

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ANTIMICROBIANA DE DOS POLÍMEROS (LISOZIMA-PREGNENOLONA)

**L. Figueroa Valverde¹, F. Díaz Cedillo², A. Camacho Luis³, G. Maldonado Velázquez¹,
M. López Ramos¹, E. García Cervera¹, P. Garma Quen¹, P. Ku Pech¹**

1) Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar s/n, Col Buenavista C.P. 24030 Campeche Campeche, México. Correo electrónico: lauro_1999@yahoo.com

2) Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis s/n, Col. Santo Tomás, México, D.F., C.P. 11340.

3) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Farmacia, Abasolo No. 600 Colonia centro, Pachuca Hgo C.P. 42000.

Enviado: Diciembre de 2006; Aceptado: Mayo 2007

RESUMEN

En este trabajo, fueron sintetizados dos polímeros de pregnenolona, la ruta incluye; a) preparación del polímero *lisozima-hemisuccinato-pregnenolona* (HP-L) usando el hemisuccinato de *pregnenolona* (5-Pregnen-20-one, 3-(3-carboxi-1-oxopropoxi) en presencia de *1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide* para la formación de un grupo *amida* entre la *lisozima* y el derivado de *pregnenolona*; b) síntesis del polímero *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* (HPE-L), acoplando *etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* (*N*-(2-amino-etil)-succinamic acid 17-acetil-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradeca-hidro-1H-ciclo-penta[á]fenantren-3-yl-ester) a la *lisozima*. Para evaluar la actividad antimicrobiana que inducen los polímeros *lisozima-pregnenolona* fueron usadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Los resultados obtenidos por técnicas espectroscópicas mostraron que existen 11 residuos de *hemisuccinato-pregnenolona* por molécula del complejo macromolecular HP-L. Además, fueron encontrados 9 residuos del conjugado *etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* por molécula del polímero HPE-L. Otros resultados, indican que los polímeros HPE-L y HP-L pueden inducir efectos antibacteriales sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en comparación con la *lisozima* libre. En conclusión, los resultados muestran que modificaciones de la estructura química de la *lisozima* por acoplar el esteroide a la proteína le confiere actividad antibacteriana.

Palabras clave. Polímero, *lisozima*, *pregnenolona*

ABSTRACT

In this work were synthesized two polymers of *pregnenolone*, the route involved; a) preparation of *lisozime-hemisuccinate-pregnenolone* polymer (HP-L) using the

pregnenolone-hemisuccinate (5-Pregnen-20-one, 3-(3-carboxi-1-oxopropoxi) in presence of *1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide* for the formation of *amide* group between the *lisozime* and *pregnenolone-derivate*; b) synthesis of *lisozime-ethylenediamine-hemisuccinate-pregnenolone* polymer (HPE-L), coupling *ethylene-diamine-hemisuccinate-pregnenolone (N-(2-amino-etil)-succinamic acid 17-acetil-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12, 13,14,15,16, 17-tetradeca-hidro-1H-ciclo-penta[á]fenantren-3-yl-ester)* to *lisozime*. For evaluate the anti-microbial activity that induce the polymers *lisozime-pregnenolone* were used *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) strains. The results obtained by spectroscopic techniques shown that exist 11 rest of *pregnenolone-hemisuccinate* by molecule of HP-L macromolecular complex. In addition, were found 9 rest of *ethylenediamine-hemisuccinate-pregnenolone* conjugate by molecule of HPE-L polymer. Other results indicate that HPE-L and HP-L polymers can induce antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* in comparison with free *lisozime*. In conclusion, the results shown that modifications in chemical structure of *lisozime* by couple the steroid to protein it confer bacterial activity.

Keywords. Polymer, *lisozime*, *pregnenolone*.

INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas ha surgido el interés en el área de biomedicina con la finalidad de crear nuevos fármacos para diversas patologías clínicas [1,3]. En este sentido, la química medicinal tradicional ha sido complementada con la química combinatoria teniendo como objetivo principal el desarrollo de nuevos fármacos [4,11], es importante mencionar que la química combinatoria es una tecnología que envuelve la síntesis química de librerías de diversos compuestos [12,15] y que además estos pueden ser acoplados a varios polímeros [16-18]. En este sentido, existen datos donde se muestra que varios esteroides han sido conjugados a polímeros [19] para evaluar diferentes actividades biológicas y aplicaciones biomédicas, por ejemplo la preparación y caracterización de esteroides ligados a albúmina reportados por diversos investigadores con el propósito de probar su habilidad para estimular la formación de anticuerpos policlonales [20-23]. Sin embargo, recientemente ha surgido un gran interés sobre polímeros esteroidales con fines terapéuticos para enfermedades infecciosas, en este sentido, se han desarrollado diversos conjugados esteroidales (esteroides-peptidos-cationicos, EPC) para mimetizar el comportamiento antibacterial de algunos péptidos endógenos con actividad antibacterial [24,25]. Junto a esto, otros estudios publicados

