

**Modo de acción de la chalcona
1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona
como inhibidor de β -lactamasa: estudio cinético y
caracterización inicial mediante espectrometría de masas**

Cristina Lucía Mora Arango

Aspirante al título de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN SUSTANCIAS BIOACTIVAS (GISB)

Maria Consuelo Jaramillo Flórez

MSc., PhD. Asesora del trabajo de investigación

Comité tutorial:

Maria Consuelo Jaramillo Flórez. MSc., PhD.

Edison Javier Osorio Durango. MSc., PhD.

Jairo Quijano Tobón. MSc., PhD.

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2011

CONTENIDO

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1. IMPORTANCIA DE LOS FARMACOS β-LACTAMICOS	8
3.2. EL FENÓMENO DE RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS.	11
3.2.1. Resistencia mediada por β -lactamasas.	12
3.2.1.1. Clasificación de las enzimas β -lactamasas.	12
3.2.1.2. Mecanismo de acción de las enzimas β -lactamasas.....	14
3.2.2. β -lactamasa clase C de <i>Enterobacter cloacae</i>	15
3.3. IMPACTO DE LA RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS MEDIADA POR BACTERIAS RESISTENTES.	21
3.4. ESTRATEGIAS PARA ENFRENTAR LA RESISTENCIA MICROBIANA.	23
3.4.1. Desarrollo de inhibidores enzimáticos.	24
3.5. IMPORTANCIA DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y BÚSQUEDA DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS.	27
3.5.1. Introducción a la espectrometría de masas.	27
3.5.2. Fuentes de ionización en espectrometría de masas aplicada al análisis de proteínas.	29
3.5.3. Principales analizadores de masas utilizados en proteómica.....	32
3.6. LAS CHALCONAS Y SU POTENCIAL COMO INHIBIDORES ENZIMÁTICOS.	36
3.6.1. Características generales de las chalconas como precursores de los flavonoides.....	37
3.6.2. Chalconas con potencial actividad inhibitoria de β -lactamasas.....	39
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo General	40
4.2. Objetivos Específicos	40
5. SECCIÓN EXPERIMENTAL	41
5.1. Compuestos.	41
5.1.1. chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.....	41
5.1.2. Antibióticos y reactivos.....	42
5.1.3. Enzima β -lactamasa.....	42

5.2. Determinación de los parámetros cinéticos.	43
5.2.1. Inhibición de β -Lactamasas y cuantificación de la inhibición.	43
5.3. Estudio de espectrometría de masas.	43
5.3.1. Preparación de muestras para espectrometría de masas.	43
5.3.1.1. Análisis de espectrometría de masas ESI/IT/MS.	44
5.3.2. Preparación de los complejos β -lactamasa/inhibidor para espectrometría de masas.	44
5.3.2.1. Análisis de los complejos β -lactamasa/inhibidor mediante espectrometría de masas.	45
5.4. Análisis de β -lactamasa, β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.	45
5.4.1. HPLC fase reversa y espectrometría de masas.	45
5.4.2. Solventes para cromatografía líquida.	46
5.4.3. Preparación de la muestra para el análisis de cromatografía líquida.	46
5.4.4. Condiciones de espectrometría de masas.	46
5.5. Análisis de los péptidos trípticos de β -lactamasa, β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona.	47
5.5.1. Inactivación de β -lactamasa.	47
5.5.2. Proteólisis.	47
5.5.2.1. Reducción y alquilación.	48
5.5.2.2. Digestión.	48
5.5.3. HPLC fase reversa.	48
5.5.4. Espectrometría de masas.	49
5.6. Estudio teórico de modelación molecular de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona.	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1. Cinética enzimática de β -lactamasa.	50
6.1.1. Actividad inhibitoria del tazobactam.	53
6.1.2. Actividad inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.	54
6.1.3. Representación lineal de las cinéticas de inhibición.	55
6.2. Espectrometría de masas ESI/IT/MS.	57
6.2.1. Liofilizado comercial de la enzima β -lactamasa.	57
6.2.2. Tazobactam.	58
6.2.3. Chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.	62
6.3. Análisis de β -lactamasa y sus complejos de inhibición mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.	64

6.3.1. Análisis de β -lactamasa mediante cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas ESI/IT/MS.	64
6.3.2. Análisis del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.....	67
6.3.3. Análisis del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.....	70
6.4. Análisis de los péptidos trípticos de la enzima β -lactamasa y sus complejos de inhibición mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.....	72
6.4.1. Análisis de los péptidos trípticos de la enzima β -lactamasa mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.....	73
6.4.2. Análisis del producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas....	79
6.4.2.1. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam de sodio.	82
6.4.2.2. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam.....	83
6.4.2.3. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la deshidroxilación del tazobactam.	86
6.4.2.4. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la descarboxilación del tazobactam.	87
6.4.2.5. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la eliminación del anillo amino tetrazolio del tazobactam.....	88
6.4.2.6. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la formación del complejo propiolilado.	89
6.4.3. Análisis del producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.	90
6.5. Optimización de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona.	98
7. CONCLUSIONES	107
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
AGRADECIMIENTOS	117

1. RESUMEN

La chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona presentó actividad inhibitoria de tipo competitivo frente a la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV, la comparación de los parámetros cinéticos permitió comprobar el potencial inhibitorio del compuesto y la aplicación de la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC/ESI/IT/MS), permitió la determinación de la masa molecular de la enzima β -lactamasa que es de 40096 Da, la masa molecular del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam de 40207.0 Da y la masa molecular de 40392.7 Da correspondiente al complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona. En el análisis del producto de la digestión con tripsina de la enzima se identificaron 12 fragmentos péptidicos, entre ellos el fragmento que contiene la serina catalítica con una masa molecular de 2300 Da. La masa molecular de este péptido se modificó debido a la unión covalente con el inhibidor de referencia tazobactam, registrándose aumentos de 322 y 300 Da, posterior a la formación del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, se presentaron reacciones posteriores de deshidroxilación, descarboxilación y eliminación del tazobactam, las cuales generaron aumentos en la masa molecular del péptido del sitio activo, correspondientes a 284, 256, 232 Da y no habían sido previamente reportadas, finalmente se detectó un aumento de 52 Da, debido a la formación del fragmento propiolilado que coincide con el fragmento de inhibición en el mecanismo de reacción del tazobactam.

Los estudios de cinética enzimática, espectrometría de masas y de modelación molecular permitieron plantear el modo de acción del compuesto sintetizado, el cual ejerce su acción inhibitoria en dos etapas, la primera etapa se inicia a partir de la reacción nucleofílica por parte de la serina activa de la β -lactamasa con el carbonilo de la chalcona para la formación del complejo de acilación y en la segunda etapa de la reacción se libera el grupo arilo de la chalcona y se presenta la formación del complejo irreversible dimetoxifenil propenona a través de la reacción de eliminación, dando como resultado la inactivación de la enzima, tal

como se evidencia en el análisis del producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona donde el aumento de 360 Da en la masa molecular del péptido del sitio activo se generó por la formación de un aducto entre la chalcona con masa molecular de 282 Da y el dimetil sulfóxido con masa molecular de 78 Da, utilizado como medio de solubilización del compuesto, de acuerdo con el estudio de modelación molecular la unión covalente entre la serina del sitio activo y la chalcona mediante el complejo de acilación es una reacción donde la energía libre es de 49.9 kJ/mol y se estabiliza a través de las interacciones intermoleculares mediadas por enlaces de hidrógeno entre los residuos aminoacídicos del péptido del sitio activo. El producto de la reacción de inhibición de la chalcona sobre β -lactamasa es la formación del complejo dimetoxifenil-propenona, detectado en espectrometría de masas por un aumento de 207 Da en la masa molecular del péptido del sitio activo, los estudios de modelación molecular demuestran que la reacción es espontánea con un potencial termodinámico de -41.6 kJ/mol, lo cual refuerza el modo de acción propuesto de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor de la enzima β -lactamasa.

2. INTRODUCCIÓN

El principal mecanismo de resistencia frente a los fármacos β -lactámicos en las bacterias es la producción de enzimas β -lactamasas, la gran diversidad estructural de estas enzimas se ha convertido en una grave amenaza en el tratamiento clínico de las principales enfermedades infecciosas. Una de las alternativas más efectivas para enfrentar el problema de la resistencia mediada por β -lactamasas es la combinación de un fármaco β -lactámico efectivo con un inhibidor enzimático como en el caso de las combinaciones amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam, las cuales son ampliamente conocidas en cuanto a su mecanismo de acción y que a lo largo de los años han demostrado su efectividad en la práctica clínica, desafortunadamente este grupo de inhibidores no son universalmente efectivos contra cada una de las clases de β -lactamasas conocidas y por esta razón es necesario avanzar en la búsqueda de nuevos inhibidores de β -lactamasa activos frente a un amplio número de enzimas y que preferiblemente presenten núcleos químicos diferentes al anillo β -lactámico con el fin de evitar el fenómeno de resistencia cruzada, de acuerdo con esto se realizó la síntesis de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona con el fin de evaluar su actividad inhibitoria frente a la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*, determinar los complejos de inhibición formados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y establecer comparaciones con el tazobactam como inhibidor de referencia.

En el presente trabajo de investigación se describe el modo de acción de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor efectivo de la enzima β -lactamasa, a partir del análisis del complejo de inhibición mediante espectrometría de masas complementado con el estudio teórico de modelación molecular en el que se determinan los potenciales termodinámicos y las interacciones moleculares entre el sitio activo de la enzima y la chalcona sintetizada.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. IMPORTANCIA DE LOS FARMACOS β -LACTAMICOS EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Los primeros antibióticos surgen como respuesta a la necesidad de reducir las altas tasas de mortalidad representadas por las enfermedades infecciosas a nivel mundial, con la introducción de los derivados de las sulfonamidas en 1930 y con el ingreso de las penicilinas en la práctica clínica en el año de 1940 se inició la edad de oro de la investigación antibiótica [1].

La mayoría de los antibióticos conocidos actualmente son metabolitos secundarios derivados de productos naturales de gran complejidad estructural y con características químicas especiales que les permiten penetrar las membranas celulares bacterianas, interactuar con proteínas específicas y lograr la inhibición de muchas proteínas blanco en la célula bacteriana, como en el caso de los fármacos β -lactámicos que inhiben a las enzimas D-alanil-alanina-transpeptidasas que participan en la formación del puente cruzado de peptidoglucano de la pared celular bacteriana [2].

3.1.1. Antecedentes históricos en el desarrollo de los agentes β -lactámicos.

El descubrimiento y desarrollo de las penicilinas como agentes terapéuticos es considerado como el principal progreso en la historia de la medicina del siglo XX, en 1928 el científico escocés Alexander Fleming fue el primero en observar la inhibición del crecimiento en un cultivo de estafilococos en un plato de agar contaminado con *Penicillium notatum*, esta observación seguida de una serie de experimentos microbiológicos lo llevaron a comprobar que efectivamente el hongo del género penicillium producía una sustancia con actividad antibiótica que se denominó penicilina en honor al género del microorganismo con la capacidad de

producirla [3]. Años después, científicos de la Universidad de Oxford: Howard Walter Florey y Ernest Boris Chain se interesaron en el tema y asumieron el reto de continuar la investigación sobre esta sustancia promisoría con potencial antibacterial, ambos científicos se encargaron de la producción y purificación de la penicilina a gran escala y de esta manera obtuvieron cantidad suficiente para comprobar la potencia y eficacia en estudios con animales de experimentación infectados con microorganismos patógenos [3, 4].

Algunos años después, en 1941 se iniciaron los estudios clínicos de la penicilina con resultados contundentes y el éxito contundente de éste nuevo compuesto antibiótico determinó que en 1945 los tres científicos: Alexander Fleming, Howard Walter Florey y Ernest Boris Chain compartieran el Premio Nobel de Medicina, estos grandes episodios marcaron el inicio de la era antibiótica donde la penicilina ha sido la protagonista y ha salvado la vida de un gran número de personas en el mundo [1, 5-8].

3.1.2. Estructura y modo de acción de los agentes β -lactámicos.

Las penicilinas son agentes antibacterianos naturales o sintéticos en los que es posible destacar tres componentes básicos a nivel de la estructura química: anillo β -lactámico unido al anillo de tiazolidina y una cadena lateral que es variable dependiendo de cada compuesto en particular, el primer antibiótico utilizado en la práctica clínica fue la penicilina G, a continuación se presenta la estructura química de este importante antibiótico [5].

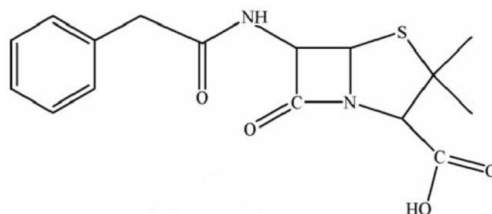


Figura 1. Estructura química de la penicilina.

Los antibióticos β -lactámicos comprenden seis diferentes clases estructurales que incluyen penemas, cefemas, monobactamas, clavamas y carbapenemas. La bencilpenicilina y ampicilina pertenecen al grupo de las penemas, las cefemas incluyen a las cefalosporinas clásicas como cefaloridina, nitrocefina y cefotaxima y las monobactamas son los β -lactámicos monocíclicos como el aztreonam [6].

A continuación se presentan las estructuras químicas de los principales grupos de antibióticos β -lactámicos [6].

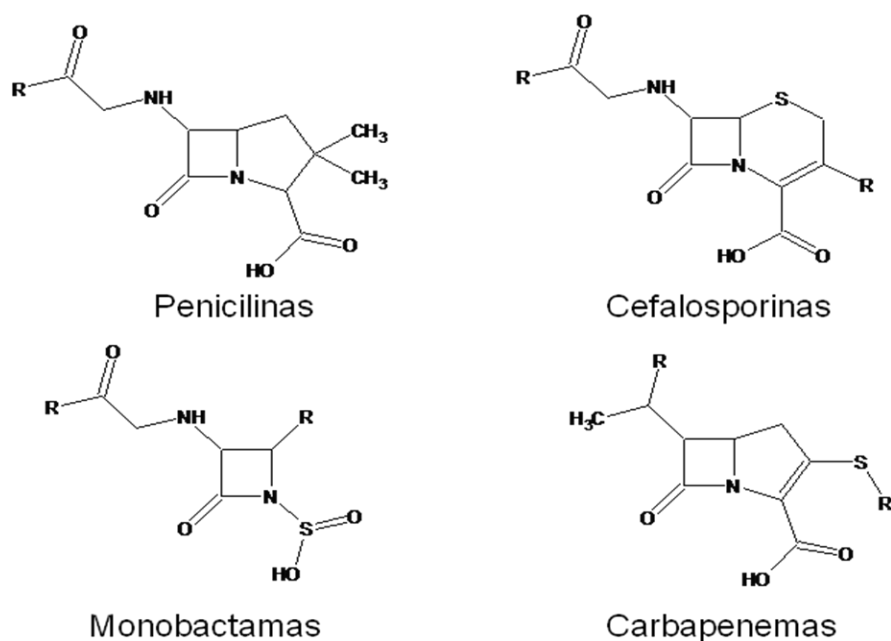


Figura 2. Principales grupos de antibióticos β -lactámicos utilizados en la práctica clínica.

Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por su actividad bactericida y actúan en la fase de crecimiento y división de los microorganismos con un efecto tiempo dependiente, el mecanismo de acción de este grupo de antibióticos consiste en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, mediante la fijación a las enzimas encargadas de la formación del enlace cruzado de las cadenas de peptidoglucano, estas enzimas localizadas justo debajo de la pared celular son conocidas como transpeptidasas o proteínas fijadoras de penicilina (Penicillin-

Binding Proteins, PBP), las cuales constituyen el blanco molecular de los antibióticos β -lactámicos. El bloqueo de estas enzimas transpeptidasas conduce a la debilidad estructural del microorganismo, la cual va seguida de la activación de enzimas autolíticas que causan la ruptura de las bacterias susceptibles, generando la disminución en la población de los microorganismos patógenos, lo cual finaliza en un resultado positivo para los pacientes debido a la erradicación de la infección [5].

3.2. EL FENÓMENO DE RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS.

La resistencia microbiana se define como la capacidad de los microorganismos para adaptarse y sobrevivir en condiciones ambientales relativamente hostiles como en presencia de los agentes antimicrobianos, esta condición de estrés para el microorganismo trae como resultado la destrucción de las especies susceptibles mientras que las especies resistentes prosperan y ganan predominio, este fenómeno de resistencia se evidencia en los patógenos importantes más comunes, incluye la mayoría de los antibióticos de uso común y afecta a los pacientes más debilitados, actualmente se considera que la interacción constante entre los microorganismos y los agentes antibióticos constituyen la principal causa de resistencia antimicrobiana [9-12].

Gran parte de la energía y de la capacidad genética de la célula bacteriana se utiliza para resistir activamente a los antibióticos, un microorganismo es resistente desde el punto de vista biológico cuando las concentraciones de fármaco necesarias para su inhibición se hacen cada vez mayores y desde el punto de vista farmacológico se presenta resistencia antimicrobiana cuando se debe aumentar la dosis del antibiótico hasta niveles tan altos que resultarían tóxicos para el paciente [13-15].

3.2.1. Resistencia mediada por β -lactamasas.

El primer mecanismo de resistencia a antibióticos reportado en la literatura fue la producción de penicilinasas por cepas de *Escherichia coli* patógeno, desde entonces el estudio de este grupo de enzimas ha sido intenso, abordando las investigaciones desde el punto de vista bioquímico, microbiológico y genético, debido a la importancia de las β -lactamasas como principal causa de resistencia frente a los antibióticos derivados de la penicilina y a que su existencia se conoce desde mucho antes del comienzo de la era antibiótica [16-19].

Las β -lactamasas pertenecen al grupo de las hidrolasas y de acuerdo con el código E.C. 3.5.2.6., asignado por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica, son enzimas con la capacidad de hidrolizar amidas, amidinas y otros compuestos con enlaces carbono-nitrógeno, la mayoría de enzimas β -lactamasas conocidas actúan a través de la formación de un enlace éster en el que interviene uno de los residuos de serina del sitio activo [14, 15].

3.2.1.1. Clasificación de las enzimas β -lactamasas.

Hasta el momento se han descrito más de 190 proteínas de origen bacteriano con la capacidad de interactuar con moléculas de sustratos o inhibidores que presentan el núcleo β -lactámico, existe una gran diversidad de enzimas β -lactamasas agrupadas en dos esquemas de clasificación, en la clasificación funcional se asocian las enzimas de acuerdo con su perfil catalítico y en la clasificación molecular se relacionan las β -lactamasas de acuerdo con su secuencia de aminoácidos [20].

En el esquema de clasificación funcional propuesto por K. Bush, Jacoby y Medeiros en 1989 se considera el perfil catalítico, la susceptibilidad a inhibidores y el origen genético permitiendo la clasificación de las enzimas en cuatro grupos

principales: al grupo 1 pertenecen las enzimas cefalosporinasas no inhibidas por ácido clavulánico, en el grupo 2 están las β -lactamasas con serina en el sitio activo, sensibles a la acción de los inhibidores como las β -lactamasas de espectro extendido (Extended Spectrum Beta-Lactamase: ESBL), al grupo 3 corresponden las metalo- β -lactamasas que son inhibidas por EDTA y *p*-cloromercuribenzoato (pCMB) y al grupo 4 pertenecen las penicilinasas no inhibidas por ácido clavulánico, este sistema de clasificación fenotípica tiene una desventaja relacionada con las mutaciones puntuales que pueden alterar la especificidad del sustrato y la susceptibilidad al inhibidor, lo cual genera dificultades a la hora de asignar la enzima en un grupo particular, es por eso que surgió la clasificación molecular propuesta por Ambler [15, 21, 22].

Dentro del esquema de clasificación molecular propuesto por Ambler se agrupan las enzimas de acuerdo con las secuencias de aminoácidos, esta clasificación es muy utilizada por su gran simplicidad y debido al avance en las técnicas de secuenciación y proteómica, las enzimas pertenecientes a las clases A, C y D provienen de diferentes orígenes a nivel evolutivo y se caracterizan por la presencia de serina en el sitio activo, mientras que las enzimas de clase B son metalo- β -lactamasas con la presencia de Zinc o metales divalentes en el sitio activo, lo cual condiciona el mecanismo de acción catalítico [17].

Las principales características de las enzimas β -lactamasas teniendo en cuenta la equivalencia entre la clasificación molecular y la clasificación funcional se resumen en la tabla 1 [17, 18].

Los sustratos de preferencia son los fármacos fácilmente hidrolizados por cada grupo particular de enzimas y que no son efectivos en el tratamiento de infecciones ocasionadas por microorganismos productores de β -lactamasas, mientras que los fármacos estables no son hidrolizados por el respectivo grupo de enzimas y hacen parte de la terapéutica en infecciones causadas por gérmenes productores [17, 18].

Tabla 1. Clasificación de las enzimas β -lactamasas y sus principales características [17].

CLASE	SITIO ACTIVO	PM (g/mol)	MICROORGANISMOS PRODUCTORES	SUSTRATO PREFERENCIA	FÁRMACOS ESTABLES	INHIBIDOR	CLASIFICACIÓN FUNCIONAL
A	Residuo de serina	29000	<i>Klebsiella</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacterioides spp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	Carbenicilina, Oxacilina, Cefaloridina	Imipenem	Acido clavulánico, Sulbactam	2 Penicilinasas ESBLs
B	Ión zinc unido a grupo tiol		<i>Bacillus cereus</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Penicilina, Carbenicilina, Oxacilina, Cefotaxima	Aztreonam Monobactamas	EDTA, O-Fenantrolina	3
C	Residuo de serina	39000	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerógenes</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia spp</i> , <i>Providencia spp</i> .	Cefaloridina, Cefotaxima, Cefotaxima Carbenicilina, Penicilina	Oxacilina, Imipenem	Aztreonam	1 Cefalosporinasas
D	Residuo de serina		Enterobacteriáceas	Oxacilina, Penicilina, Carbenicilina, Cefaloridina	Cefotaxima, Aztreonam, Imipenem	Acido clavulánico	4

3.2.1.2. Mecanismo de acción de las enzimas β -lactamasas.

De acuerdo con la clasificación molecular las β -lactamasas de mayor importancia clínica pertenecen a las clases A y C, las cuales cuentan con el aminoácido serina en el sitio activo y su mecanismo catalítico puede explicarse en tres fases de reacción: (I) en la primera fase se forma un complejo reversible no covalente entre la β -lactamasa y el anillo β -lactámico, (II) en la segunda fase de reacción ocurre la ruptura del anillo β -lactámico debido a la formación del complejo de acilación covalente mediado por la serina del sitio activo y en la fase final (III), la hidrólisis del complejo acil-enzima reactiva la enzima y libera la molécula de fármaco inactiva al medio de reacción, tal como se esquematiza en la figura 3 [18, 23].

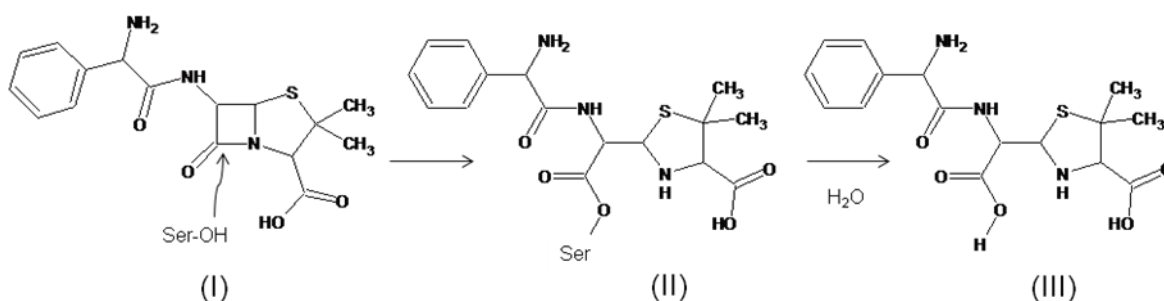


Figura 3. Mecanismo de acción de las Serina- β -Lactamasas.

La reacción se inicia con el ataque nucleofílico al anillo β -lactámico por parte de la serina del sitio activo, seguida por la formación del complejo covalente acil-enzima y mediante la hidrólisis se regenera la enzima y se libera el antibiótico inactivo al medio de reacción [14]. En el caso de los inhibidores efectivos de β -lactamasa, los complejos acil-enzima resultan muy estables y no pueden hidrolizarse fácilmente o se fragmentan después de unirse a la serina catalítica como ocurre con el tazobactam, inhibidor de referencia utilizado en la práctica clínica en la combinación piperacilina/tazobactam [18].

3.2.2. β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*.

Debido a la incidencia de las enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos oportunistas de la familia Enterobacteriaceae, en las cuales el principal mecanismo de resistencia es la producción de enzimas β -lactamasas y teniendo en cuenta que el desarrollo experimental del presente trabajo de investigación gira en torno a la búsqueda de inhibidores de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*, es importante precisar las características estructurales y la secuencia de aminoácidos en esta enzima.

3.2.2.1. Características estructurales de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*.

Las estructuras tridimensionales de varias enzimas de clase C se han obtenido mediante estudios de cristalografía de rayos X, en las cuales se evidencia la analogía estructural que existe entre las β -lactamasas y las transpeptidasas (PBP) de la pared celular bacteriana, lo cual confirma la hipótesis de que estas enzimas provienen de una misma proteína ancestral [24, 25].

Todas las enzimas de clase C poseen un dominio α/β que contiene el residuo de serina catalítica en posición 64, el residuo de lisina en posición 67, el residuo de tirosina en posición 150 y otro residuo de lisina en posición 314 ubicada de forma opuesta a la serina catalítica, otra característica estructural muy importante en las enzimas de clase A y clase C es el omega loop, el cual permite el ingreso al sitio activo de los antibióticos voluminosos y en el caso particular de las enzimas de clase C, el omega loop está comprendido entre los residuos 185-225 de la enzima [25].

A continuación en la figura 4 se presentan las imágenes correspondientes a la estructura molecular de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*, obtenidas de la base de datos Brookhaven Protein Data Bank (PDB), código de referencia 1XX2.

En la imagen del lado izquierdo se presentan los dos dominios estructurales de la enzima β -lactamasa y en la imagen del lado derecho se puede observar la triada catalítica: Ser⁶⁴, Lys⁶⁷ y Tyr¹⁵⁰ del sitio activo de la β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*.

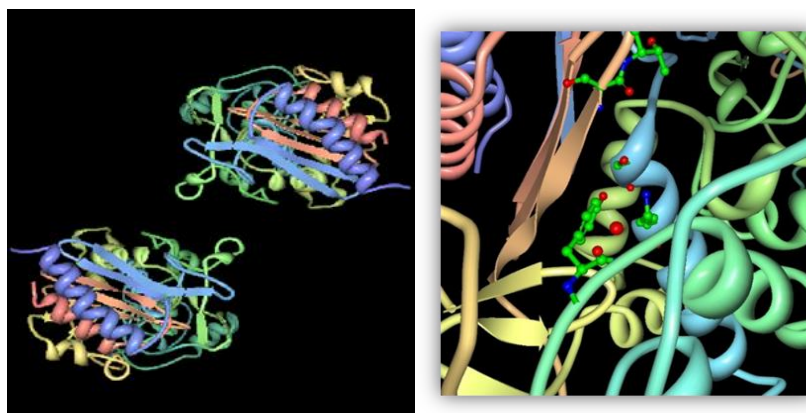


Figura 4. Dominios estructurales de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae* (EC 3.5.2.6).

3.2.2.2. Secuencia de aminoácidos y péptidos producto de la digestión con tripsina de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*.

La estructura molecular de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae* se conoce desde 1988 y se define como una proteína catalítica que consta de dos dominios estructurales idénticos en cuanto a la conformación espacial y a la secuencia de aminoácidos, la secuencia de cada uno de los dominios comprende 361 aminoácidos y corresponden a una masa molecular de 39234.06 Da.

El desarrollo de la proteómica como una ciencia encargada del estudio sistemático de las proteínas expresadas por una célula o un tejido y la espectrometría de masas como herramienta analítica fundamental, han creado la necesidad de obtener péptidos de menor tamaño a partir de proteínas complejas para estudiar sus características estructurales y funcionales, por lo tanto resulta de gran interés conocer el mapa peptídico de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*, con el fin de avanzar en estudios de espectrometría de masas aplicados a la búsqueda de inhibidores enzimáticos [26, 27].

A continuación se presenta la secuencia de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae* en el código estándar de aminoácidos [26]:

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
TPVSEKQLAE	VVANTITPLM	KAQSVPGMAV	AVIYQGKPHY	YTFGKADIAA	NKPVTPQTLF
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
ELGSISKFTT	GVLGGDAIAR	GEISLDDAVT	RYWPQLTGKQ	WQGIRMLDLA	TYTAGGLPLQ
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
VPDEVTDNAS	LLRFYQNWQP	QWKPGTTRLY	ANASIGLFGA	LAVKPSGMPY	EQAMTTRVLK
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
PLKLDHTWIN	VPKAEAAHYA	WGYRDGKAVR	VSPGMLDAQA	YGVKTNVQDM	ANWVMANMAP
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
ENVADASLKQ	GIALAQSRYW	RIGSMYQGLG	WEMLNWPVEA	NTVVEGSDSK	VALAPLPVAE
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
VNPPAPPVKA	SWVHKTGSTG	GFGSYVAFIP	EKQIGIVMLA	NTSYPNPARV	EAAYHILEAL

Q

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*, expresada en el código estándar de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae* es ampliamente conocida, de modo que es posible realizar la búsqueda en las bases de datos especializadas en proteómica para conocer las características de los péptidos obtenidos por la acción de la tripsina como proteasa de uso común, de tal manera que se conocen las posiciones de ruptura, la longitud, la secuencia de los péptidos obtenidos y la masa teórica correspondiente a cada uno de los péptidos de la enzima [26, 27].

Las características de los péptidos que se obtienen teóricamente de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae* a partir de la proteólisis con tripsina, se encuentra en la base de datos del Swiss Institute Bioinformatics, ExPASy Proteomics Server y se presenta a continuación en la tabla 2 [28].

