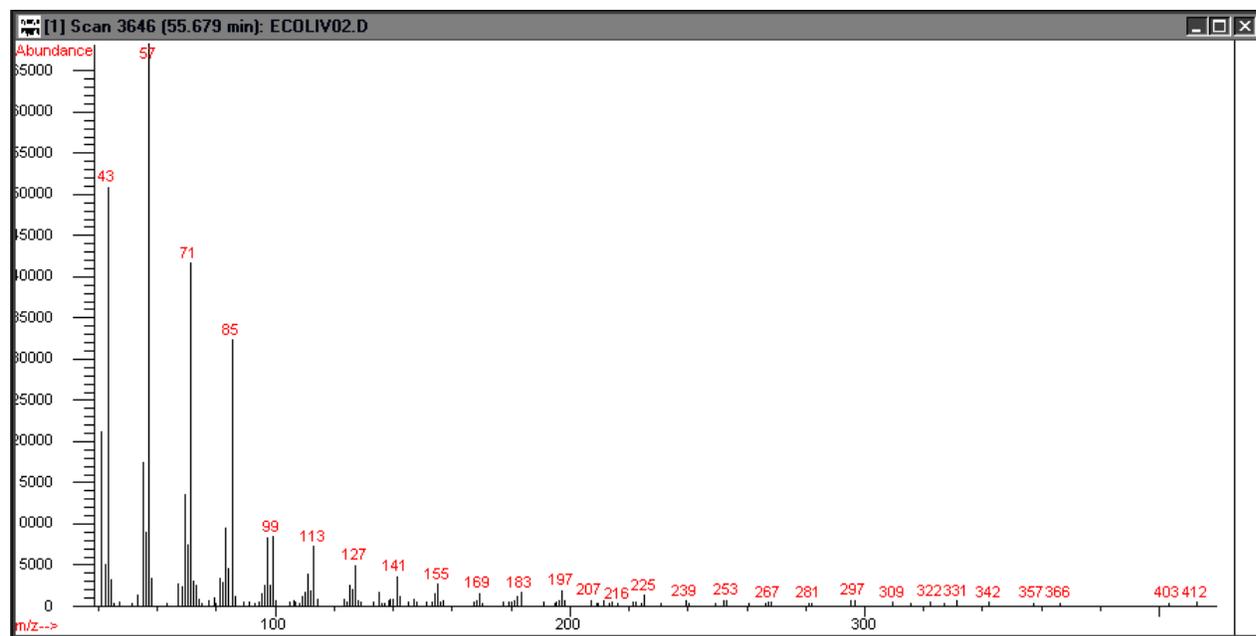
Gráfica 19. Espectro de masas del pico No. 33



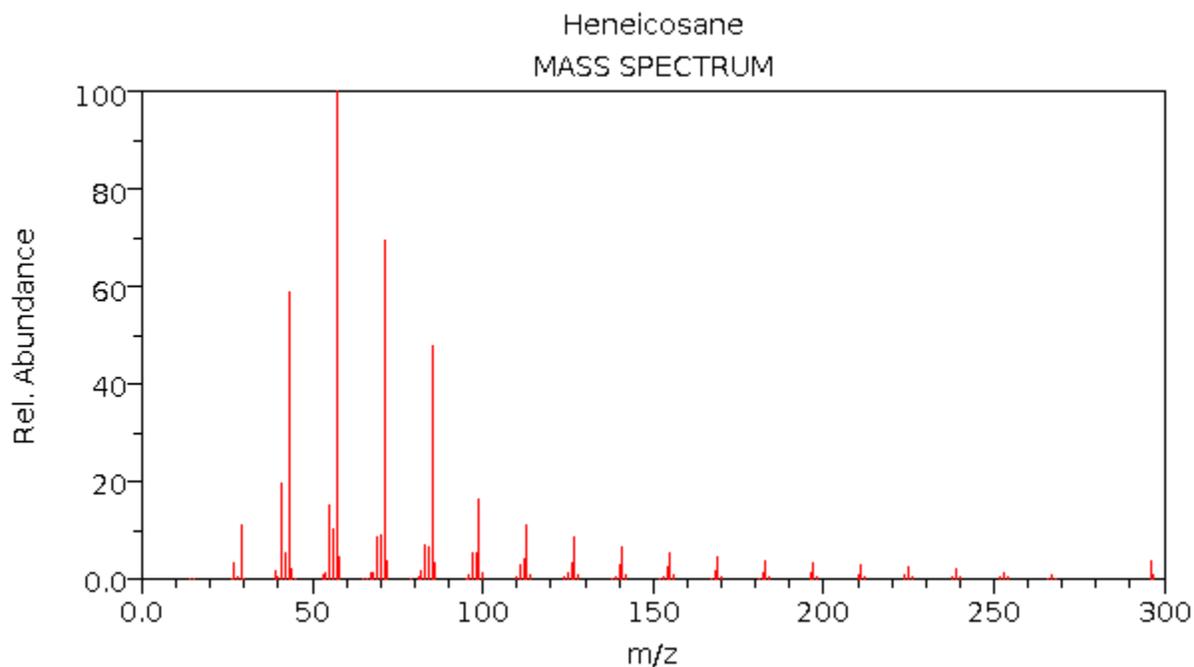
Gráfica 20. Espectro de masas del n-icosanato de metilo