por Ding y colaboradores [26] muestran la síntesis y caracterización antibacterial de polímeros EPC, sin embargo, existen pocos datos sobre el acoplamiento de esteroides a otro tipo de proteínas, ejemplo de esto es la síntesis del conjugado estrona-lisozima por medio de una reacción de acilación [27], aquí es importante señalar que existen reportes donde se indica que la lisozima tiene características antibióticas sobre algunos organismos patógenos [28]. Es así, que en este estudio nosotros acoplamos dos derivados de *pregnenolona* (previamente sintetizados) [29] a la lisozima. Es importante indicar que los derivados de *pregnenolona* tenían un brazo espaciador con una longitud de 6 (*hemisuccinato* de *pregnenolona*) y 9 átomos (*etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*) como identidad química. Además, cabe mencionar que el *hemisuccinato* de *pregnenolona* tenía como característica principal un grupo carboxilo libre que sirvió para acoplarlo a los grupos *amino* libres contenidos en la *lisozima*, por otro lado, el derivado esteroideal *etilendiamina-hemusuccinato-pregnenolona* tiene un grupo *amino* libre en su brazo espaciador que sirvió para su conjugación con los grupos carboxilos libres de la proteína. Por otro lado, en otros experimentos se evaluó el efecto antimicrobial de los polímeros sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* para determinar si modificaciones en la estructura química de la *lisozima* o la interacción *esteroide-proteína* inducen actividad antimicrobial sobre las cepas de estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. El punto de fusión fue determinado por un aparato denominado Electrothermal (modelo 900). Se realizaron análisis espectrofotométricos de ultravioleta (UV) en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552 a una longitud de onda de 200 a 300 nm en un aparato *Perkin Elmer* (Lambda 40). El análisis electroforético se realizó con el aparato VWR Scientific Products (modelo 500-2).

MÉTODOS

Acoplamiento del *hemisuccinato* de *pregnenolona* a la *lisozima*. La preparación del polímero se llevo a cabo usando un derivado de *carbodiimida* como catalizador como lo señala De Silva y colaboradores [30]. Una solución compuesta por 40 mg de *lisozima*, 100 mg (0,24 mmol) de *hemisuccinato* de *pregnenolona*, 70 mg (0,36 mmol) de *etil-3-(3-dimetil aminopropil)-carbodiimide* y acetonitrilo:agua (5:3 mL) se hicieron reaccionar a temperatura ambiente por 24 h con agitación constante. Después de los tiempos de reacción se evaporó el disolvente de la mezcla a presión reducida. Al producto de reacción se le agregó agua con la

finalidad de extraer la *lisozima* que no reacciona y seguidamente el precipitado formado fue lavado con cloroformo para extraer el esteroide no reaccionante.

Síntesis del polímero *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*. Se hicieron reaccionar 100 mg (0,18 mmol) de *etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*, 40 mg de *lisozima*, 42 mg (0,21 mmol) de *etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide* y acetonitrilo:agua (21:7 mL). La mezcla se dejó reaccionar por espacio de 24 h con agitación constante a temperatura ambiente y después de los tiempos de reacción se evaporó el disolvente de la mezcla a presión reducida. Al producto de reacción se le agregó agua con la finalidad de extraer la *lisozima* que no reacciona y seguidamente el precipitado formado fue lavado con cloroformo para extraer el esteroide no reaccionante.

Caracterización de los conjugados de *pregnenolona*. La determinación de *lisozima* libre y ligada a los derivados de *pregnenolona* fue determinada espectroscópicamente mediante las técnicas reportadas por Erlanger [19] y Yamirskaya [31], que se basan en el acoplamiento de derivados esteroidales a proteínas. Es importante mencionar que la determinación se realizó a una longitud de onda de 200 a 300 nm. Se tomó este intervalo porque existen trabajos que señalan que la *lisozima* presenta un coeficiente de extinción de 280 nm [32]. Sin embargo, la cuantificación del número de residuos esteroidales se desarrolló mediante el método reportado por Dorobanpu [33], que tiene como base el análisis espectrofotométrico de ultravioleta y que estima el número de residuos esteroidales ligados a proteínas mediante la siguiente fórmula:

$$N = \left(\frac{M_{LISOZIMA}}{M_D} \right) \left(\frac{C_1}{C_2} \right) \left(\frac{C_3 E_{LISOZIMA} - C_2 E_C}{C_1 C_C - C_3 E_D} \right)$$

donde N es el número de residuos de *pregnenolona* acoplados a la *lisozima*, C₁ (1 mg) la concentración del derivado esteroideal (HP y HPE), C₂ (1 mg) la concentración de la *lisozima*, C₃ (1 mg) la concentración de los polímeros *lisozima-pregnenolona*, M_{LISOZIMA} la masa molecular de *lisozima* (14.300 g/mol), M_D la masa molecular de los derivados esteroidales (HP = 416,5 g/mol; HPE = 549,52 g/mol), E_C (HP), E_D (HPE), E_{LISOZIMA} el registro del coeficiente de extinción para las tres sustancias.