A partir de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae* se obtienen teóricamente 27 péptidos trípticos de longitud y masa variable, los aminoácidos catalíticos Ser⁶⁴ y Lys⁶⁷ aparecen en el péptido número 4 que comprende los residuos de aminoácidos entre las posiciones 46 y 67, con una masa molecular teórica de 2300.637 Da, mientras que la Tyr¹⁵⁰, aparece en el péptido número 12 que comprende los residuos de aminoácidos entre las posiciones 149 y 177 con una masa molecular teórica de 3058.561 Da [28].

Tabla 2. Características de los péptidos obtenidos a partir de la digestión con tripsina de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*.

No	Posición del sitio de ruptura	Secuencia peptídica resultante	Longitud del péptido [aa]	Masa del péptido [Da]
1	6	TPVSEK	6	659.737
2	21	QLAEVVANTITPLMK	15	1627.960
3	45	AQSVPGMAVAVIYQGKPHYTFGK	24	2613.029
4	67	ADIAANKPVTTPQTLFELGSISK	22	2300.637
5	80	TFTGVLGGDAIAR	13	1277.443
6	91	GEISLDDAVTR	11	1175.261
7	99	YWPQLTGK	8	992.142
8	105	QWQGIR	6	786.889
9	133	MLDLATYTAGGLPLQVPDEVTDNASLLR	28	2974.376
10	143	FYQNWQPQWK	10	1424.581
11	148	PGTTR	5	530.582
12	177	LYANASIGLFGALAVKPSGMPYEQAMTTR	29	3058.561
13	183	VLKPLK	6	696.932
14	193	LDHTWINVPK	10	1222.409
15	204	AEEAHYAWGYR	11	1352.428
16	207	DGK	3	318.330
17	210	AVR	3	344.414
18	224	VSPGMLDAQAYGVK	14	1435.658
19	249	TNVQDMANWVMANMAPENVADASLK	25	2721.070
20	258	QGIALAQSR	9	943.071
21	261	YWR	3	523.592
22	290	IGSMYQGLGWEMLNWPVEANTVVEGSDSK	29	3198.569
23	309	VALAPLPVAEVNPPAPPVK	19	1879.273
24	315	ASWVHK	6	726.833
25	332	TGSTGGFGSYVAFIPEK	17	1717.896
26	349	QIGIVMLANTSYPNPAR	17	1845.147
27	361	VEAAYHILEALQ	12	1356.541

3.2.2.3. Cinética enzimática de la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*.

Las enzimas β -lactamasas son del tipo hidrolítico y catalizan la reacción de ruptura del anillo β -lactámico de la ampicilina para producir ácido penicilóico, en una reacción que sigue la cinética de saturación descrita por el modelo de Michaelis-Menten [29].

La reacción se inicia con la unión de la enzima β -lactamasa (**E**) con la ampicilina como sustrato (**S**) para formar un complejo no covalente β -lactamasa.ampicilina denominado complejo de Michaelis (**E.S**), en esta fase puede ocurrir la disociación del complejo o se puede dar la formación del complejo de acilación β -lactamasa-ampicilina (**E-S**) el cual es caracterizado por el enlace covalente entre el hidroxilo de la serina del sitio activo y el carbonilo β -lactámico de la ampicilina, la presencia de agua en el sitio activo promueve la desacilación del complejo covalente donde se libera como producto de reacción el ácido penicilóico (**P**) y la enzima se regenera, la secuencia de la catálisis hidrolítica en la cual la β -lactamasa inactiva al antibiótico ampicilina está representada en la ecuación de la figura 6 [16, 29].

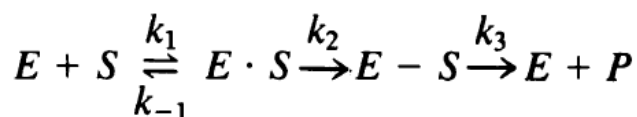


Figura 6. Ecuación de Michaelis-Menten que representa la secuencia de hidrólisis enzimática de los antibióticos β -lactámicos.

3.3. IMPACTO DE LA RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS MEDIADA POR BACTERIAS RESISTENTES.

En la actualidad el tratamiento eficaz de las enfermedades infecciosas constituye uno de principales retos en la quimioterapia antimicrobiana, desde el

descubrimiento de la penicilina en 1940 los avances en ciencia y tecnología farmacéutica han favorecido el desarrollo de antibióticos potentes, sin embargo la utilización de cada antibiótico ejerce una presión de selección que trae consigo la diseminación de microorganismos patógenos con la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia, este fenómeno sigue en aumento y continúa presentándose como un problema de salud pública en muchos países alrededor del mundo [11, 30-32].

En Colombia el panorama de enfermedades infecciosas es alarmante, los últimos reportes del programa de vigilancia epidemiológica SIVIGILA, del Instituto Nacional de Salud demuestran la alta prevalencia de las enfermedades infecciosas en la población infantil principalmente afectada por enfermedades respiratorias y gastrointestinales ocasionadas por microorganismos patógenos resistentes [33].

La resistencia mediada por β -lactamasas presenta un gran impacto en la complejidad del tratamiento de las enfermedades infecciosas en nuestro país, de acuerdo con el estudio publicado en el año 2004 por el Grupo de Estudio de Resistencia Nosocomial en Colombia del Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM), la prevalencia de enzimas β -lactamasas de amplio espectro (Extended-Spectrum Beta-Lactamases ESBL) provenientes de microorganismos Gram-negativos como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* es la principal causa de resistencia al tratamiento con aztreonam y cefalosporinas de tercera generación en los hospitales de las principales ciudades colombianas [34, 35].

De acuerdo con las estadísticas de resistencia reportadas por el Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO), una red constituida por 35 instituciones de salud de nuestro país, las cifras de resistencia en Colombia en cuanto a las cefalosporinas y demás fármacos β -lactámicos utilizados como primera elección en el tratamiento de infecciones continúan siendo alarmantes, por ejemplo en el año 2008 el porcentaje de resistencia de *Enterobacter cloacae*, frente a cefotaxima es de 39.9% y si consideramos las combinaciones

β -lactámico/inhibidor, se reporta un porcentaje de resistencia para piperacilina/tazobactam de un 25.5% y en el caso de ampicilina/sulbactam, el porcentaje de resistencia es del 64.1%, estos datos reflejan el impacto que tiene el fenómeno de resistencia en el tratamiento de enfermedades infecciosas y los costos para el sistema de salud en Colombia [36].

A nivel local también es preocupante la resistencia a los fármacos antimicrobianos, así lo demuestra la información publicada en 2009 por el Grupo para el estudio de resistencia a antibióticos en Medellín (Germen), donde se reporta que los aislamientos clínicos provenientes de *Enterobacter cloacae* presentaron el 33% de resistencia frente a cefotaxima y el 68% de esos aislamientos resultaron resistentes al antibiótico ampicilina/sulbactam, lo cual supone serias dificultades en cuanto al tratamiento de las enfermedades infecciosas en nuestro medio [37].

3.4. ESTRATEGIAS PARA ENFRENTAR LA RESISTENCIA MICROBIANA.

Teniendo en cuenta que la resistencia a los antimicrobianos es un problema mundial que requiere atención urgente, la Organización Mundial de la Salud dentro de su estrategia para contener la resistencia a los fármacos antimicrobianos ha establecido una serie de intervenciones encaminadas a disminuir la aparición y la propagación de microorganismos resistentes a través de la reducción de la propagación de la infección, mejora en el acceso y la utilización de antimicrobianos efectivos, fortalecimiento de los sistemas de vigilancia y control en las instituciones de salud, cumplimiento de la legislación relacionada con antibióticos y fomento del desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas [38].

Las evidencias del incremento en los niveles de resistencia a los antibióticos está relacionado con la disminución en el número de antibióticos efectivos, disponibles contra la diversidad de especies bacterianas y si a esto se le suma la reducción del número de compañías farmacéuticas que invierten en investigación y

desarrollo de nuevos agentes anti-infecciosos se puede considerar que la problemática que se plantea es realmente grave [39].

3.4.1. Desarrollo de inhibidores enzimáticos.

Una de las estrategias empleadas para enfrentar la resistencia microbiana frente a los antibióticos derivados de la penicilina ha sido el desarrollo de fármacos inhibidores de β -lactamasas que se administran en combinación con los antibióticos β -lactámicos para preservar su integridad estructural, conservando el mismo espectro de acción [40].

Desde 1980 se conocen varias formulaciones exitosas de antibiótico/inhibidor: amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam, las cuales son de amplia utilización en la práctica clínica puesto que al ejercer su efecto inhibitorio sobre las enzimas hidrolíticas permiten que el antibiótico β -lactámico llegue intacto a su blanco molecular e impida la biosíntesis de la pared celular bacteriana, sin embargo el surgimiento de microorganismos con la capacidad de producir β -lactamasas en gran proporción y con resistencia a inhibidores amenazan una vez más a este grupo de antibióticos [40].

A continuación se presentan las estructuras químicas de los inhibidores de β -lactamasas utilizados en la práctica clínica en formulaciones combinadas con los fármacos β -lactámicos de amplio espectro.

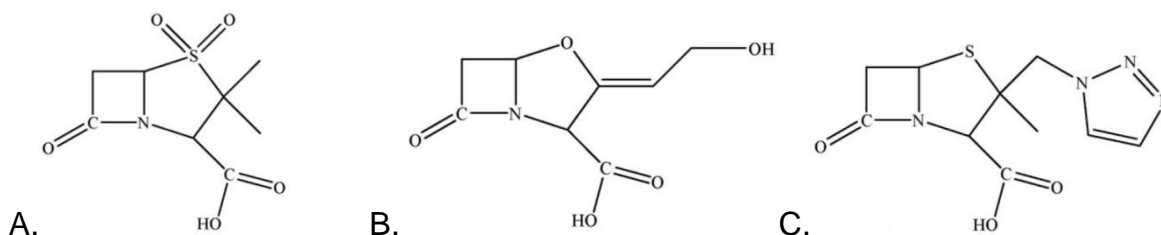


Figura 7. Estructuras químicas de los inhibidores de β -lactamasas. A. Ácido clavulánico, B. Sulbactam, C. Tazobactam.

La piperacilina es un antibiótico β -lactámico con un amplio espectro de actividad pero es susceptible a la hidrólisis por parte de las enzimas β -lactamasas, por esta razón y con el fin de proteger la integridad química y estructural del fármaco, se desarrolló el tazobactam, una sulfona del ácido penicilánico triazolimetilsustituída, la cual es utilizada en la práctica clínica en combinación con el antibiótico semisintético piperacilina como un potente inhibidor de un amplio rango de microorganismos productores de β -lactamasa, de origen cromosomal y plasmídica, incluyendo las β -lactamasas de espectro extendido ESBL (Extended Spectrum β -lactamase), esta capacidad de inactivación de las β -lactamasas por parte del tazobactam conduce a la formación de un complejo de acilación covalente y posterior transformación en el sitio activo de la enzima, los complejos de inhibición formados se han detectado mediante estudios de espectrometría de masas y esta información se han tomado como base para establecer el mecanismo de acción inhibitorio del compuesto [41, 42].

Estudios de espectroscopía ultravioleta y espectrometría de masas del tazobactam demuestran la formación de la imina como intermediario estable, que mediante reacciones de eliminación se convierte en acil-enamina, con una pérdida posterior del fragmento triazol, de modo que el aumento de peso molecular en el péptido principal del sitio activo, confirman el complejo covalente formado entre la enzima y el inhibidor, a continuación se presenta el mecanismo de inhibición propuesto del tazobactam sobre la enzima β -lactamasa [42].

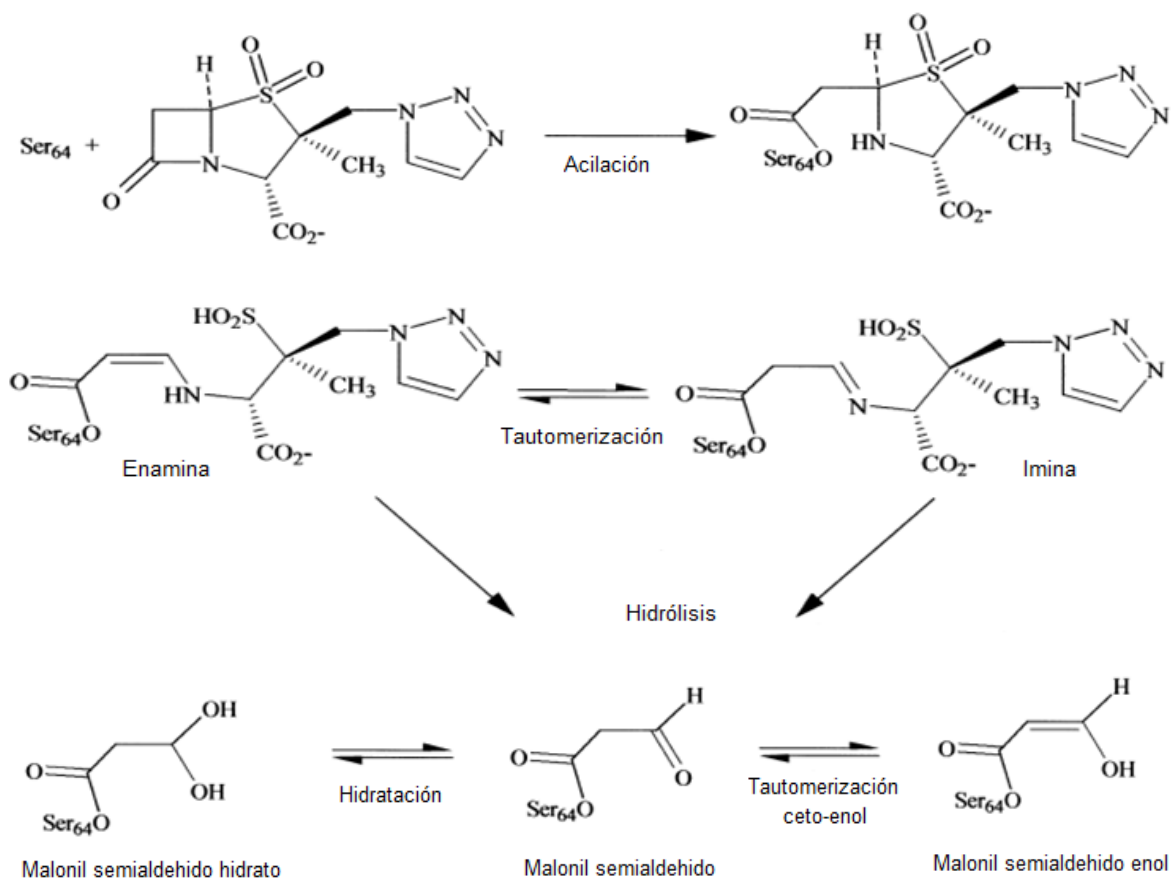


Figura 8. Mecanismo de acción reportado del tazobactam como inhibidor de β -lactamasa [42].

La reacción se inicia con el ataque nucleofílico al anillo β -lactámico por parte de la serina del sitio activo para la formación del complejo de acilación covalente, posteriormente se presenta la ruptura del anillo sulfona, el cual mediante re-arreglos moleculares genera el complejo imina y por tautomerización se forma el complejo enamina, finalmente mediante la reacción de hidrólisis se libera el complejo de inhibición irreversible, formado entre la enzima β -lactamasa y el malonil semialdehído que al hidratarse en el medio de reacción se convierte en malonilsemialdehído hidrato o espontáneamente se puede convertir en malonil semialdehído enol [42].