Gráfica 21. Espectro de masas del pico No. 41

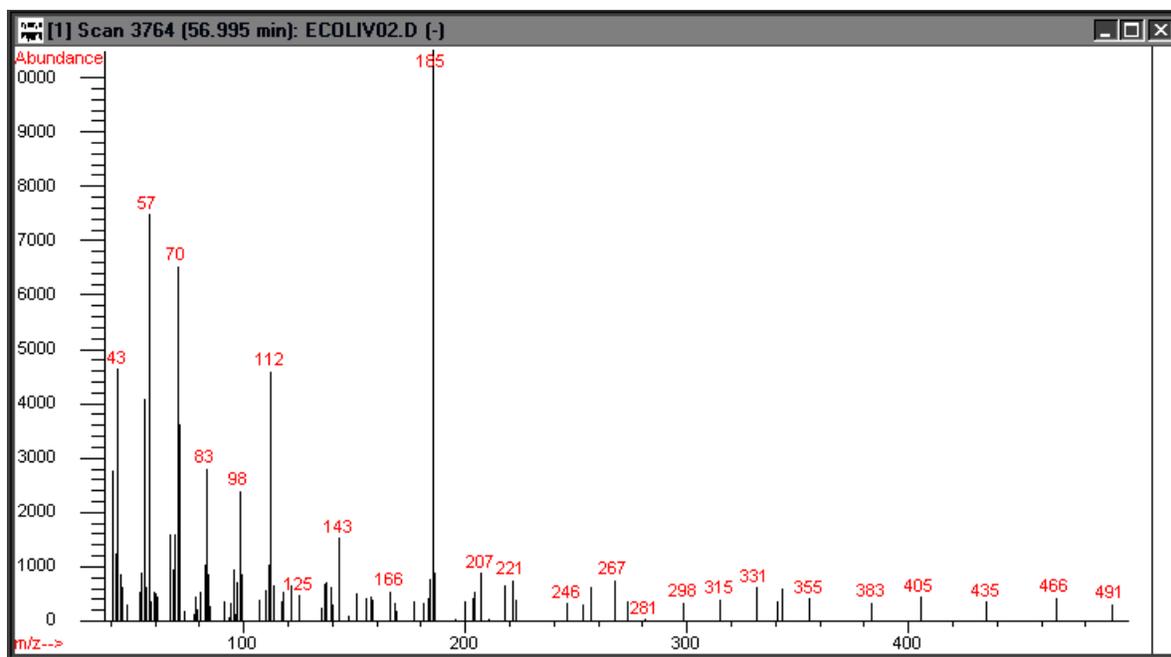


Gráfica 22. Espectro de masas del n-heneicosano

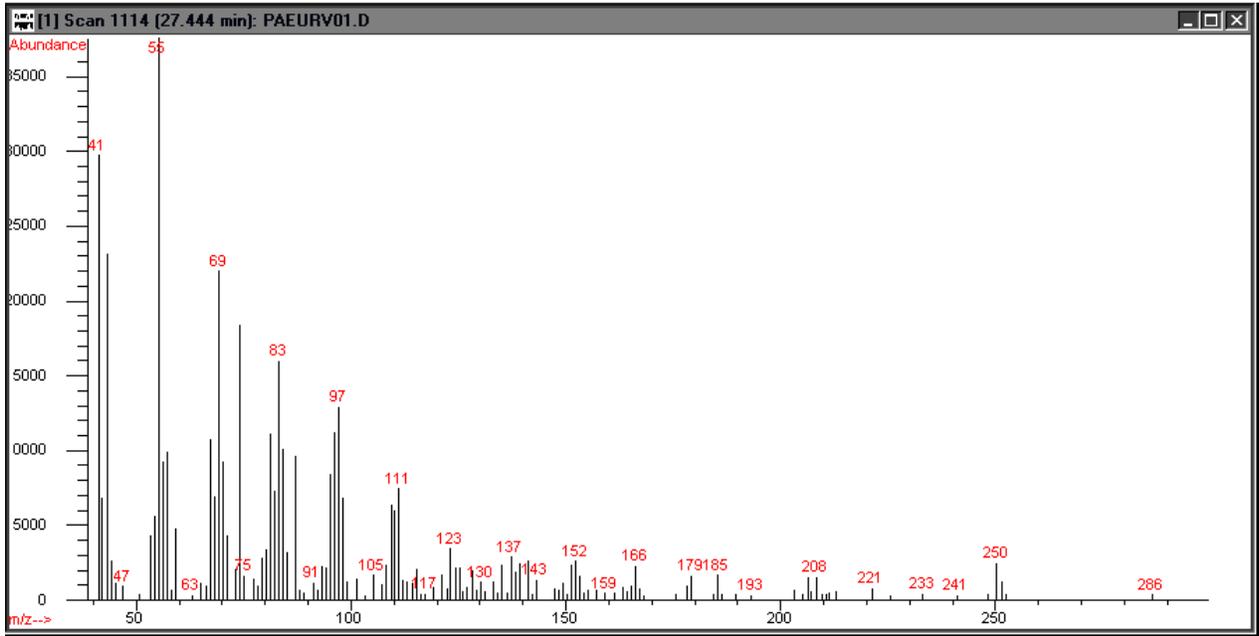