Análisis de electroforesis. La preparación del gel de poliacrilamida al 12% (pH 8,8; Tris 5 M) se llevó a cabo mediante la técnica reportada por Laemmli [34]. Se cargaron 50 µL de *lisozima* y los polímeros *lisozima-pregnenolona* en los posillos junto al marcador

fosforilasa B ($M = 111 \text{ g/mol}$). El ensayo electroforético se realizó bajo una intensidad de corriente constante de 50 mA y voltaje inicial de 100 V y un voltaje final de 200 V (100 mA) en una fuente de alimentación para electroforesis. La tinción del gel se realizó con azul de Comassie G-250 (10). Por último se observó mediante un transluminador de luz ultravioleta.

Evaluación de la actividad antimicrobial. Las cepas microbianas en este estudio fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche. Las Cepas bacterianas usadas en esta investigación fueron *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) las cuales se conservaron a -4°C .

La evaluación del efecto antimicrobial de los diferentes polímeros sobre las especies bacterianas fueron determinadas usando el método descrito por Chiong y colaboradores [35], que se basa en el método de difusión en tubo. Es así, que se manejaron 12 tubos en los cuales el primero tenía como característica principal 2 mL de caldo de soya tripticaseína disuelto en agua estéril a doble concentración (0,12 g/L) y los siguientes tubos (2-12) a simple concentración (0,06 g/L). Seguidamente, se agregaron 2 mL del antibiótico en cuestión, aquí cabe señalar que el vehículo donde estaba disueltos los fármacos a evaluar dependió de sus características fisicoquímicas, es así, que la *cefalosporina* se disolvió en metanol, la *ampicilina* en agua, el *HP-lisozima* en agua:etanol (3:1) y *HPE-lisozima* agua:etanol (3:1).

A continuación, el tubo patrón se mezcló con agitación constante a temperatura ambiente para homogenizar la muestra y de este se tomó una alícuota de 2 mL que se añadió al tubo 2 para hacer la primera dilución de este segundo se tomó una alícuota y se depositó en el tercer tubo haciendo el mismo proceso hasta la última dilución. Después de este proceso se inocularon los tubos con una alícuota de 0,1 mL de la suspensión bacteriana previamente activada cuya concentración corresponde a la escala de *McFarland* ($9 \cdot 10^8$ células/mL) y se llevó a incubación a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se observó el crecimiento bacteriano en cada uno de los tubos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), sin embargo cabe señalar que adicionalmente se tomó una muestra de cada una de las muestras contenidas en los diferentes tubos y se sembró en placas de agar. Aquí es importante señalar que cada placa tenía el agar característico para el crecimiento bacteriano, ejemplo de esto es el agar *McConkey* que es específico para *Escherichia coli* y el agar *Stat 110* para *Staphylococcus aureus*. Seguidamente se incubaron las cajas a 37°C , durante 24 horas y se calificó el crecimiento bacteriano determinando la CMI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico. En este trabajo, se sintetizaron dos polímeros de *pregnenolona* usando como herramientas dos derivados de *pregnenolona*, el primero denominado *hemisuccinato de pregnenolona (5-Pregnen-20-one,3-(3-carboxi-1-oxopropoxi)* este compuesto tiene como característica principal un brazo espaciador con una longitud de 6 átomos y particularmente un grupo carboxilo libre como identidad química que sirvió para hacerlo reaccionar con los grupos *aminos* libres de los *aminoácidos* (Lys, Arg; Tabla 1) contenidos en la estructura proteica de la *lisozima* [36,37].

Tabla 1. Residuos de aminoácidos encontrados en el interior y la superficie de la *lisozima* que pueden reaccionar con grupos amino y carboxilos de los derivados esteroidales.

Residuo-NH ₂	Residuo-COOH
Lys-1	Glu-7
Arg-5	Asp-18
Lys-13	Asp-18
Arg-14	Glu-35
Lys-33	Asp-48
Arg-45	Asp-52
Arg-61	Asp-68
Arg-68	Asp-87
Arg-73	Asp-101
Lys-96	Asp-103
Lys-97	
Arg-112	
Lys-116	
Arg-125	
Arg-128	

En este sentido, el acoplamiento del *hemisuccinato* de *pregnenolona* a los residuos de grupos *amino* de la *lisozima* se llevo a cabo mediante el método reportado por algunos inves-

tigadores [30] usando como catalizador *1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide* (véase la Figura 1) para la formación de un nuevo enlace *amida* en el polímero *lisoizima-hemisuccinato-pregnenolona* (HP-L).