3.5. IMPORTANCIA DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y BÚSQUEDA DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS.

La espectrometría de masas (Mass spectrometry: MS) es una técnica analítica desarrollada desde hace más de 100 años, con la finalidad de obtener información estructural a partir del peso molecular de muchos compuestos, es una técnica reconocida por su sensibilidad, selectividad y corto tiempo de análisis. La espectrometría es la técnica instrumental más completa que se conoce actualmente y permite la identificación cualitativa y cuantitativa de compuestos sencillos y moléculas complejas, los límites de detección están en el orden del femtogramo (10^{-15} g) y los tiempos de análisis pueden ser extremadamente cortos. A pesar de estas ventajas solo hasta 1970 la espectrometría de masas empezó a aplicarse para el estudio de péptidos y proteínas [43].

Una de las aplicaciones de la espectrometría de masas en proteómica está relacionada con la determinación del peso molecular de péptidos y proteínas, esta aplicación constituye la base fundamental para la determinación del modo de acción de nuevos inhibidores enzimáticos.

3.5.1. Introducción a la espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que mide el peso molecular con base en el movimiento de partículas cargadas en un campo magnético, las moléculas de la muestra son convertidas en iones en fase gaseosa y la separación se basa en la relación masa/carga [44].

En la primera década del siglo XX, Joseph John Thompson (1856-1940), premio Nobel de Física en 1906, construyó el primer espectrómetro de masas, conocido como espectrógrafo de parábola, en el cual las cargas negativas se separaban por sus diferencias en la trayectoria parabólica dentro de un campo magnético en el

tubo de rayos catódicos y se detectaban a través del choque en una pantalla fluorescente [44].

Los espectrómetros de masas son instrumentos con la capacidad de producir y separar iones de acuerdo con la relación masa/carga (m/z), a partir de la generación de campos electromagnéticos en el equipo, estos campos separan los iones de acuerdo con su trayectoria, velocidad y dirección espacial, en condiciones de alto vacío para evitar la colisión entre los iones acelerados y las moléculas de aire. De este modo el espectro de masas resultante es la representación de la abundancia de los iones en función de la relación m/z , el cual mediante el procedimiento conocido como deconvolución de cargas permite deducir la masa molecular de los compuestos [43].

La fuente de ionización, el analizador, el detector, el procesador de datos y el sistema de vacío son los principales componentes del espectrómetro de masas, tal como se representa en la figura que aparece a continuación.

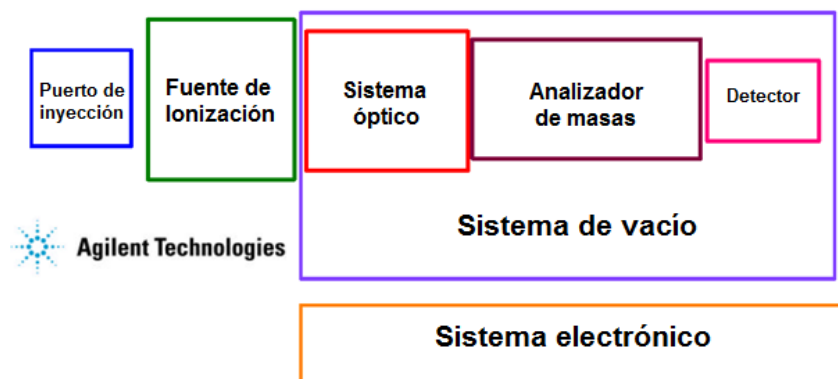


Figura 9. Representación esquemática de las partes principales del espectrómetro de masas.

Debido a los altos pesos moleculares y a la polaridad de los péptidos y proteínas, se requiere que en la fuente de ionización ocurra el proceso de desorción de los iones en fase gaseosa, las fuentes de ionización que producen iones de péptidos y proteínas de forma eficiente porque permiten la desorción son únicamente electrospray (ESI) y la técnica de ionización-desorción con laser asistida por matrices, conocida como MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) por sus siglas en inglés [43].

En cuanto a los analizadores de masas, encargados de separar los iones obtenidos en la fuente de ionización mediante la aplicación de diferentes campos electromagnéticos, los más utilizados por su facilidad de uso y bajo precio son el cuadrupolo, la trampa de iones y los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF: time of flight) [43].

3.5.2. Fuentes de ionización en espectrometría de masas aplicada al análisis de proteínas.

La ionización es el proceso mediante el cual se producen los iones en fase gaseosa a partir de las moléculas de la muestra esto ocurre en la fuente de ionización del espectrómetro de masas.

Haciendo un recorrido a través del desarrollo de las técnicas de ionización, se conoce que la técnica de desorción en plasma desarrollada por McFarlane y Torgerson en 1976 fue el primer ejemplo de ionización de grandes biomoléculas, posteriormente en 1981 el desarrollo de la técnica de bombardeo de átomos rápidos (FAB: fast atom bombardment), hizo posible la ionización y la detección de un amplio rango de biomoléculas [44].

En 1988 Karas y Hillenkamp desarrollaron el sistema de ionización MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, el cual permite la ionización de biomoléculas

con alta sensibilidad, y en la misma época Fen y colaboradores demostraron que el electrospray (ESI: electrospray ionization) es una técnica de alta sensibilidad que puede generar iones a partir de moléculas biológicas [44].

3.5.2.1. Electrospray como técnica de ionización de péptidos y proteínas a presión atmosférica.

La técnica del electrospray se define como una técnica de ionización suave donde la muestra es ionizada por la adición o remoción de un protón, estas condiciones son ideales para el análisis de proteínas y péptidos, los iones en este sistema se producen a presión atmosférica por aplicación de la muestra en forma líquida a través de un capilar que está bajo la influencia de un campo eléctrico, la representación esquemática del proceso de ionización se encuentra en la figura 10 [45].

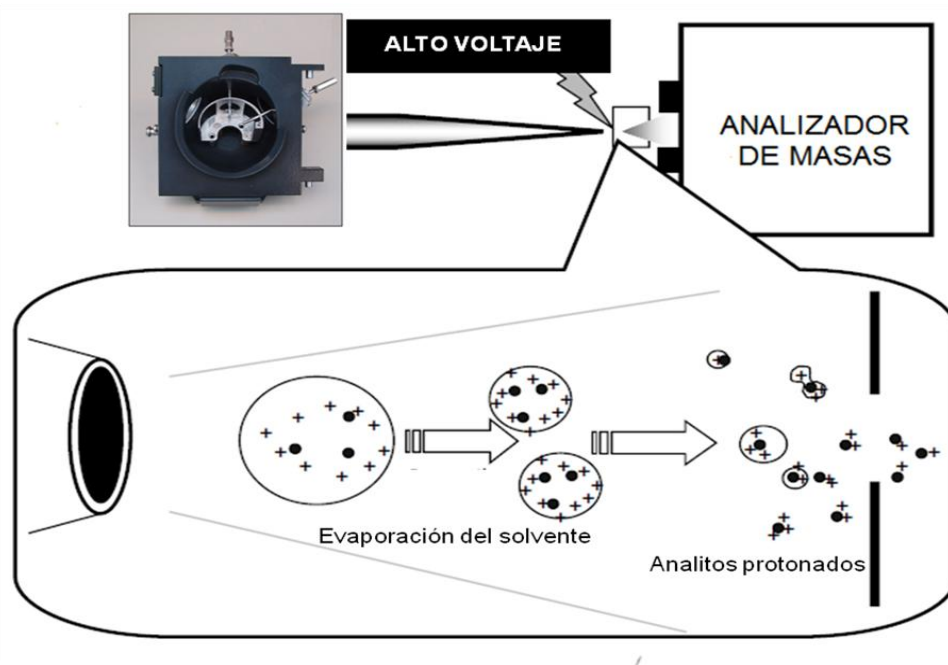


Figura 10. Representación esquemática de la formación de iones con electrospray [45].

La muestra se presenta en forma líquida a presión atmosférica y fluye a través de una aguja sometida a alto voltaje (1-6 kV), el solvente y la muestra son nebulizados mediante una corriente de gas. El flujo de las gotas es dirigido a través de un gas a alta temperatura, el solvente se evapora y la concentración de cargas en la superficie de las gotas aumenta y así se genera una mezcla de iones con multiplicidad de cargas [45].

3.5.2.2. MALDI como técnica de ionización de péptidos y proteínas a bajas presiones.

Esta técnica fue reportada en 1988 por Koichi Tanaka, Premio Nobel de Química en 2002 y fue desarrollada por Franz Hillenkamp y Michael Karas, científicos de la Universidad de Frankfurt [45].

La técnica MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) se basa en el bombardeo de las moléculas de muestra con un láser de nitrógeno pulsado a una longitud de onda de 337 nm para lograr la ionización. La muestra se mezcla previamente con una matriz absorbente que transforma la energía láser en energía de excitación. Esto conduce a que los iones del analito y los iones de la matriz se desprendan de la superficie, tal como se representa en la figura 11 [44, 45].

Esta técnica de ionización es ideal para compuestos orgánicos termolábiles, no volátiles y de alto peso molecular, como proteínas, péptidos, oligosacáridos y oligonucleótidos. Los analitos se integran en una matriz cristalina incorporada en un plato metálico, se coloca en el vacío donde las radiaciones láser inciden directamente sobre la matriz, causando excitación vibracional, de tal manera que las moléculas del analito son expulsadas de la matriz, la matriz se evapora y los analitos son liberados e ionizados, generalmente protonados con una única carga [45].

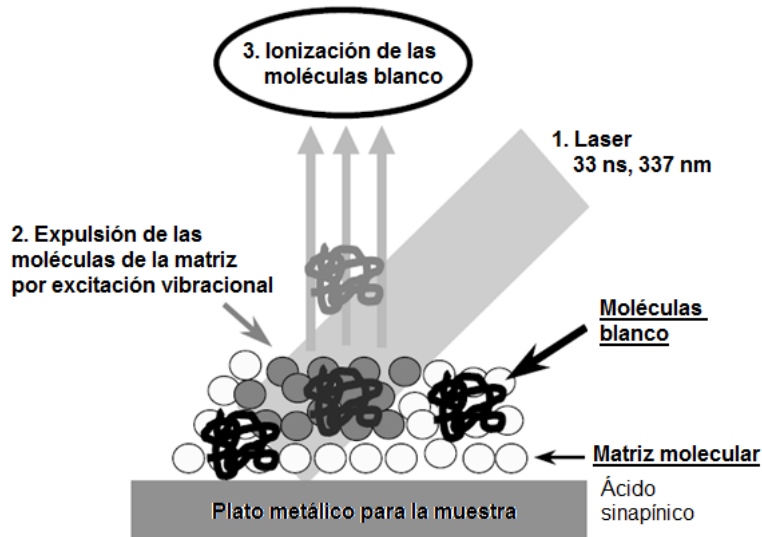


Figura 11. Representación esquemática de la formación de los iones mediante la técnica MALDI: matrix assisted laser desorption ionization.

3.5.3. Principales analizadores de masas utilizados en proteómica.

La separación de los iones en fase gaseosa en espectrometría de masas se hace a través de campos eléctricos y magnéticos en el analizador del equipo, entre los más utilizados para el análisis de péptidos y proteínas se encuentra el analizador de tiempo de vuelo, el cuadrupolo y la trampa de iones. A continuación se presenta una breve descripción de los principios de funcionamiento de cada uno de ellos [43].

3.5.3.1. Analizador de tiempo de vuelo (Time of Flight: TOF).

El analizador tiempo de vuelo es el más sencillo de los analizadores de masas, consiste en un tubo de vuelo en condiciones de alto vacío, que tiene la finalidad de medir los iones acelerados en un campo eléctrico que viajan a través del tubo de

vacío hacia el detector de iones. Todos los iones en la fuente presentan la misma cantidad de energía cinética y la velocidad está en función de la relación masa/carga. La representación esquemática del espectrómetro de masas con analizador tiempo de vuelo se presenta en la figura 12 [45].

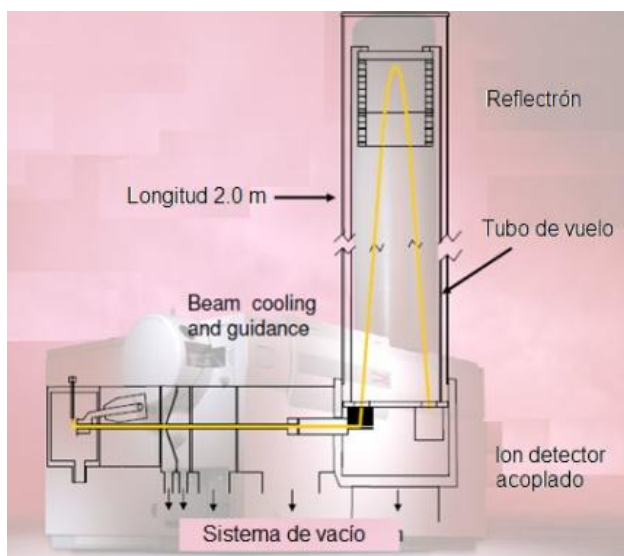


Figura 12. Espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo.

Los tubos de vuelo incluyen un dispositivo llamado reflectrón, el cual utiliza un campo eléctrico para revertir la vía de los iones que se aproximan al final del tubo de vuelo, de ésta manera los iones son enviados con una trayectoria ligeramente diferente de la inicial hasta un segundo detector y posteriormente se genera la señal en el espectrómetro de masas [45].

3.5.3.2. Analizador cuadrupolar.

El analizador cuadrupolar fue desarrollado por Wolfgang Paul, premio Nobel de física en 1989 y es un dispositivo que consiste en cuatro barras conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos, a los que se les aplica un voltaje

variable. Una pareja de barras opuestas tiene un potencial eléctrico positivo, mientras que el otro par tiene un potencial eléctrico negativo. Los iones oscilan mientras atraviesan el campo a lo largo del eje central de las varillas. De acuerdo con el voltaje, ciertos iones con una relación m/z determinada entran en resonancia y siguen una trayectoria estable desde el cuadrupolo al detector, los demás iones no se estabilizan y quedan por fuera del analizador de masas [45]. La representación esquemática del funcionamiento de este analizador de masas se encuentra a continuación en la figura 13.

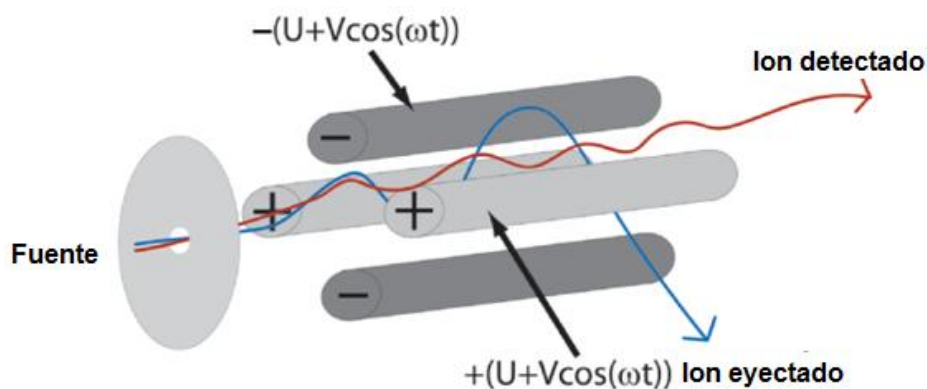


Figura 13. Representación esquemática del analizador cuadrupolar.