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Gráfica 23. Espectro de masas del pico No. 42



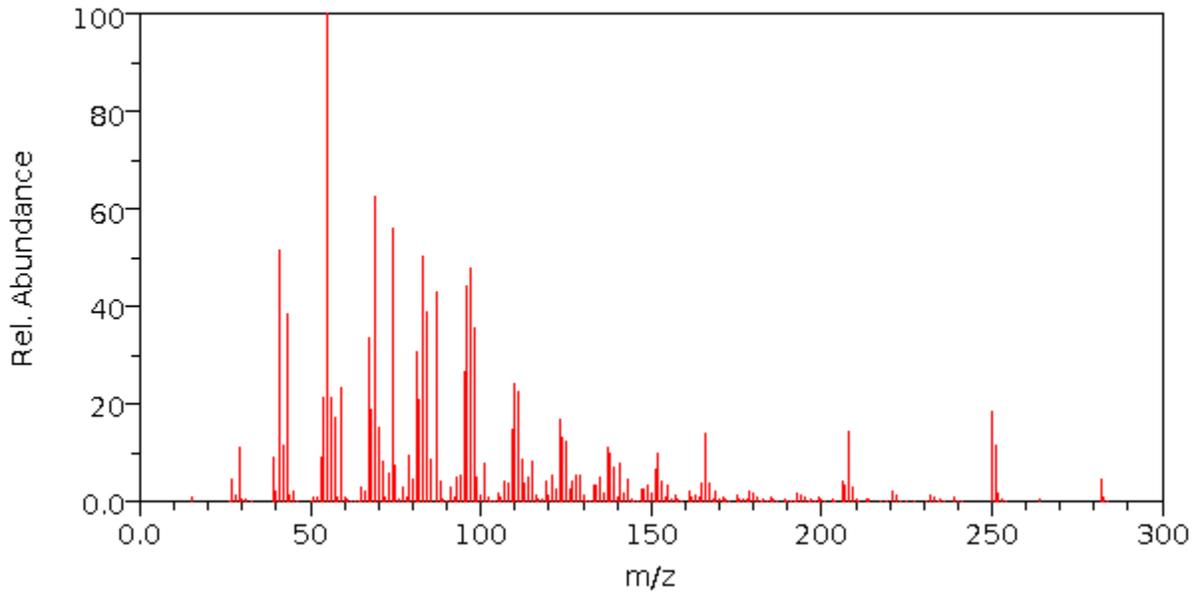
Gráfica 24. Espectro de masas del pico No. 20