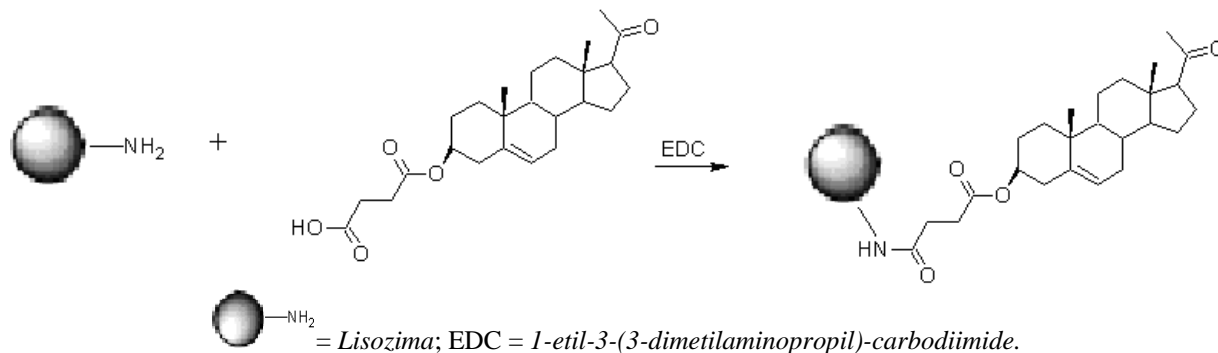


Figura 1. Acoplamiento del hemisuccinato de pregnenolona a la lisoizima. Aquí se observa la formación de un nuevo grupo amida en el polímero HP-L usando un derivado de carbodiimida como catalizador.

La caracterización de este polímero (Figura 2) se llevo mediante técnicas de espectroscopia de ultravioleta reportadas por *Erlanger* [19] y *Yamirskaya et al.*[31] Aquí cabe mencionar que la longitud de onda registrada para la *lisoizima* fue de 280 nm como lo indica *Kumagai et al.*[32], en su trabajo de la evaluación de la actividad antibacterial de la *lisoizima*.

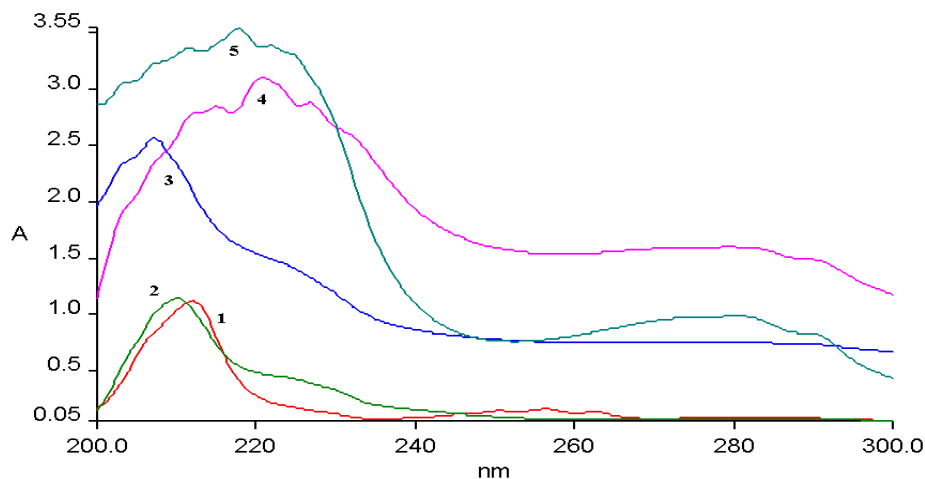


Figura 2. Espectro de ultravioleta de los conjugados; (1) *hemisuccinato-pregnenolona*, (2) *etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*, (3) *hemisuccinato-pregnenolona-lisoizima*, (4) *lisoizima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*, *lisoizima* (5).

Es importante señalar que se registro un desplazamiento a la izquierda (efecto hipsocrómico en el conjugado *HP-lisoizima* con respecto al *hemisuccinato-pregnenolona*, aunado a esto, otro resultado observado fue la disminución en el grado de absorción (efecto hipocrómico) del polímero *HP-lisoizima* con respecto a la *lisoizima* libre, estos efectos hacen

suponer que es debido a la interacción del grupo *carboxilo* presente en la estructura química del derivado esteroideal con el grupo *amino* de la molécula proteica de la *lisozima*, aquí podría hacerse una comparación con los resultados obtenidos por *Erlanger* [38] en 1957 en sus trabajos sobre la interacción de derivados esteroidales con otra proteína, sin embargo cabe mencionar que los esteroides usados en este trabajo son diferentes y la masa molecular de la *lisozima* es menor con respecto a la *albúmina* empleada por este investigador.

Por otro lado, cabe señalar que la cuantificación del esteroide ligado a la *lisozima* se desarrollo con base al modelo matemático propuesto por *Dorobanpu et al.* [33], para esteroides acoplados a proteínas. Los resultados se muestran en la Tabla 2, donde se registraron los espectros de absorción de la *lisozima*, del conjugado *hemisuccinato-pregnenolona* y el polímero *hemisuccinato-pregnenolona-lisozima*, es así que los resultados encontrados señalan que existen 11 residuos del conjugado *hemisuccinato-pregnenolona* por molécula de *lisozima*.

Tabla 1. Valores del análisis de espectroscopia de ultravioleta de la *lisozima*, *hemisuccinato-pregnenolona* (HP) y *lisozima-hemisuccinato-pregnenolona* (HP-L).