Al aplicar voltajes variables de corriente continua y radiofrecuencia a cada paralela, los iones de masas determinados pasan por el túnel siguiendo trayectorias oscilantes estables que los conducen al detector, mientras que los demás iones de diferentes masas se desvían. La variación de los voltajes enfoca sucesivamente las masas presentes y de ésta manera se obtiene el espectro de masas [43-45].

3.5.3.3. Analizador de trampa de iones.

La trampa de iones (Ion Trap: IT), es un dispositivo que puede almacenar y atrapar las moléculas de péptidos y proteínas cargadas a lo largo del tiempo, los iones son atrapados por potenciales eléctricos producidos por un electrodo en forma de anillo y dos electrodos de la capa externa o capa final, el espacio para la ionización es de 2-3 cm² y está lleno de gas inerte. A continuación en la figura 14 se encuentra la representación esquemática de la trampa de iones como analizador de masas [43-46].

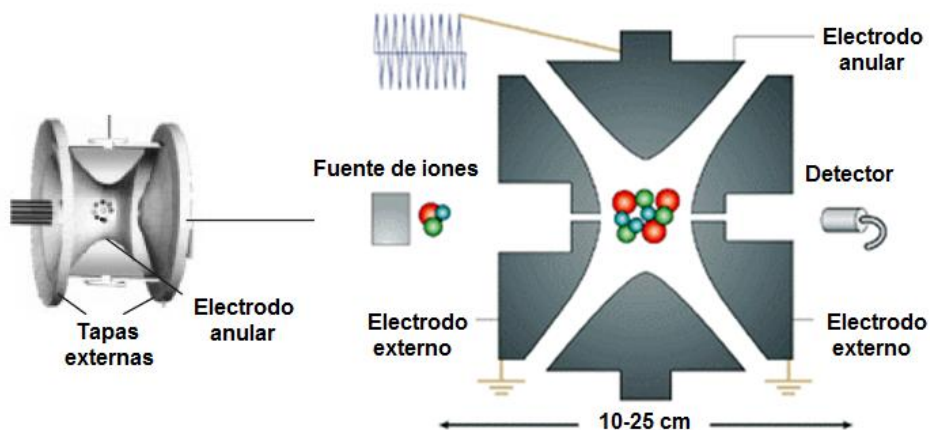


Figura 14. Representación esquemática del analizador de masas de trampa de iones.

Los diferentes iones entran en la trampa y permanecen atrapados en el electrodo de capa final y oscilan a frecuencias relacionadas con sus valores m/z , los cambios de voltaje hacen que los iones se exciten a su vez y son expulsados en el extremo opuesto del electrodo, llegan al detector y se genera el espectro de masas de las moléculas respectivas [43-46].

3.6. LAS CHALCONAS Y SU POTENCIAL COMO INHIBIDORES ENZIMÁTICOS.

Debido a que los crecientes niveles de resistencia mediada por β -lactamasas conducen a la disminución en el número de antibióticos efectivos disponibles y teniendo en cuenta que las compañías farmacéuticas no encuentran rentabilidad en el desarrollo de nuevos antibióticos, es imperativo trabajar en la investigación y desarrollo de nuevos inhibidores de β -lactamasas que puedan extender la vida útil de los fármacos β -lactámicos, que son el grupo de antibióticos más estudiado y más utilizado, en volumen y en ventas a nivel mundial [47].

Las chalconas presentan un núcleo químico estructuralmente diferente al núcleo de los β -lactámicos, esto puede considerarse como una ventaja puesto que los inhibidores de β -lactamasa conocidos presentan el mismo núcleo y se ha demostrado que esta característica puede inducir el fenómeno de resistencia cruzada manifestado por la producción de enzimas hidrolíticas con la capacidad de alterar la integridad estructural de este grupo de compuestos.

Con el propósito de conocer el modo de acción de las chalconas, que presentan un núcleo químico estructuralmente diferente a los β -lactámicos y el tipo de interacción con la enzima β -lactamasa, se realizaron los estudios correspondientes a la cinética de inhibición y la determinación de los complejos de inhibición mediante espectrometría de masas.

La espectrometría de masas permite comprobar la formación de un enlace covalente establecido entre el carbonilo de las chalconas con la serina catalítica del sitio activo de la enzima β -lactamasa, para originar la formación del complejo de inhibición β -lactamasa-chalcona. A través de la detección de los fragmentos peptídicos que aumentan la relación masa/carga debido a la acción del inhibidor es posible plantear el modo de acción en el que se fundamenta la actividad inhibitoria de las chalconas, este representa un aporte a la solución de la

problemática de resistencia generando nuevo conocimiento y proponiendo compuestos con potencial inhibitorio y modo de acción conocido que preservan la integridad estructural de los fármacos β -lactámicos de uso común.

3.6.1. Características generales de las chalconas como precursores de los flavonoides.

Los flavonoides son un amplio grupo de compuestos provenientes de plantas que presentan una estructura general de 15 átomos de carbono y su núcleo consiste en dos anillos de fenilo conectados por un puente de tres carbonos. Se conoce una gran variedad de compuestos de tipo flavonoide, los cuales están clasificados en subgrupos incluyendo las flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonoides, antocianinas y chalconas. Estas últimas difieren de todos los demás flavonoides por la ausencia de un tercer anillo, conocido como anillo C y son consideradas como una subclase de los flavonoides porque comparten la misma ruta biosintética, se forman por acción de la enzima chalcona sintasa (CHS) y en una reacción posterior de ciclización catalizada por la enzima chalcona isomerasa (CHI) dan origen a los flavonoides [48]. A continuación en la figura 15, se presenta la estructura del núcleo químico de las chalconas

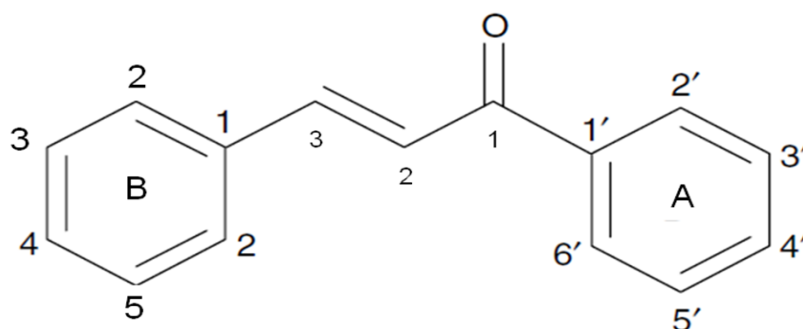


Figura 15. Núcleo químico de las chalconas 1,3- difenil-2-propen-1-ona [48].

Actualmente se ha identificado el gran potencial farmacológico de las chalconas como precursores de los flavonoides, que bien sea provenientes de fuentes vegetales o sintetizadas en el laboratorio han presentado una amplia gama de actividades farmacológicas, como en el caso de la licochalcona A, un producto natural aislado de las raíces de la planta *Glycyrrhiza inflata*, conocida como licoriza China y que ha presentado una potente actividad frente al parásito de la malaria, tanto en ensayos in vitro como in vivo [49]. Existen reportes en los que se demuestra el potencial antiinflamatorio de una serie de chalconas sintéticas que actúan al inhibir la liberación de los mediadores químicos de la respuesta inflamatoria, tales como neutrófilos, macrófagos, actúan sobre la producción del óxido nítrico y algunas de ellas intervienen sobre la respuesta inflamatoria actuando como inhibidores de la enzima ciclo-oxigenasa-2 [50, 51].

El amplio rango de actividad biológica de las chalconas depende del patrón de sustitución en los dos anillos aromáticos, se ha reportado que una serie de chalconas con posiciones hidroxiladas han demostrado actividad antimitótica frente a líneas celulares K 562 de leucemia humana y las chalconas con sustituyentes hidroxilo y metilo han demostrado actividad potente como antioxidantes [52].

Chalconas funcionalizadas con diferentes sustituyentes químicos han presentado actividad antimicrobiana frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* [53] y también se ha reportado la actividad inhibitoria de las chalconas sobre la glicoproteína P, mediadora de los mecanismos de multirresistencia a los fármacos en el organismo [54].

Las chalconas se pueden obtener en el laboratorio a partir de síntesis química, mediante la condensación de Claisen–Schmidt entre un compuesto de tipo acetofenona con el aldehído aromático adecuado, como en el caso de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona que es un compuesto de origen sintético con un grupo metilo donador de electrones en posición 4' del anillo B y dos sustituyentes metoxilo en posiciones orto (2) y meta (3) en el anillo A, los

cuales atraen electrones del anillo aromático, a partir de este compuesto se realizaron los estudios de cinética de inhibición y de espectrometría de masas sobre la enzima β -lactamasa con la finalidad de describir el modo de acción que explica la actividad inhibitoria, la estructura química del compuesto se representa en la figura 16.

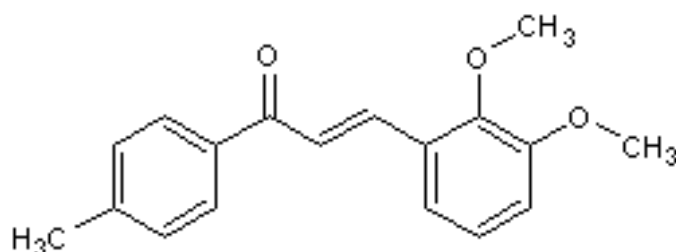


Figura 16. Estructura química de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.

3.6.2. Chalconas con potencial actividad inhibitoria de β -lactamasas.

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio con una serie de chalconas de origen sintético, han demostrado actividad inhibitoria sobre la enzima β -lactamasa, los resultados de los ensayos de cinética enzimática realizados sobre el blanco molecular y la evaluación de los compuestos frente a microorganismos patógenos productores de β -lactamasa evidencian el potencial inhibitorio de estos compuestos [55-57]. Una vez demostrado el efecto inhibitorio, es necesario conocer el modo de acción y las interacciones entre la chalcona y los aminoácidos catalíticos de β -lactamasa. La investigación en esta área está dirigida a la determinación del modo de inhibición de las chalconas mediante espectrometría de masas y conocer la interacción en el sitio activo de la enzima, mediante estudios teóricos de modelación molecular [56, 57].

4. OBJETIVOS

Con el propósito de conocer el modo de acción de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona y el tipo de interacción que establece con la enzima β -lactamasa, se propone realizar los estudios espectrofotométricos correspondientes a la cinética de inhibición, así como el seguimiento y la determinación de los complejos de inhibición mediante espectrometría de masas.

4.1. Objetivo General

Determinar el modo de acción de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor de la enzima β -lactamasa mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Realizar estudios de cinética enzimática con la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV, para determinar los parámetros catalíticos y el perfil de inhibición de la enzima.

4.2.2. Identificar el potencial inhibitorio de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona frente a la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV, mediante estudios espectrofotométricos de cinética enzimática.

4.2.3. Caracterizar la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV y los complejos de inhibición formados con tazobactam como inhibidor de referencia y con la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona

mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (ESI/IT/MS).

4.2.4. Caracterizar el producto de la proteólisis con tripsina de la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, y de los complejos de inhibición formados con tazobactam como inhibidor de referencia y con la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (ESI/IT/MS).

4.2.5. Plantear el modo de inhibición de la chalcona (2E)-3-(2,3-Dimetoxifenil)-1-(4-Metilfenil)-2- Propenona sobre la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV, de acuerdo con los resultados del análisis mediante espectrometría de masas y la optimización de la geometría y de los parámetros termodinámicos al nivel HF/6-31G.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1. Compuestos.

5.1.1. chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.

La chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, fue preparada en el laboratorio mediante la condensación de Claisen-Schmidt a partir de 1g de 1-(4-metil fenil) etanona (7.46 mmol) en medio alcalino: NaOH (0.29 g, 7.33 mmol) disuelto en agua (4 ml) y etanol (4 ml) con la adición de 1.24 g de 2,3-dimetoxibenzaldehído (7.46 mmol). La reacción permaneció en agitación durante 1 H a 25°C y se sometió a enfriamiento a 4°C durante 12 horas. El producto de la reacción es un sólido viscoso de color amarillo 3.13 g (79% de rendimiento), el

cual se purificó mediante cromatografía de columna. La elucidación estructural se realizó mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de infrarrojo. RMN¹H: (CDCl₃, TMS como referencia): 2.3 ppm (s, 3H), 3.7 ppm (s, 6H), 7.4 ppm (d, 1H), 7.9 ppm (d, 1H), 6.7-6.8 ppm (dd, 2H), 7.3 ppm (m, 3H), 7.8 ppm (d, 2H). RMN¹³C: 22.1 ppm (CH₃), 56.3 ppm (CH₃), 61.7 ppm (CH₃), 114.5 ppm (CH), 120.0 ppm (CH=), 125.8 ppm (CH=, aromático), 128.3-129.1 ppm (CH= aromático), 139.6 ppm (CH=). IR: λ_{\max} 1177 cm⁻¹ (CH₃), 1659 cm⁻¹ (C=O), 1600, 1471 cm⁻¹ (C=C aromático).

5.1.2. Antibióticos y reactivos.

El antibiótico ampicilina y el inhibidor de referencia tazobactam fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Saint Louis Mo), se disolvieron en solución buffer fosfato 0.1M pH 7.3, preparada a partir de agua destilada obtenida de un equipo Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) con dihidrogeno fosfato de potasio (KH₂PO₄) y fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄) grado analítico.

5.1.3. Enzima β -lactamasa.

Los estudios de actividad enzimática e inhibitoria del tazobactam y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, se realizaron con la enzima β -lactamasa clase C de *Enterobacter cloacae*, tipo IV obtenida de Sigma Aldrich (Saint Louis Mo). Penicilinas EC 3.5.2.6 de *Enterobacter cloacae*, que contiene 100 unidades en 510 mg del liofilizado con 56% de proteínas determinadas por el método de Biuret. 0.35 U/mg de proteína.

5.2. Determinación de los parámetros cinéticos.

La actividad catalítica de la enzima β -lactamasa (0.6 μ M) fue determinada mediante ensayos espectrofotométricos, utilizando ampicilina como sustrato en el rango entre 0.2 y 200 μ M a una longitud de onda de 235 nm. Los ensayos se llevaron a cabo en medio buffer fosfato 0.1 M, pH 7.3 a 37 °C. Los cambios en la absorbancia se monitorearon utilizando un espectrofotómetro Cary Bio 50 (Varian) termostatzado y equipado con control de temperatura. La tasa de hidrólisis y las constantes cinéticas se calcularon utilizando el software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, California USA).

5.2.1. Inhibición de β -Lactamasas y cuantificación de la inhibición.

Los estudios de inhibición se iniciaron con la incubación de la β -lactamasa (0.6 μ M) con la concentración respectiva de inhibidor (tazobactam y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor de prueba) en la celda de cuarzo durante 15 minutos a 37°C, posteriormente se adicionó ampicilina como sustrato en un rango entre 0.2 y 200 μ M en cada celda con un volumen final de 2.0 ml. Los cambios en la absorbancia se monitorearon utilizando un espectrofotómetro Cary Bio 50 (Varian) termostatzado y equipado con control de temperatura. Se comprobó la hidrólisis de la ampicilina sustrato al comparar con el control no inhibido.