Gráfica 25. Espectro de masas del 10-Z-heptadecenoato de metilo

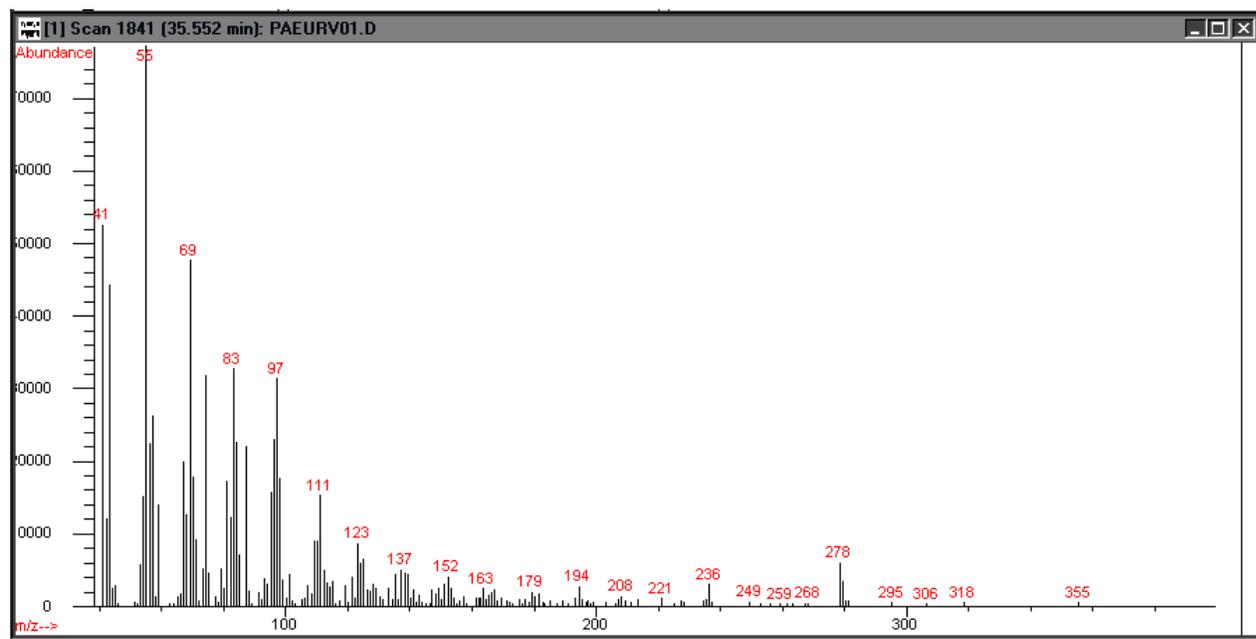
cis-10-Heptadecenoic acid, methyl ester

MASS SPECTRUM



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

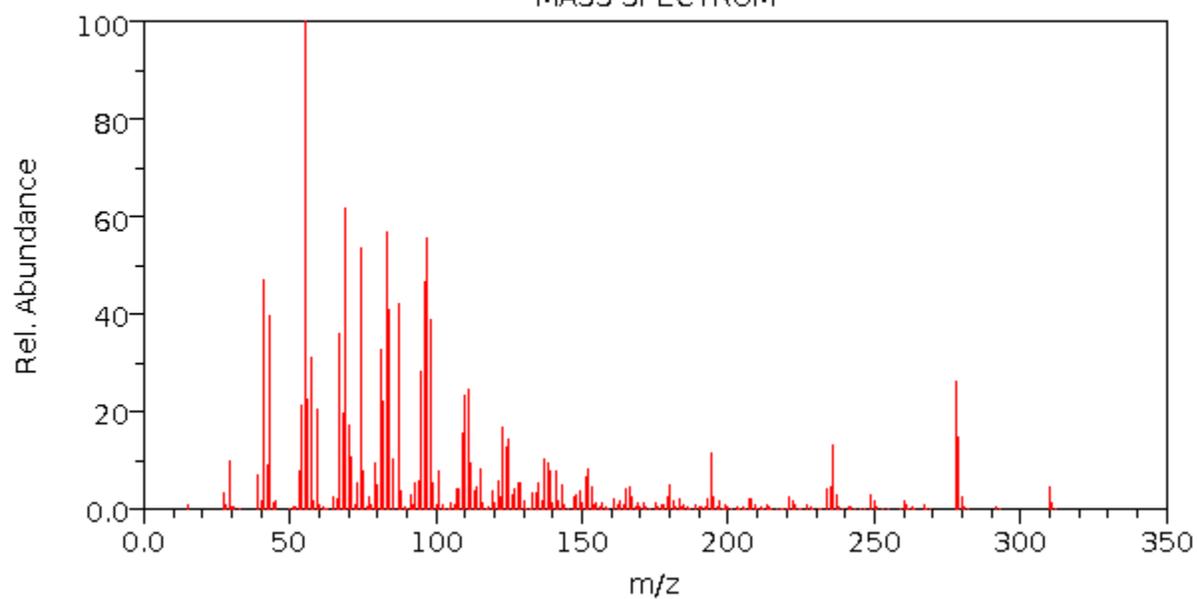
Gráfica 26. Espectro de masas del pico No. 28