Compuesto	Concentración µg	Absorbancia $E(\lambda)$	Acoplamiento HP/ <i>lisozima</i> N
HP	500	$\lambda_{280} = 0,08$	
		$\lambda_{256} = 0,16$	
		$\lambda_{211} = 1,12$	
		$\lambda_{207} = 0,16$	
Lisozima	500	$\lambda_{280} = 0,98$	
		$\lambda_{256} = 0,77$	
		$\lambda_{211} = 3,35$	
		$\lambda_{207} = 0,86$	
HP- <i>lisozima</i>	500	$\lambda_{280} = 1,09$	3,71
		$\lambda_{256} = 1,14$	12,82
		$\lambda_{211} = 3,24$	1,78
		$\lambda_{207} = 2,57$	24,94
Relación del acoplamiento HP/ <i>lisozima</i>			$N \cong 11$

Por otro lado, en otro experimento se acoplo el conjugado *etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* a la *lisozima*, este derivado esteroideal tiene como característica principal un brazo espaciador con un grupo *amino* libre que sirvió para la interacción con los grupos carboxilos libres de los aminoácidos (Glu, Asp; tabla 1) contenidos en la estructura

química de la *lisozima*. Esto es parecido a la reacción reportada por *Edwards et al.* [37], quien uso como catalizador un derivado de *carbodiimida* con la finalidad de formar un nuevo grupo amida por la interacción del grupo funcional *amino* contenido en el derivado de *celulosa* y los grupos *carboxilos* libres de la *lisozima*.

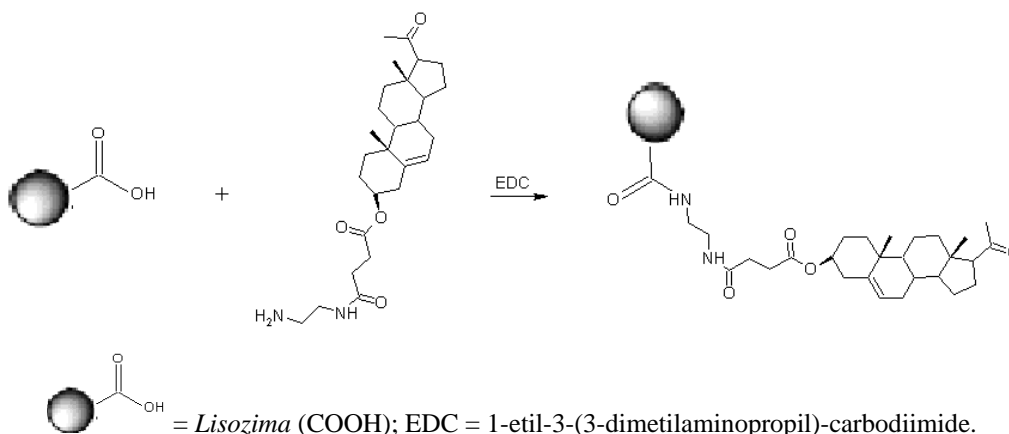


Figura 3. Formación del polímero *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*, usando un derivado de *carbodiimida* como catalizador.

Tabla 3. Aquí se muestran los registros de los datos de concentración y absorbancia de cada uno de los compuestos involucrados en el polímero HPE-*lisozima*. HPE = *etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*.

Compuesto	Concentración µg	Absorbancia $E(\lambda)$	Acoplamiento HP/ <i>lisozima</i> (N)
HPE	500	$\lambda_{280} = 0,07$	
		$\lambda_{221} = 0,47$	
		$\lambda_{210} = 1,154$	
<i>Lisozima</i>	500	$\lambda_{280} = 0,98$	
		$\lambda_{221} = 3,77$	
		$\lambda_{210} = 3,31$	
HPE- <i>lisozima</i>	500	$\lambda_{280} = 1,60$	10,54
		$\lambda_{221} = 3,10$	2,07
		$\lambda_{210} = 2,60$	12,74
Relación del acoplamiento HP/ <i>lisozima</i>			$N \cong 9$

La caracterización del conjugado se realizó mediante las técnicas mencionadas para el polímero HP-L. Es importante mencionar, que se observó un desplazamiento en el complejo macromolecular HPE-L hacia la derecha mostrando un efecto batocrómico, estos resultados son similares a los reportados por *Erlanger et al.* [19], en su trabajo de la interacción de derivados esteroidales y proteínas. Este efecto podría ser consecuencia de la interacción de los

grupos *carboxilos* libres de los *aminoácidos* Glu y Asp de la *lisozima* con grupos *amino* provenientes de la molécula de *etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona*. Aunado a esto, los resultados obtenidos del análisis espectroscópico de ultravioleta (Tabla 3), señalan que por cada molécula del polímero *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* (HPE-*lisozima*) existen 9 residuos del derivado de *pregnenolona*.

Por otro lado, es importante señalar que se hicieron experimentos adicionales para evaluar si existían diferencias en las características estructurales de la *lisozima* y de los polímeros de *pregnenolona*, por lo que se realizó el análisis de electroforesis (véase la Figura 4) usando la técnica reportada por *Laemmli et al.* [34] Nuestros resultados señalan la electroforesis en gel de poliacrilamida (pH 8,8, Tris 0,05 M) mostró diferencias significativa entre la banda de la *lisozima* y las bandas de los polímeros *lisozima-pregnenolona*, sin embargo no se observa diferencias entre ellos. Estos datos señalan por un lado que las diferencias entre la proteína y la conjugada con el esteroide pueden ser debido a la interacción entre los grupos *amino* y *carboxilos* libres de la *lisozima*. Esto es avalado por otros estudios realizados por *Smales et al.* [39] donde acoplan a un esteroide denominado *estróna* a la *lisozima*, encontrando modificaciones en las bandas de la *lisozima* conjugada con el esteroide con respecto a la *lisozima* libre.