5.3. Estudio de espectrometría de masas.

5.3.1. Preparación de muestras para espectrometría de masas.

Con el fin de realizar el análisis mediante espectrometría de masas de la enzima β -lactamasa, el tazobactam y la chalcona, se prepararon las soluciones

correspondientes en concentraciones de 10 μM en 3% de ácido acético en agua:acetonitrilo (1:1 v/v), partiendo de una solución de 100 μM en agua en el caso de la enzima β -lactamasa y el tazobactam y utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) en el caso de la chalcona.

5.3.1.1. Análisis de espectrometría de masas ESI/IT/MS.

Los espectros de masas de la enzima β -lactamasa, el tazobactam y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona se obtuvieron en un equipo Agilent LC-MSD SL 6300 con analizador de trampa de iones. Las condiciones de ESI/IT/MS fueron las siguientes: nitrógeno a 15 psi de presión como gas de nebulización y de secado con una tasa de flujo de 6 l/min y una temperatura de 100°C. El voltaje de la salida del capilar fue de 112.2 voltios, el voltaje del skimmer fue de 40 voltios, el voltaje del octopolo 1 fue de 12 voltios y el voltaje del octopolo 2 fue de 1.7 voltios. El análisis de la chalcona se realizó en el rango de masas entre 100 y 300 m/z , utilizando la fuente nano-electrospray modo positivo. El control del sistema y el análisis de datos por deconvolución de cargas se realizaron en el software de la estación de trabajo Agilent.

5.3.2. Preparación de los complejos β -lactamasa/inhibidor para espectrometría de masas.

Los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona se prepararon a la concentración de 13 μM en 0.1% de ácido acético y 0.1% de ácido fórmico en $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (1:1, v/v) [42].

5.3.2.1. Análisis de los complejos β -lactamasa/inhibidor mediante espectrometría de masas.

Para el análisis por espectrometría de masas de los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona se utilizó la fuente de ionización nano-electrospray en modo positivo, como analizador de masas se utilizó la trampa de iones Agilent Agilent LC-MSD SL 6300, el rango de masas establecido para el scan fue entre 200-2200 m/z , el voltaje de la salida del capilar fue de 200 voltios y el voltaje del skimmer fue de 75 voltios. Se utilizó Nitrógeno como gas de nebulización y secado a una tasa de flujo de 3 l/min y una temperatura de secado de 235°C, los espectros de masas fueron transformados por deconvolución de cargas utilizando el software de la estación de trabajo Agilent.

5.4. Análisis de β -lactamasa, β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

5.4.1. HPLC fase reversa y espectrometría de masas.

La purificación de los complejos de inhibición β -lactamasa/inhibidor se realizó en un cromatógrafo líquido modelo 1100 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con sistema de inyección automático, bomba cuaternaria, sistema de desgasificación, compartimento termostatzado para la columna, detector de arreglo de diodos, el equipo está conectado a un espectrómetro de masas de trampa de iones través de la interfase de electropray (ESI, modelo G1607A, Agilent Technologies), para la separación del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona se utilizó una columna Nano C-18 de fase reversa. Zorbax 300 SB-C18 (3.5 μ m - 150 mm x 75 μ m) DE46C01649.

5.4.2. Solventes para cromatografía líquida.

El agua desionizada fue obtenida de un equipo Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), el acetonitrilo grado HPLC se obtuvo comercialmente de Merck (Darmstadt, Germany), el ácido fórmico y el ácido trifluoroacético (TFA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las siguientes son las proporciones de los solventes utilizados: el solvente A se preparó con ácido trifluoroacético (TFA) 0.005% (v/v) y ácido fórmico 0.05% (v/v) en agua y el solvente B se preparó con ácido trifluoroacético (TFA) 0.005% (v/v) y ácido fórmico 0.05% (v/v) en acetonitrilo, para la cromatografía líquida se empleó un gradiente lineal de B de 2% hasta 70% durante 60 minutos [42].

5.4.3. Preparación de la muestra para el análisis de cromatografía líquida.

Los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona se prepararon a una concentración de 13 μ M en 0.1% de ácido acético y 0.1% de ácido fórmico en H₂O:ACN (1:1, v/v) [42].

5.4.4. Condiciones de espectrometría de masas.

Para el análisis por espectrometría de masas del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona se utilizó la fuente de ionización nano-electrospray en modo positivo, como analizador de masas se utilizó la trampa de iones Agilent LC-MSD SL 6300, el rango de masas establecido para el scan fue entre 200-2200 m/z , el voltaje de la salida del capilar fue de 200 voltios y el voltaje del skimmer fue de 75 voltios. Se utilizó Nitrógeno como gas de nebulización y secado a una tasa de flujo de 3 l/min y una temperatura de secado de 235°C, los espectros de masas fueron

transformados por deconvolución de cargas utilizando el software de la estación de trabajo Agilent.

5.5. Análisis de los péptidos tripticos de β -lactamasa, β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona.

5.5.1. Inactivación de β -lactamasa.

Se prepararon dos soluciones de 50 μ M de β -lactamasa (penicilinas EC 3.5.2.6 clase C de *Enterobacter cloacae*, tipo IV obtenida de Sigma Aldrich, Saint Louis Mo.) en agua desionizada, las cuales reaccionaron durante 60 minutos a 25 °C, de manera independiente y por separado con 5 mM de tazobactam disuelto en agua desionizada y 5 mM de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona disuelta en dimetilsulfóxido, en una relación molar de de 1:100 (β -lactamasa:inhibidor). El porcentaje de inhibición superior al 90% fue confirmado utilizando ampilina como sustrato a través del monitoreo de la disminución en la absorbancia a 235 nm, usando el espectrofotómetro Cary 50 Bio.

5.5.2. Proteólisis.

La digestión de la enzima β -lactamasa y de los complejos de inhibición β -lactamasa/inhibidor se realizó con tripsina proveniente de páncreas porcino, dimetilada grado proteómico obtenida de Sigma Aldrich (Saint Louis Mo), la mezcla de reacción se sometió posteriormente a procedimientos de reducción, alquilación y digestión.

5.5.2.1. Reducción y alquilación.

Se adicionaron 15 μ l de buffer de digestión (bicarbonato de amonio 50 mM) y 1.5 μ l de buffer de reducción (ditiotreitól 100 mM) en cada uno de los tubos de reacción de 0.5 ml, correspondientes a β -lactamasa, β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona, posteriormente se adicionó en el tubo 1, 10 μ l de la solución de proteína β -lactamasa (10 μ g/ μ L), en el tubo 2, 10 μ l de la solución de proteína β -lactamasa inhibida con chalcona en proporción (1:100) β -lactamasa/chalcona y en el tubo 3, 10 μ l de la solución de proteína β -lactamasa inhibida con tazobactam en proporción (1:100) β -lactamasa/tazobactam, cada uno de los tubos se llevó hasta un volumen final de 27 μ l con agua ultrapura. Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos, después del enfriamiento se adicionaron 3 μ l del buffer de alquilación en cada uno de los tubos de reacción (iodoacetamida 100 mM) y se incubaron en la oscuridad, a temperatura ambiente durante 20 minutos [58].

5.5.2.2. Digestión.

Se adicionó 1 μ l de tripsina (0.1 μ g/ μ l) a cada uno de los tubos de reacción y se incubaron a 37°C durante 3 horas, posteriormente se realizó una segunda adición de 1 μ l de tripsina (0.1 μ g/ μ l) a los tubos de reacción y se dejaron en incubación a 30°C durante toda la noche [58].

5.5.3. HPLC fase reversa.

Para la separación de los péptidos trípticos de la enzima β -lactamasa y de los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona se utilizó un cromatógrafo líquido modelo 1100 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con sistema de inyección automático, bomba cuaternaria,

sistema de desgasificación, compartimento termostaticado para la columna, detector de arreglo de diodos, el equipo está conectado a un espectrómetro de masas de trampa de iones través de la interfase de electrospray (ESI, modelo G1607A, Agilent Technologies). Los péptidos trípticos se separaron en una columna Nano. Zorbax 300 SB-C18 (3.5 μ m - 150 mm x 75 μ m) DE46C01649 C-18 fase reversa, con un gradiente lineal de B de 2% hasta 70% in 80 minutos. La tasa de flujo fue de 16 μ l/min. Las siguientes son las proporciones de los solventes utilizados: el solvente A se preparó con ácido trifluoroacético (TFA) 0.005% (v/v) y ácido fórmico 0.05% (v/v) en agua y el solvente B se preparó con ácido trifluoroacético (TFA) 0.005% (v/v) y ácido fórmico 0.05% (v/v) en acetonitrilo [42, 59].

5.5.4. Espectrometría de masas.

Los espectros de masas de los péptidos trípticos de β -lactamasa, β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona fueron obtenidos en un espectrómetro con un analizador de trampa de iones Agilent LC-MSD SL 6300. Las condiciones de ESI/IT/MS fueron las siguientes: nitrógeno a 15 psi de presión como gas de nebulización y de secado a un flujo de 3 l/min y una temperatura de 235°C. El voltaje de la salida del capilar fue de 200 voltios, el voltaje del skimmer fue de 75 voltios, el voltaje del octopolo 1 fue de 12 voltios y el voltaje del octopolo 2 fue de 2.5 voltios. El análisis de la proteína inhibida con la chalcona se realizó en el rango de masas extendido entre 200 y 4000 m/z y el análisis de los péptidos trípticos producto del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona se realizó en el rango normal entre 200 y 2200 m/z. Los experimentos se realizaron en el modo positivo, el control del sistema y el análisis de datos por deconvolución de cargas se realizó en el software de la estación de trabajo Agilent.

5.6. Estudio teórico de modelación molecular de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona.

Los residuos catalíticos y la conformación del sitio activo de la enzima β -lactamasa se obtuvieron de la base de datos Protein Data Bank PDB, código de acceso 1XX2. La optimización de la geometría de los complejos de inhibición enzimáticos y los parámetros termodinámicos de la reacción inhibitoria β -lactamasa/chalcona, se calcularon utilizando el método Hartree Fock y la base funcional 6-31G del programa Gaussian 98 [60].

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cinética enzimática de β -lactamasa.

Los estudios de actividad enzimática realizados en el laboratorio con la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, utilizando ampicilina como sustrato permitieron determinar las características cinéticas de la enzima frente a la ampicilina como antibiótico de referencia. La reacción de hidrólisis de ampicilina por acción de la β -lactamasa se caracteriza por el aumento de la velocidad catalítica de acuerdo con la concentración de sustrato, cuando se alcanza la concentración de 150 μM de ampicilina la velocidad catalítica alcanza su valor máximo de 4.45×10^{-4} $\mu\text{M}/\text{min}$, lo cual significa que la enzima tiene la capacidad de hidrolizar 4.45×10^{-4} micromoles por litro de ampicilina en un minuto, cuando se alcanza la velocidad máxima en la reacción. Todos los sitios activos de la enzima β -lactamasa se encuentran ocupados por moléculas de ampicilina y por lo tanto la enzima se encuentra en el nivel de mayor actividad catalítica, de modo que las concentraciones superiores de sustrato no alterarán la velocidad máxima de la reacción.

La afinidad entre la enzima y el sustrato determina la concentración de sustrato suficiente para lograr que la actividad catalítica alcance los valores máximos. De acuerdo con los estudios cinéticos realizados existe gran afinidad entre la enzima β -lactamasa y la ampicilina, puesto que se requiere una concentración relativamente baja de 21.35 μM de ampicilina para que la enzima realice su actividad catalítica a una tasa equivalente a la mitad de la velocidad máxima.

La concentración de ampicilina con la cual se alcanza la mitad del valor de la velocidad máxima se conoce como la constante de Michaelis o constante de afinidad (K_M), en los ensayos realizados experimentalmente la concentración de 21.35 μM de ampicilina permite alcanzar una velocidad catalítica de 2.22×10^{-4} $\mu\text{M}/\text{min}$ que es el valor correspondiente a la mitad de la velocidad máxima de la reacción, por lo tanto la concentración de 21.35 μM de ampicilina es la constante de afinidad de acuerdo con la actividad catalítica de la β -lactamasa.

Los datos de la cinética enzimática de β -lactamasa utilizando ampicilina como sustrato se presentan en la tabla 3, donde se relaciona la concentración de ampicilina (C Amp) con la velocidad catalítica (V) y su desviación estándar (SD), la representación gráfica de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten aparece a continuación en la figura 17.

Tabla 3. Resultados experimentales de la actividad catalítica de la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, utilizando ampicilina como sustrato.

C Amp (μM)	0.6	10.0	25.0	50.0
V \pm SD ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$1.4 \times 10^{-5} \pm 0.8 \times 10^{-5}$	$2.2 \times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-5}$	$1.8 \times 10^{-4} \pm 2.8 \times 10^{-5}$	$3.7 \times 10^{-4} \pm 2.1 \times 10^{-5}$
C Amp (μM)	75.0	100.0	150.0	200.0
V \pm SD ($\mu\text{M}/\text{min}$)	$3.8 \times 10^{-4} \pm 2.3 \times 10^{-5}$	$4.3 \times 10^{-4} \pm 1.4 \times 10^{-5}$	$4.3 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-5}$	$4.3 \times 10^{-4} \pm 3.3 \times 10^{-5}$

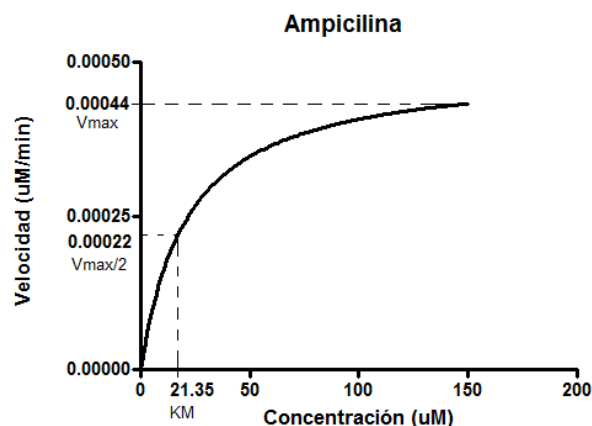


Figura 17. Gráfica de Michaelis-Menten donde se representa la actividad enzimática de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, en función de la concentración de ampicilina.

Los resultados experimentales de la cinética enzimática de la β -lactamasa con ampicilina como sustrato permitieron calcular otros parámetros cinéticos importantes como la constante catalítica (k_{cat}) que está relacionada con la cantidad de moléculas de sustrato que puede hidrolizar una molécula de enzima durante un minuto. Esta constante también se conoce como número de recambio y se relaciona con la constante de descomposición k_3 del complejo E-S en E+P, la cual se calcula a partir de la división del valor de la velocidad máxima entre la concentración total de enzima [29].

La constante catalítica (k_{cat}) de la reacción entre la enzima β -lactamasa con ampicilina como sustrato obtenida experimentalmente corresponde a 7.3×10^{-4} moléculas de ampicilina convertidas en ácido penicilóico por minuto por cada molécula de enzima, este valor de la constante catalítica se ve afectado en presencia de inhibidores enzimáticos como el tazobactam y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.