Gráfica 27. Espectro de masas del 10-Z-nonadecenoato de metilo

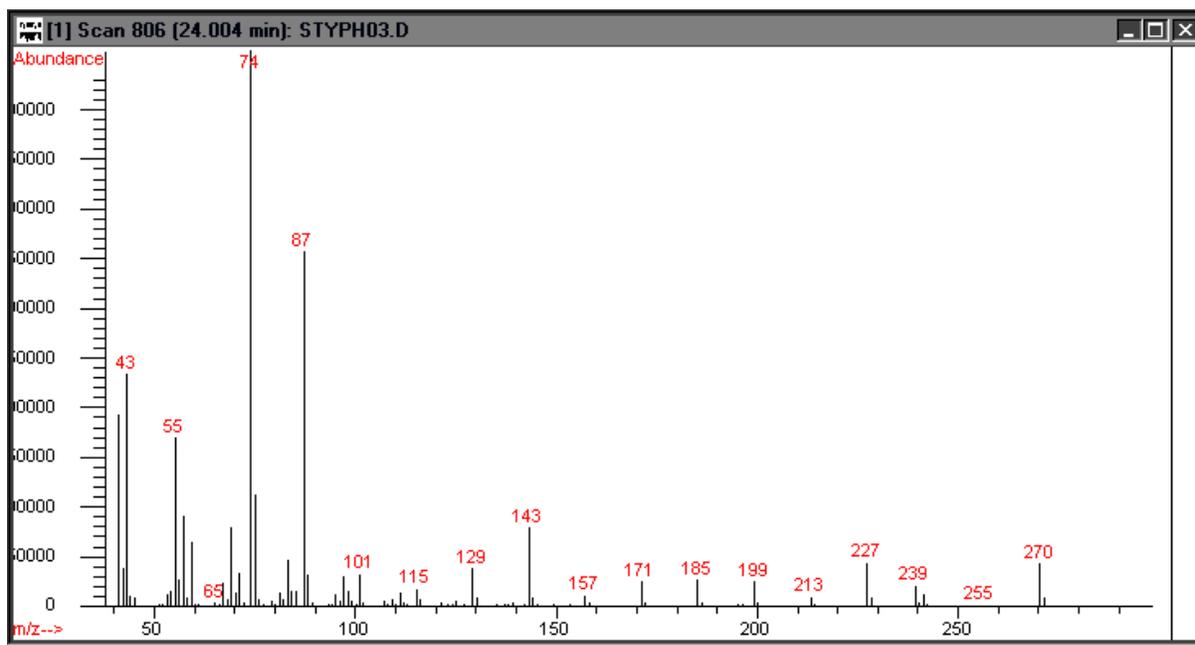
cis-10-Nonadecenoic acid, methyl ester

MASS SPECTRUM

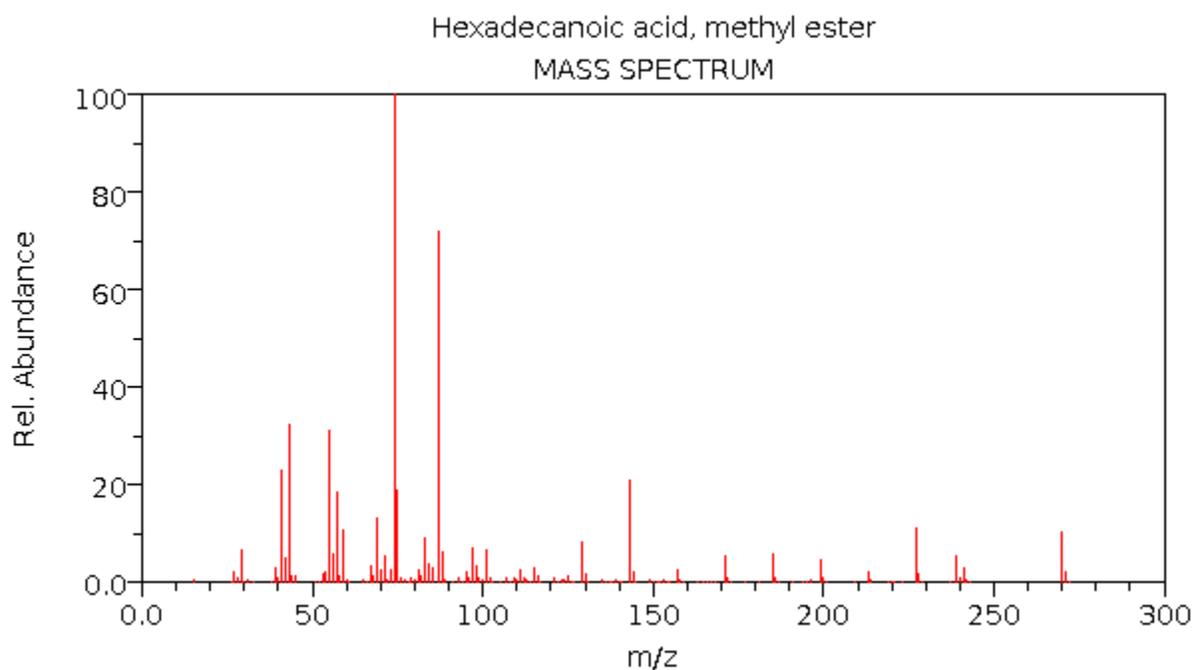


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Gráfica 28. Espectro de masas del pico No. 14