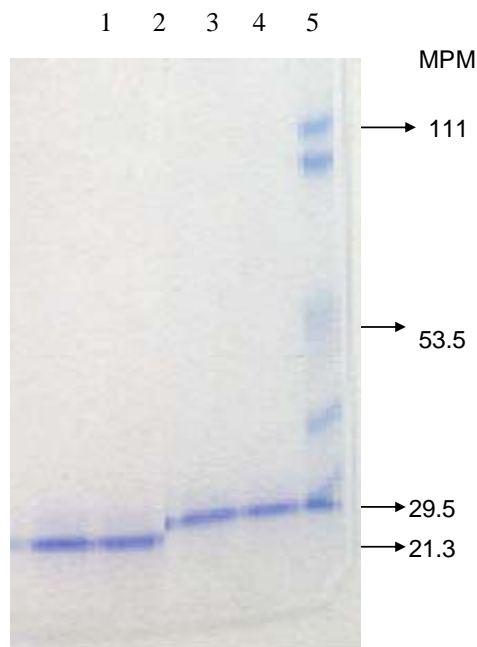


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (pH 8,8, Tris 0,05 M) de *lisozima* (3,4), y de los polímeros *lisozima-hemisuccinato-pregnenolona* (2) y *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* (1).

Análisis biológico. Para llevar a cabo el análisis antibacterial de los polímeros *lisozima-pregnenolona* se usó el método reportado por Chiong et al.[35], es importante mencionar que en este trabajo, se usó como herramienta biológica a la *cefotaxime* (cefalosporina de tercera generación) que es un antibiótico que ya ha sido plenamente estudiado por varios investigadores [40] y que se sabe que tienen efectos antibacteriales sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* [41,42], es así, que este estándar antibacterial sirvió para evaluar el efecto que inducen los polímeros sobre las cepas bacterianas de estudio.

Los resultados de la Figura 5 señalan que la concentración mínima de inhibición de la *cefotaxime* y el polímero *lisozima-hemisuccinato-pregnenolona* sobre *Escherichia coli* fue la misma (0,12 mg/mL). Sin embargo, en comparación con el complejo macromolecular *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* (HPE-L) la dosis para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* fue menor (0,06 mg/mL).

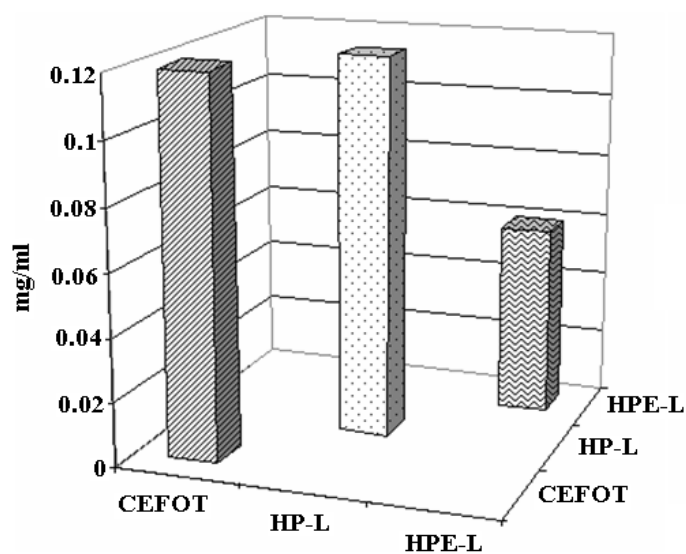


Figura 5. En la figura se observa que la CMI del polímero *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* (HPE-L) sobre *Escherichia coli* es menor con respecto a los otros dos compuestos; *cefotaxime* (CEFOT) y *hemisuccinato-pregnenolona-lisozima* (HP-L). CMI = concentración mínima de inhibición.

Por otro lado, también se evaluó el efecto antibacterial que estos mismos compuestos ejercían sobre *Staphylococcus aureus*, en este sentido, nuestros resultados indican que el polímero HPE-L mostró una menor CMI (0,06 mg/mL; figura 6) sobre este microorganismo en comparación con el efecto antibacterial inducido por el polímero HP-L y la *cefotaxima* que mostraron una CMI de 0,125 mg/mL y 0,25 mg/mL respectivamente.