Otro de los parámetros cinéticos calculados es la constante de especificidad o eficiencia catalítica (k_A) correspondiente a $3.4 \times 10^{-5} \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ la cual equivale a la constante catalítica dividida entre la K_M y constituye el mejor parámetro cinético para comparar la disminución de la actividad catalítica en estudios de inhibición enzimática.

6.1.1. Actividad inhibitoria del tazobactam.

El tazobactam es el inhibidor de referencia utilizado en combinación con el antibiótico β -lactámico piperacilina, desde su introducción en la práctica clínica ha sido de gran utilidad en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos resistentes. El tazobactam es una sulfona del ácido penicilánico triazolil sustituida que se caracteriza por su habilidad para inactivar enzimas β -lactamasa de clase C, debido a la presencia del núcleo β -lactámico en su estructura química. La actividad inhibitoria del tazobactam es competitiva y en el proceso de inactivación se une a la β -lactamasa de forma irreversible.

Los resultados experimentales de la actividad inhibitoria del tazobactam demuestran que la velocidad máxima de catálisis enzimática es de $4.38 \times 10^{-4} \mu\text{M}/\text{min}$ la misma que se alcanza en la reacción de hidrólisis de la ampicilina, mientras que la constante de afinidad aparente (K_M') en presencia de este inhibidor corresponde a $89.38 \mu\text{M}$ de ampicilina. Este valor es cuatro veces mayor que la K_M de ampicilina, lo cual significa que el tazobactam como inhibidor competitivo presenta mayor afinidad con la enzima β -lactamasa, de modo que afecta la concentración de ampicilina para lograr la saturación sin alterar la velocidad máxima de la reacción catalítica.

A continuación en la tabla 4 se presentan las características cinéticas: velocidad máxima (V_{max}), constante de afinidad aparente (K_M'), constante catalítica (k_{cat}) y

eficiencia catalítica (k_A) de la β -lactamasa y de la β -lactamasa inhibida con tazobactam.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*.

Compuesto	V_{\max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_A ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Ampicilina	$4.41 \times 10^{-4} \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$21.35 \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$7.35 \times 10^{-4} \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$3.4 \times 10^{-5} \pm 5.4 \times 10^{-6}$
Tazobactam	$4.38 \times 10^{-4} \pm 3.5 \times 10^{-5}$	$89.38 \pm 3.5 \times 10^{-5}$	$7.30 \times 10^{-4} \pm 3.5 \times 10^{-5}$	$8.2 \times 10^{-6} \pm 3.5 \times 10^{-5}$

En los estudios de cinética de inhibición se evidencia la disminución de la eficiencia catalítica (k_A) hasta un valor de $8.2 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, el cual es cuatro veces menor en comparación con la eficiencia catalítica de la enzima no inhibida. Esto demuestra la disminución de la actividad catalítica de la β -lactamasa inhibida con tazobactam.

6.1.2. Actividad inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.

A partir de los resultados de cinética enzimática obtenidos utilizando la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor enzimático, los cuales se resumen en la tabla 5, es posible demostrar la inhibición competitiva de la chalcona, puesto que la enzima β -lactamasa mantiene la velocidad máxima de catálisis enzimática de $4.36 \times 10^{-4} \mu\text{M}/\text{min}$, mientras que la constante de afinidad aparente (K_M') aumenta hasta alcanzar un valor de $242.0 \mu\text{M}$, de tal manera que la inhibición competitiva por parte de la chalcona hace que la eficiencia catalítica en la hidrólisis de la ampicilina disminuya y alcance un valor once veces menor de $3.0 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ en comparación con la eficiencia catalítica de la enzima no inhibida.

El aumento en la K_M y la disminución de la eficiencia catalítica (k_A) influenciados por la acción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona demuestran que el complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona es el que presenta mayor afinidad de fijación en comparación con el tazobactam asegurando un valor muy bajo de eficiencia catalítica.

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos experimentalmente de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con la chalcona sintetizada.

Compuesto	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_A ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Ampicilina	$4.41 \times 10^{-4} \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$21.35 \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$7.3 \times 10^{-4} \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$3.4 \times 10^{-5} \pm 5.4 \times 10^{-6}$
Chalcona	$4.36 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-5}$	$242.0 \pm 1.2 \times 10^{-5}$	$7.3 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-5}$	$3.0 \times 10^{-6} \pm 1.2 \times 10^{-5}$

6.1.3. Representación lineal de las cinéticas de inhibición.

La transformación de los datos de concentración de sustrato y velocidad catalítica para obtener una línea recta se hace a partir de la gráfica de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk en la cual se logra determinar con exactitud el valor de V_{max} y es una representación que proporciona información valiosa acerca de la inhibición enzimática. Esta gráfica permite comparar los cambios que se presentan en cuanto a la afinidad por el sustrato y la velocidad de reacción, de tal manera que es posible clasificar el tipo de inhibición de los compuestos evaluados.

A continuación en la figura 18, se presenta la gráfica de Lineweaver-Burk correspondiente al estudio de inhibición de la β -lactamasa, en donde se evidencia la actividad del tazobactam como inhibidor competitivo y el potencial inhibitorio de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, debido a que la

velocidad catalítica de la enzima (4.41×10^{-4} uM/min) permanece constante en presencia de los inhibidores y se representa en el intercepto del eje Y de la gráfica en el valor de $2273(\text{uM} \cdot \text{min})^{-1}$ correspondiente a $1/V_{\text{max}}$, en el cual confluye la línea recta de la ampicilina como sustrato y las líneas rectas de los inhibidores evaluados, por su parte en el eje X los compuestos evaluados no convergen en un solo valor, lo cual indica que la constante de Michaelis (K_M) se modifica en presencia de los inhibidores, los valores $-1/K_M$ de cada uno de los compuestos evaluados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la inhibición de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* de acuerdo con los dobles recíprocos de la gráfica de Lineweaver-Burk.

Parámetro/compuesto	Ampicilina	Tazobactam	Chalcona
$K_M/V_{\text{max}} (\text{min}^{-1})$	$48522.73 \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$203136.36 \pm 3.5 \times 10^{-5}$	$550000 \pm 1.2 \times 10^{-5}$
$1/V_{\text{max}} (\text{uM} \cdot \text{min})^{-1}$	$2273 \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$2273 \pm 3.5 \times 10^{-5}$	$2273 \pm 1.2 \times 10^{-5}$
$-1/K_M (\text{uM}^{-1})$	$-0.047 \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$-0.0112 \pm 3.5 \times 10^{-5}$	$-0.0041 \pm 1.2 \times 10^{-5}$

Como resultado del análisis de varianza y el test de Tukey de múltiple comparación realizado con los datos de los dobles recíprocos de cada uno de los compuestos evaluados, se logró establecer con un valor $P < 0.05$ que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el intercepto en el eje Y de cada una de las rectas correspondientes a ampicilina, tazobactam y chalcona, lo cual es consecuente con la actividad inhibitoria de tipo competitivo, al no modificarse la velocidad máxima como en el caso del tazobactam y la chalcona sintetizada, aplicando el mismo análisis estadístico se logró determinar con un valor $P < 0.05$ que existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores $-1/K_M$ de cada uno de los compuestos evaluados entre sí, lo cual demuestra una vez más que los

complejos de inhibición formados son más estables debido a la mayor afinidad de la enzima β -lactamasa por el tazobactam y por la chalcona.

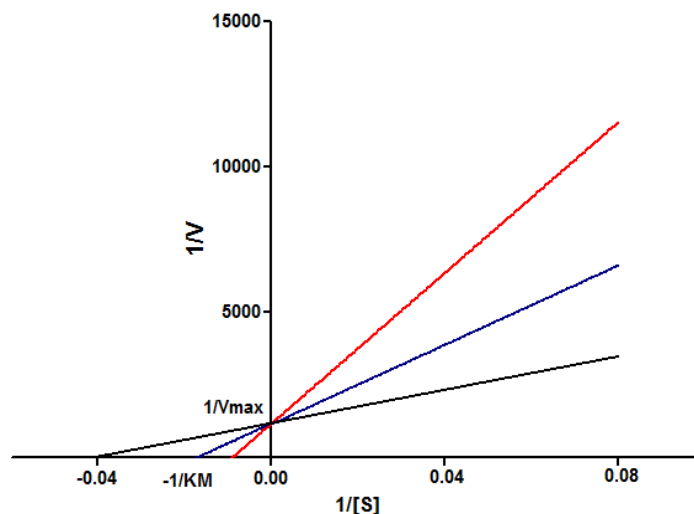


Figura 18. Gráfica de Lineweaver-Burk de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Ampicilina (línea negra), tazobactam como (línea azul) y chalcona (línea roja).

6.2. Espectrometría de masas ESI/IT/MS.

6.2.1. Liofilizado comercial de la enzima β -lactamasa.

Con la finalidad de conocer el peso molecular promedio en las condiciones experimentales de espectrometría de masas para el análisis del liofilizado comercial de enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV, se realizaron los estudios de ESI/MS, por infusión directa de todo el conjunto de las proteínas presentes. En la figura 19 se presenta el espectro transformado por deconvolución de cargas del liofilizado comercial de β -lactamasa, en el cual aparece el peso molecular promedio de 39923 Da.

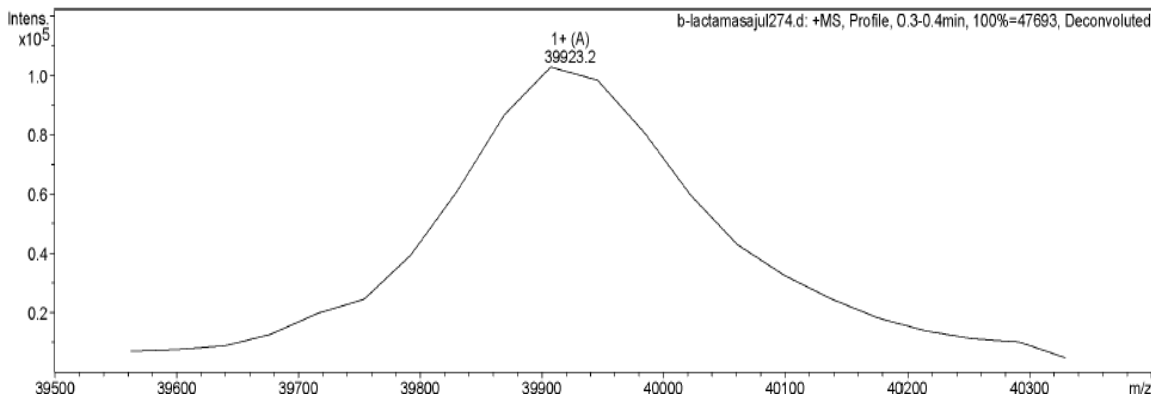


Figura 19. Espectro de masas del liofilizado comercial de la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, obtenido experimentalmente mediante ESI/IT/MS.

6.2.2. Tazobactam.

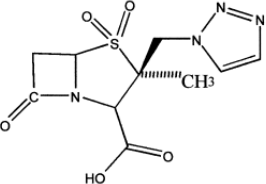
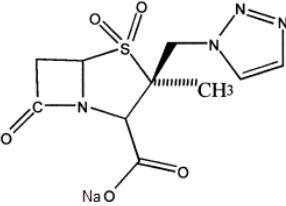
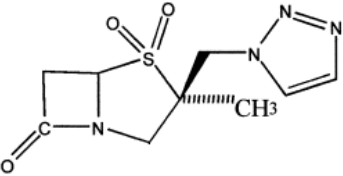
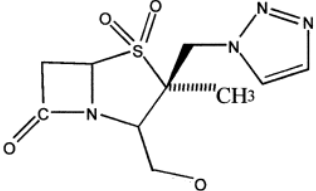
Se realizó el análisis del tazobactam como inhibidor de referencia mediante espectrometría de masas, con la finalidad de confirmar el peso molecular y detectar las posibles rupturas de algunos enlaces susceptibles del tazobactam, debido a las condiciones especiales en la fuente de ionización y en la trampa de iones.

En los espectros de masas obtenidos se representan las masas moleculares correspondientes al tazobactam como núcleo químico y el tazobactam como sal de sodio, las condiciones experimentales de acidez para favorecer la ionización de las moléculas y las diferencias de potencial en la trampa de iones pueden inducir la ruptura de algunos enlaces en el tazobactam, esto se ve reflejado en las masas moleculares obtenidas, donde se evidencia la pérdida del grupo carboxilato y la deshidroxilación del tazobactam.

A continuación, en la tabla 7 se presentan las estructuras químicas, los valores de relación masa/carga y los porcentajes de abundancia relativa relacionados con el

tazobactam y los productos de descarboxilación y deshidroxilación formados en las condiciones de espectrometría de masas.

Tabla 7. Análisis del tazobactam mediante espectrometría de masas.

Estructura molecular	Descripción	Relación masa/carga	% Abundancia Relativa
	Tazobactam Inhibidor de referencia 300 Da	305.0 [M + H]	100.00%
	Tazobactam en forma de sal sodio 322 Da	321.3 [M + H]	59.38%
	Descarboxilación del Tazobactam 256 Da	256.0 [M + H]	37.03%
	Deshidroxilación del Tazobactam 283 Da	283.8 [M + H]	13.47%

En el análisis de espectrometría de masas del tazobactam el ión molecular con abundancia relativa de 100% es el de 305.0 [M + H], el cual corresponde al peso molecular del tazobactam. El núcleo químico del tazobactam corresponde a una masa molecular de 300 Da y debido a la fuente de ionización electrospray en

modo positivo aparece como una especie protonada, el espectro de masas se presenta a continuación en la figura 20.

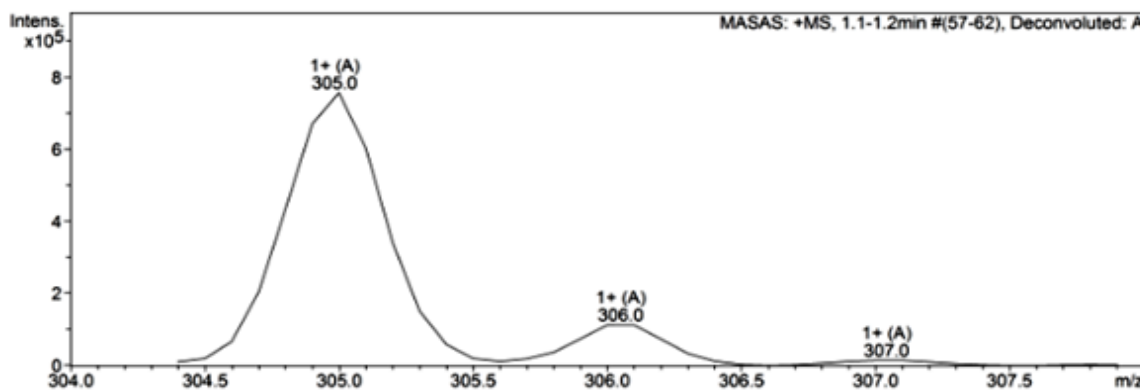


Figura 20. Espectro de masas del ión molecular 305.0 $[M + 1H]^{1+}$, que corresponde al peso molecular del tazobactam.

Continuando con el orden de abundancia relativa de los iones en el análisis del tazobactam, se encuentra el ión 321.3 $[M + H]$ con un 59.38%, el cual representa al compuesto en su forma de sal, el espectro de masas se representa a continuación en la figura 21.