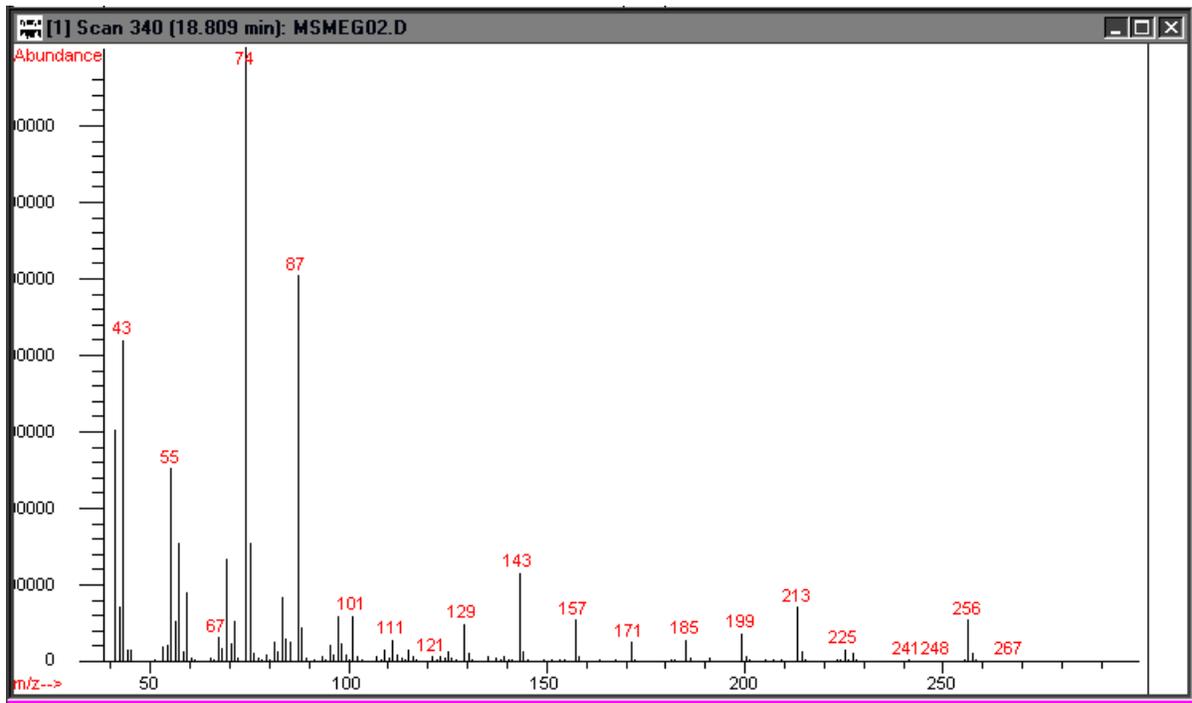


Gráfica 29. Espectro de masas del n-hexadecanoato de metilo

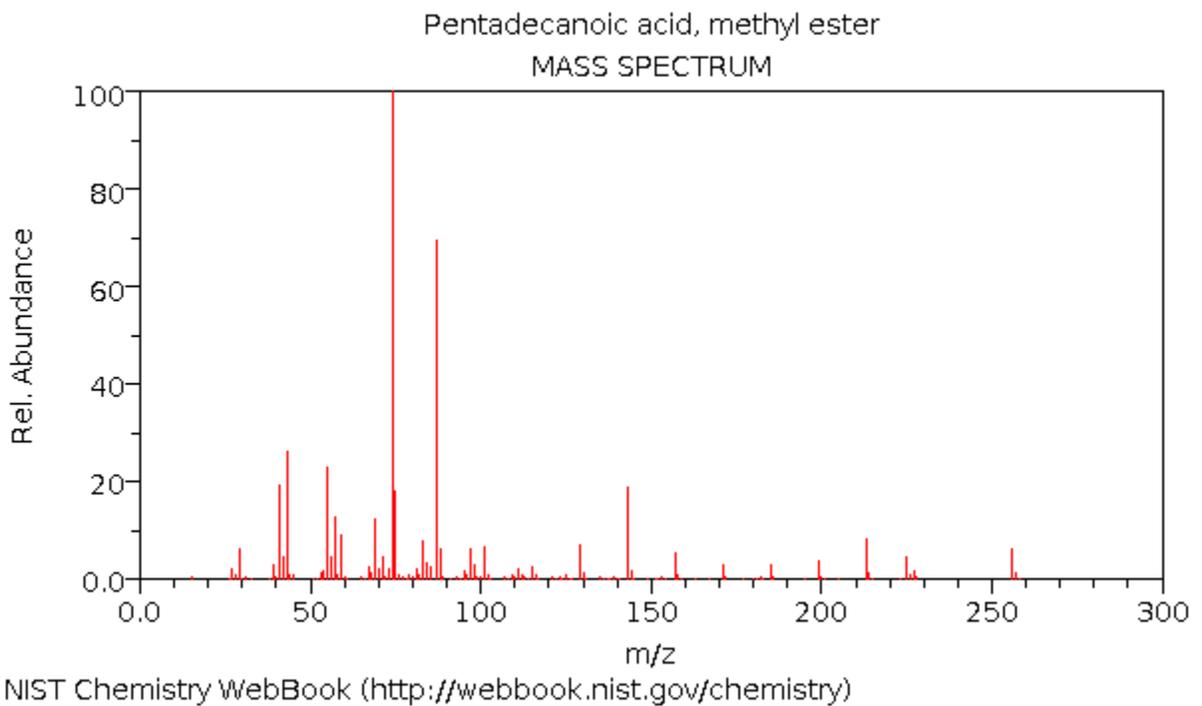


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

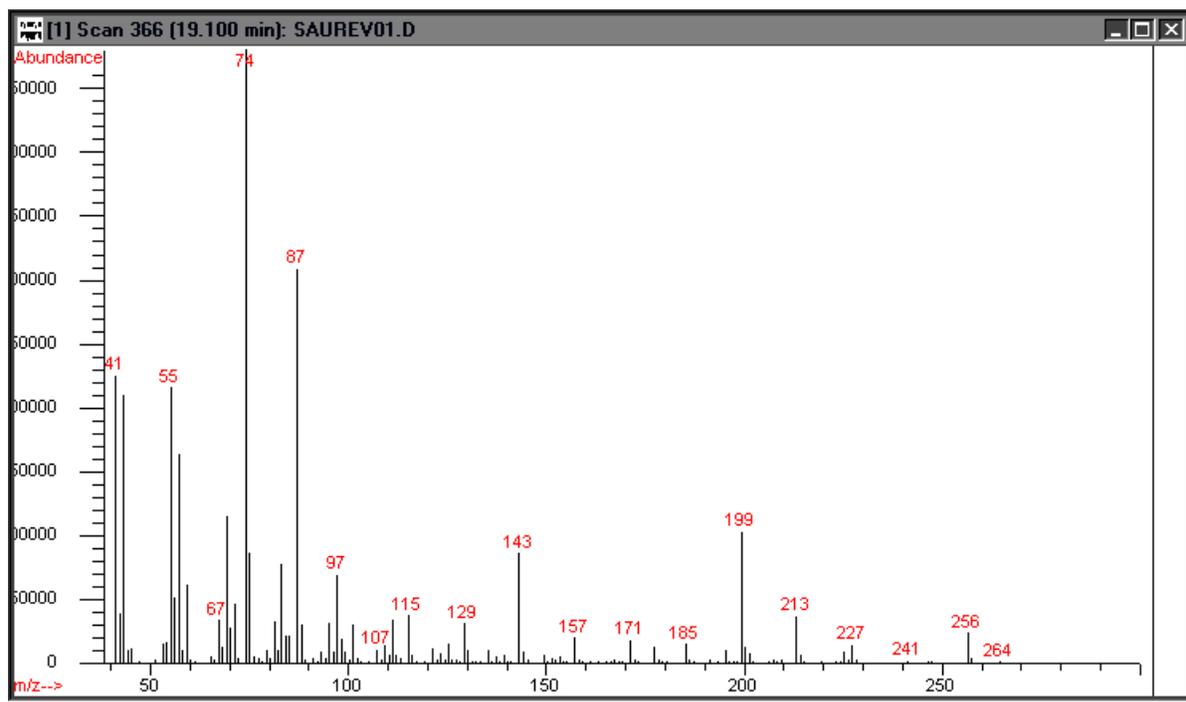
Gráfica 30. Espectro de masas del pico No. 4



Gráfica 31. Espectro de masas del n-pentadecanoato de metilo



Gráfica 32. Espectro de masas del pico No. 5



C. Fotografías

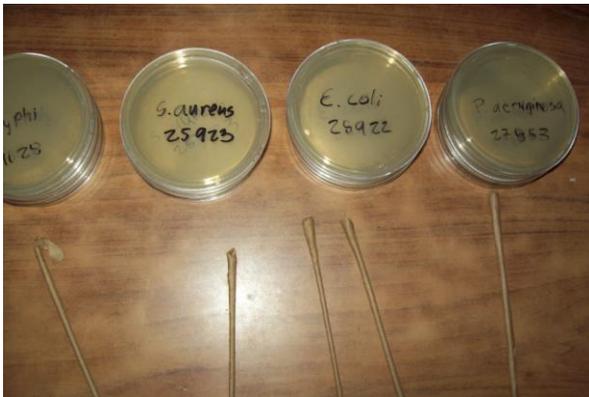
Fotografía 1. Vaciado de medio de cultivo sólido