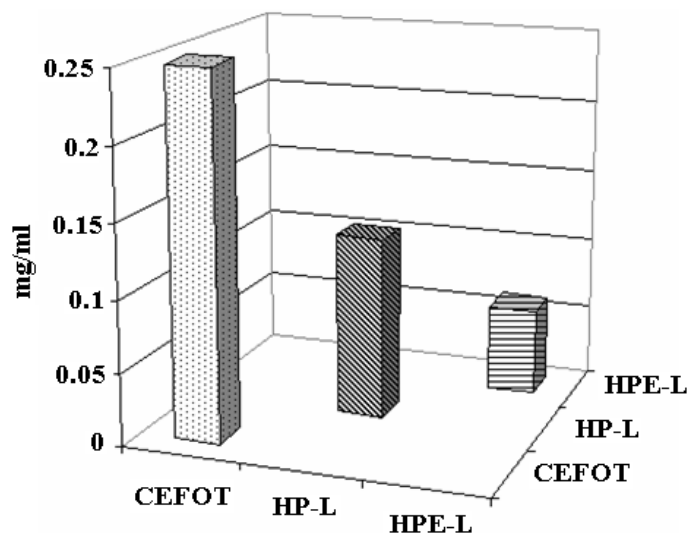


Figura 6. Aquí se observa que la CMI sobre *Staphylococcus aureus* del polímero *lisozima-etilendiamina-hemisuccinato-pregnenolona* (HPE-L) es menor que la de los otros compuestos como son *cefotoxime* (CEFOT) y el *lisozima-hemisuccinato-pregnenolona* (HP-L). CMI = concentración mínima de inhibición.

Aquí es importante señalar que también se evaluó a la *lisozima*, no observándose efectos sobre las cepas bacterianas a las mismas concentraciones usadas en esta investigación, esto es avalado por estudios realizados por Bera et als. [43] donde se señala que la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* es resistente a la *lisozima* por la acetilación ejercida por la enzima *O-acetiltransferasa* contenida en la cepa bacterial. En conclusión, estos resultados señalan que modificaciones en la estructura de la *lisozima* por el acoplamiento con el esteroide le confiere actividad antibacteriana, por lo tanto sería de suma importancia sintetizar nuevos polímeros del tipo *esteroide-proteína* para ahondar más sobre el efecto antibacterial que estos ejercen sobre diversos microorganismos patógenos.

BIBLIOGRAFIA

1. Chanda S, Caldwell S. "Fulfilling the promise: drug discovery in the post-genomic area", Drug Discovery Today, **8**, 168 (2003)
2. Workman P. "The impact of genomic and proteomic technologies on the development of new cancer drugs", Ann. Oncol., **13**, 115 (2002)
3. Geysen H, Schoenen F, Wagner D, Wagner R. "Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge", Nat. Rev. Drug Discov., **2**, 222 (2003)

4. Gallop M, Barrett R, Dower W, Fodor S, Gordon E. "Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries", *J. Med. Chem.*, **37**, 1233 (1994).
5. Gordon E, Barrett R, Dower W. "Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions", *J. Med. Chem.*, **37**, 1385 (1994)
6. Green J, Kahn S, Savoj H, Sprague P, Teig S. "Chemical Function Queries for 3D Database Search", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **34**, 1297 (1994)
7. Terrett N, Gardner M, Gordon D, Kobylecki R. "Combinatorial synthesis: The design of compound libraries and their application to drug discovery", *Tetrahedron*, **51**, 8135 (1995)
8. Dolle R. "Comprehensive survey of chemical libraries yielding enzyme inhibitors, receptor agonists and antagonists, and other biologically active agents: 1992 through 1997", *Mol. Diversity*, **2**, 223 (1996)
9. Kassel D. "Combinatorial Chemistry and Mass Spectrometry in the 21st Century Drug Discovery Laboratory", *Chem. Rev.*, **101**, 255 (2001)
10. Balkenhohl F, Bussche-Hünnefeld C, Lansky A, Zechel C. "Combinatorial synthesis of small organic molecules", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 2289 (1996)
11. Lebl M. "Solid-phase synthesis of combinatorial libraries", *Curr. Opin. Drug. Disc. Develop.*, **2**, 385 (1999)
12. Lam K, Salmon S, Hersh E, Hruby V, Kazmierski W, Knapp R. "A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity", *Nature*, **354**, 82 (1991)
13. Ellman J. "Design, Synthesis and Evaluation of Small-Molecule Libraries", *Acc. Chem. Res.*, **29**, 132 (1996)
14. Schreiber S. "Target-Oriented and Diversity-Oriented Organic Synthesis in Drug Discovery", *Science*, **287**, 1964 (2000)
15. Ley S, Baxendale I. "New tools and concepts for modern organic synthesis", *Nature Rev. Drug. Discov.*, **1**, 573 (2002)
16. James I. "Linkers for solid phase organic synthesis", *Tetrahedron*, **55**, 4855 (1999)
17. Guillier F., Orain D., Bradley M. "Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry", *Chem. Rev.*, **100**, 2091(2000)
18. Blaney P, Grigg R, Sridharan V. "Traceless Solid-Phase Organic Synthesis, *Chem. Rev.* (Washington, DC, United States), **102**, 2607 (2000)

19. Erlanger F, Borek F, Beiser S, Lieberman S. “*Steroid-protein Conjugates. II. Preparation and characterization of conjugate of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone*”, *J. Biochem.*, **234**, 1090 (1959)
20. Du H, Lu Y, Yang W, Wu M, Cheng J, *Preparation of steroid antibodies and parallel detection of multianabolic steroid abuse with conjugated hapten microarray*, *Anal. Chem.*, **76**, 6166 (2004).
21. Fujii Y, Teranishi M, Ikeda Y, Yamazaki M, Kishida S, Miyabo S. “*Characterization of antisera to 2- hidroxiestradiol, and 4-hidroxiestradiol using 6- (O-carboxymethyl)oxime and 17-hemisuccinate-Bovine serum albumin conjugates in radioimmunoassay*”, *Steroids*, **46**, 857 (1985)
22. Sahingoz Y, Cirakoglu B. “*Production of Monoclonal Antibodies Specific for Progesterone, Estradiol by Simultaneous Injection of Different Steroids*”, *Turk. J. Biol.* **24**, 697 (2000)
23. Bangwei D, Ning Y, Yang L, Cardenas G, Evanson R, Orsak T. “*Origins of Cell Selectivity of Cationic Steroid Antibiotics*”, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 13642 (2004)
24. Patch J, Barron A. “*Helical Peptoid Mimics of Magainin-2 Amide*”, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12092 (2004)
25. Li C, Peters A, Meredith E, Allman G, Savage P. “*Design and Synthesis of Potent Sensitizers of Gram-Negative Bacteria Based on a Cholic Acid Scaffolding*”, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2961 (1998)
26. Ding B, Taotofa U, Orsak T, Chadwell M, Savage P. “*Synthesis and Characterization of Peptide-Cationic Steroid Antibiotic Conjugates*”, *Org. Lett.*, **6**, 3433(2004)
27. Smales C, Moore C, Blackwell L. “*Characterization of Lysozyme-Estrone Glucuronide Conjugates. The Effect of the Coupling Reagent on the Substitution Level and Sites of Acylation*”, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 693 (1999)
28. Iacono J, MacKay J, DiRienzo S, Pollock J. “*Selective Antibacterial Properties of Lysozyme for Oral Microorganisms*”, *Infect. Immun.*, **29**, 623 (1980)
29. Figueroa V, Cedillo D, Tolosa L, Maldonado G, Ceballos R. “*Synthesis of Pregnenolone-Pregnenolone Dimer via Ring A-Ring A connection*”, *J. Mex. Chem. Soc.*, **50**, 42 (2006)
30. DeSilva N, *Interactions of Surfactant Protein D with Fatty Acids*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **29**, 757 (2003)

31. Yatsimisrskaya A, Gavrilova M, Egrov M, Levashov V. "Preparation of conjugates of progesterone with bovine serum albumin in the reversed micellar medium", *Steroids*, **58**, 547 (1993)
32. Kumagai I, Miura K, "Enhanced bacteriolytic activity of hen egg-white lysozyme due to conversion of Trp62 to other aromatic amino acid residues", *J. Biochem.*, **105**, 946 (1989)
33. Dorobanpu C, *The Characterization of immunogenic Conjugates by Spectral Differences Method*, *Roum. Biotechnol. Lett.* **6**, 299 (2001)
34. Laemmli U, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, **227**, 680 (1970)
35. Chiong R, Betancourt A, "Pruebas Microbiológicas para evaluar la efectividad bactericida de desinfectantes químicos, Sección de Microbiología Sanitaria. Laboratorio de desinfección y esterilización. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología", La Habana Cuba, 1985, páginas 24-30
36. Masuda T, Kitabatake N, "Structure- Sweetness Relationship in Egg White lysozyme: role of lysine and Arginine Residues on the Elicitation of Lysozyme Sweetness", *Chem. Senses*, **30**, 667 (2005)
37. Edwards J, Sethumadhavan K, Ullah A. "Conjugation and Modeled Structure/Function Analysis of Lysozyme on Glycine Esterified Cotton Cellulose-Fibers", *Bioconjugate Chem.*, **11**, 469 (2000)
38. Erlanger F, Borek F, Beiser S, Lieberman S. "Steroid-protein Conjugates. I. Preparation and characterization of conjugate of bovine serum albumin with testosterone, and cortisone", *J. Biol. Chem.*, **228**, 713 (1957)
39. Smales M, Elgar F, Moore H, Blackwell F. "Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Lysozyme-Estrone Glucuronide Conjugates", *Bioconjugate Chem.*, **9**, 838 (1998)
40. Ozmen S, Dursun M, Yilmaz S. "Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, and management", *Acta Gastroenterol. Belg.*, **69**, 276 (2006)
41. Lutsar I, Friedland R, Jafri S, Wubbel L, "Efficacy of Gatifloxacin in Experimental *Escherichia coli* Meningitis", *Antim. Agents & Chem.*, **43**, 1805 (1999)
42. Willis R, Gaines J. "Cefepime vs Cefotaxime in the Treatment of Pneumonia", *Infect. Med.*, **15**, 636 (1998)
43. Bera A, Biswas R, Herbert S, Götz F. "The Presence of Peptidoglycan O-Acetyltransferase in Various Staphylococcal Species Correlates with Lysozyme Resistance and Pathogenicity", *Infection and Immunity*, **74**, 4598 (2006)