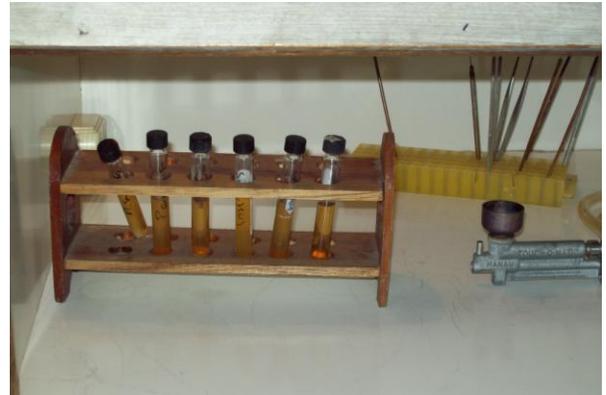
Fotografía 2. Enfriamiento de medio de cultivo



Fotografía 3. identificación de cajas de Petri



Fotografía 4. Cepas cultivadas en medio líquido



Fotografía 5. Toma de cepas para siembra



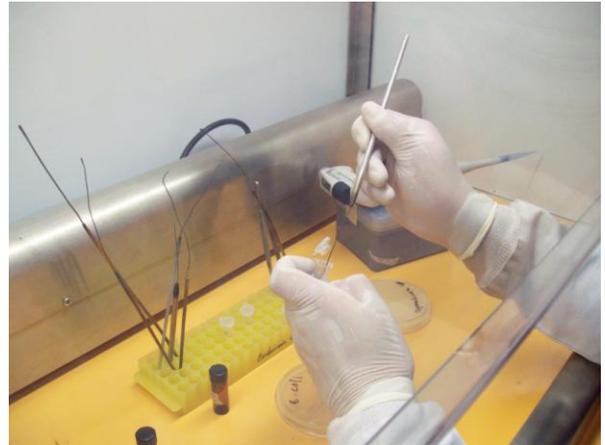
Fotografía 6. Siembra de medios de cultivo sólido



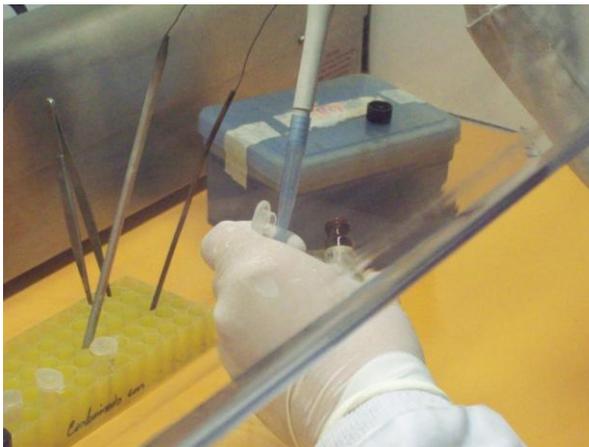
Fotografía 7. Incubación de cepas



Fotografía 10. Adición de masa bacteriana



Fotografía 8. Adición de metóxido de sodio en metanol



Fotografía 11. Agitación para completar la transesterificación



Fotografía 9. Toma de masa bacteriana



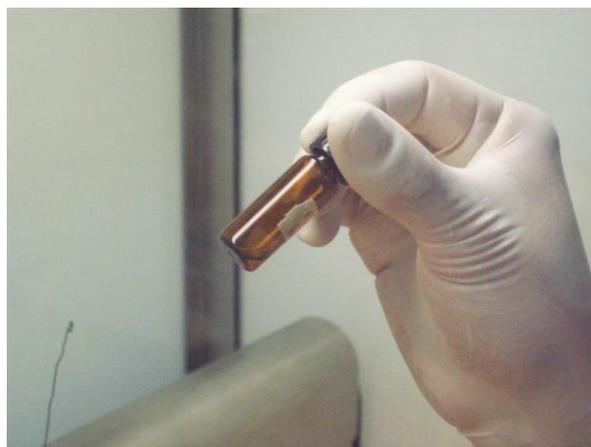
Fotografía 12. Adición de hexano para extracción



Fotografía 13. Centrifugación



Fotografía 16. Fase hexánica identificada



Fotografía 14. Separación de fases



Fotografía 17. Equipo de CG/EM



Fotografía 15. Toma de fase hexánica



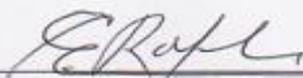
Fotografía 18. Inyección de fase hexánica





Tamara Zunil Claudio Méndez

Autor



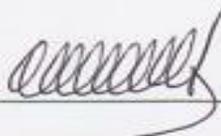
Lic. Eduardo Robles Aguirre

Coordinador



Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Director



Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto

Decano