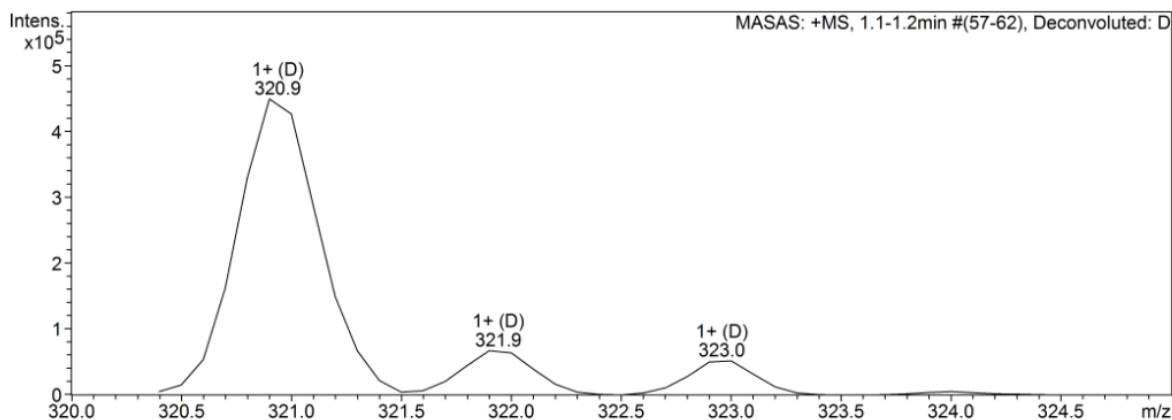


Figura 21. Espectro de masas del ión 321.3 $[M + H]$, que corresponde al peso molecular del tazobactam de sodio.

A nivel de la estructura química, el tazobactam presenta grupos funcionales susceptibles de ruptura y fragmentación en las condiciones experimentales de espectrometría de masas, es el caso del producto de la descarboxilación del compuesto, el cual se detectó a partir del análisis del ión 256 [M +H] con un porcentaje de abundancia relativa de 37.03%, el cual se presenta en siguiente espectro de masas de la figura 22.

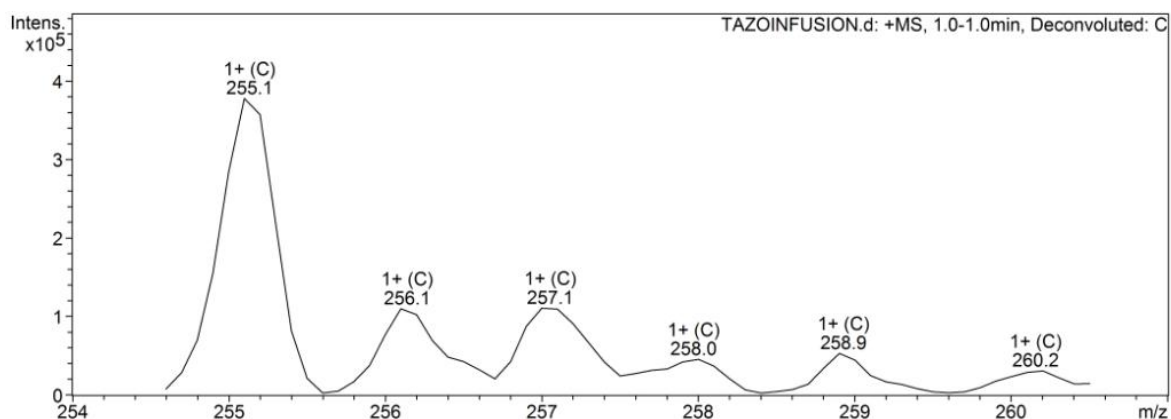


Figura 22. Espectro de masas del ión 256.1 [M +H] producto de la descarboxilación del tazobactam en las condiciones de espectrometría de masas.

Otro de los grupos funcionales del tazobactam que es susceptible a la ruptura en las condiciones de espectrometría de masas es el grupo hidroxilo del tazobactam, el cual se detectó con un menor porcentaje de abundancia relativa (13.47%), la pérdida de este grupo funcional se evidenció al detectar el ión 283.8 [M +H] representado a continuación en el espectro de masas de la figura 23.

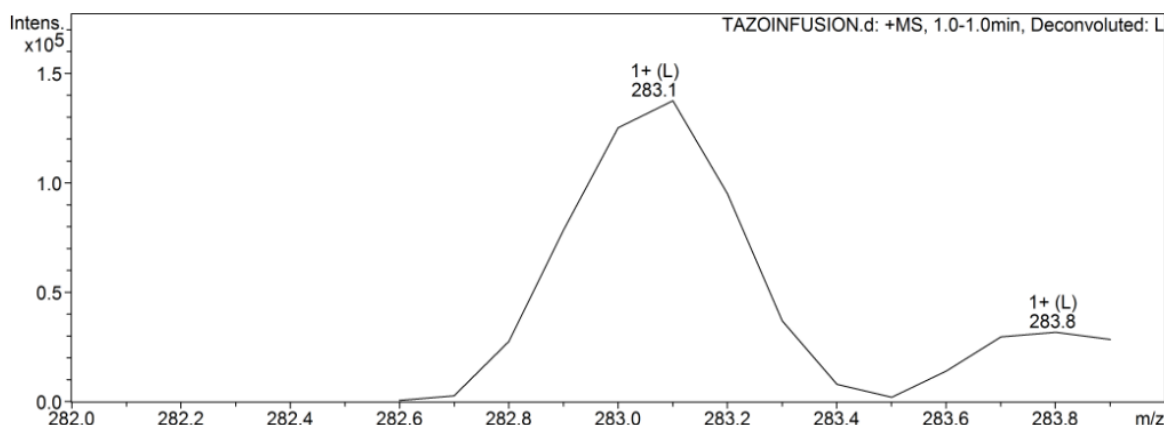


Figura 23. Espectro de masas del ión 283.8 [M +H] producto de la deshidroxilación del tazobactam en las condiciones de espectrometría de masas.

Como se analizará en las siguientes secciones de este capítulo, la información de espectrometría de masas por infusión directa del tazobactam es básica para establecer comparaciones y detectar posteriormente los aumentos en el peso molecular de β -lactamasa, debido a la unión covalente con este inhibidor enzimático y los productos de descarboxilación y deshidroxilación en la formación del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam.

6.2.3. Chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.

En el análisis de espectrometría de masas de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona el ión molecular con abundancia relativa de 100% es el de 282.9 [M + H], el cual corresponde al peso molecular de la chalcona sintetizada, el espectro de masas se presenta a continuación en la figura 24.

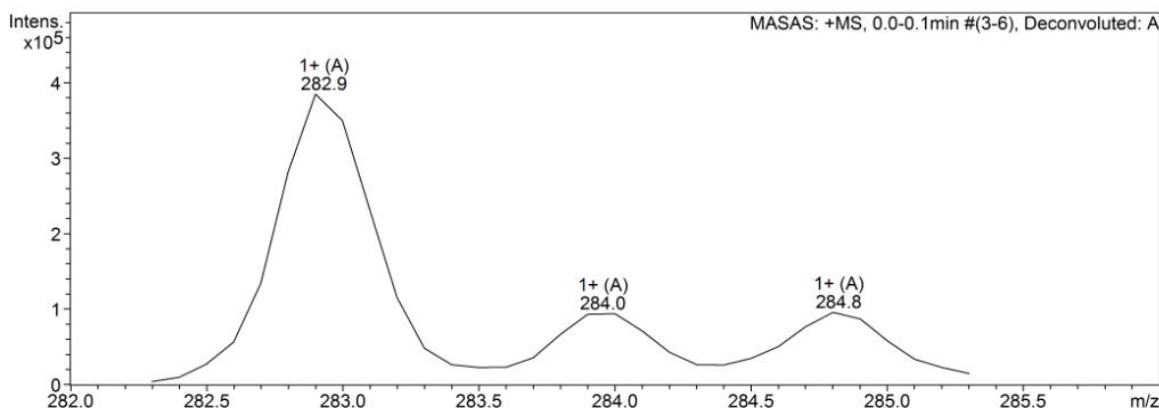


Figura 24. Espectro de masas del ión molecular 282.9 [M + H] correspondiente al peso molecular de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.

Debido a la poca solubilidad de la chalcona en el medio acuso es necesario utilizar DMSO para preparar la solución inicial de 100 μ M y posteriormente diluir en el medio ácido antes de realizar el análisis de espectrometría de masas, estas condiciones favorecen la formación de aductos entre la chalcona y el DMSO. La unión de la chalcona de 282 Da con el DMSO de 78 Da produce la formación de un aducto de 360 Da, el cual se evidenció mediante espectrometría de masas a partir del ión molecular 180.8 [M + 2H]²⁺ con un porcentaje de abundancia relativa de 18.37%, a continuación en la figura 25 se presenta el espectro de masas del aducto formado entre la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona y el dimetilsulfóxido. Es muy importante tener en cuenta la posibilidad de formación de aductos con la chalcona para identificarlos posteriormente en los espectros de masas de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona.

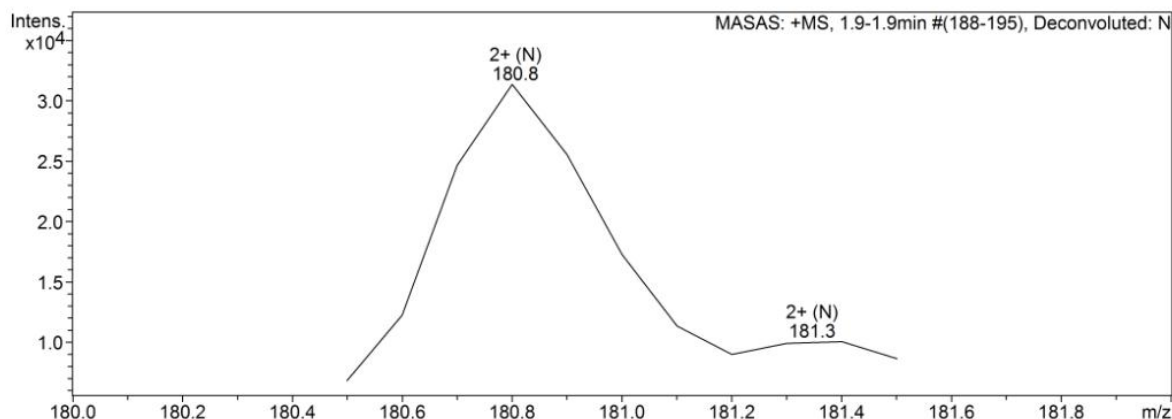


Figura 25. Espectro de masas del ión molecular 180.8 $[M + 2H]^{2+}$ correspondiente al peso molecular de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona y el aducto formado con dimetilsulfóxido.

6.3. Análisis de β -lactamasa y sus complejos de inhibición mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.

En el liofilizado comercial se encuentra la enzima β -lactamasa en un 56%, la separación cromatográfica acoplada a espectrometría de masas permitió detectar la presencia de otras proteínas de mayor y de menor peso molecular, esta información es fundamental para continuar con el análisis de los complejos de inhibición formados, tanto con el inhibidor de referencia como con la chalcona como inhibidor de prueba.

6.3.1. Análisis de β -lactamasa mediante cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas ESI/IT/MS.

El cromatograma de iones totales de la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, revela que en la muestra del liofilizado comercial de la enzima se

presentan múltiples compuestos que son detectados en los diferentes tiempos de retención, las masas de mayor abundancia relativa aparecen entre los 8 y 10 minutos iniciales del corrido cromatográfico, y el rango de masas correspondiente en unidades de masa/carga está entre 20.000 y 40.000 unidades.

A continuación se presenta el cromatograma de iones totales de la enzima β -lactamasa, donde aparecen las diferentes señales correspondientes a las proteínas que hacen parte del liofilizado obtenido comercialmente.

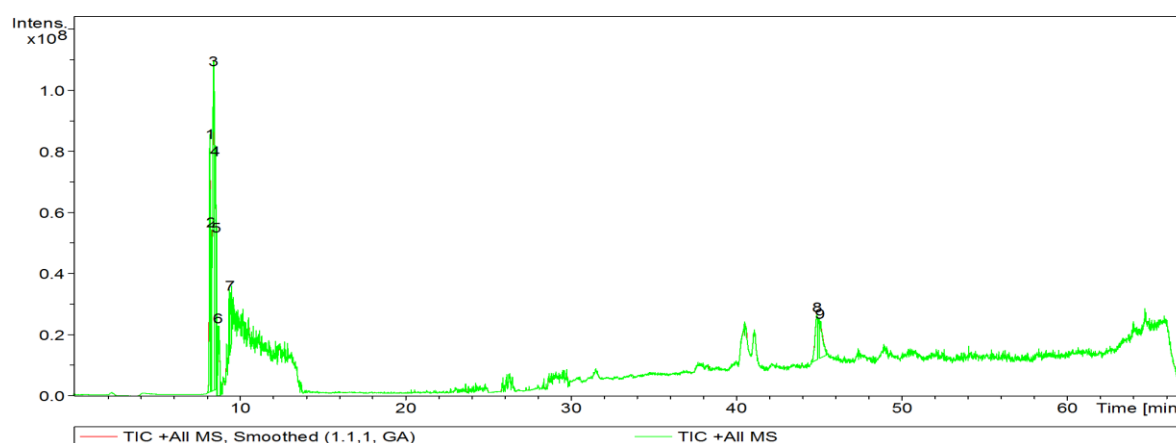


Figura 26. Cromatograma de iones totales de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*.

Los tiempos de retención de cada uno de los compuestos, las masas de mayor abundancia relativa y el promedio de masas de cada uno de los picos enumerados en el cromatograma de la figura 26, correspondiente a la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV. Sigma se describen a continuación en la tabla 8.

A partir de este cromatograma y utilizando las aplicaciones de la estación de trabajo Agilent, se realizó la deconvolución de cargas de los espectros de masas obtenidos para conocer la masa y la carga de cada uno de los iones y de esta manera calcular el peso molecular total de la enzima β -lactamasa.

Tabla 8. Características de las masas obtenidas a partir de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*.

Lista de compuestos del cromatograma	Tiempo de retención (min)	Masas de mayor abundancia relativa (m/z)	Promedio de masas (m/z)
1	8.2	40046.0	33807.6
2	8.3	45917.2	33101.2
3	8.4	54884.5	54829.2
4	8.5	36922.3	36885.7
5	8.6	11973.6	29974.0
6	8.7	69853.0	30690.9
7	9.4	23324.0	27500.9
8	44.8	4546.3	15457.2

Después de realizar la separación mediante cromatografía líquida, el espectro de masas correspondiente a la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, se presenta en la figura 27, donde a los 8.2 minutos después de iniciarse el corrido cromatográfico, se observa el ion de mayor intensidad de 853 $[M + 47H]^{47+}$, el cual representa una masa isotópica de 40096 Da, valor que es muy aproximado al que se ha reportado para este tipo de enzimas producidas por *Enterobacter cloacae*. De la misma manera, en el espectro de masas aparecen otras señales que corresponden a proteínas de bajo peso molecular o fragmentos proteicos detectados como iones de menor abundancia relativa en el espectrómetro de masas.

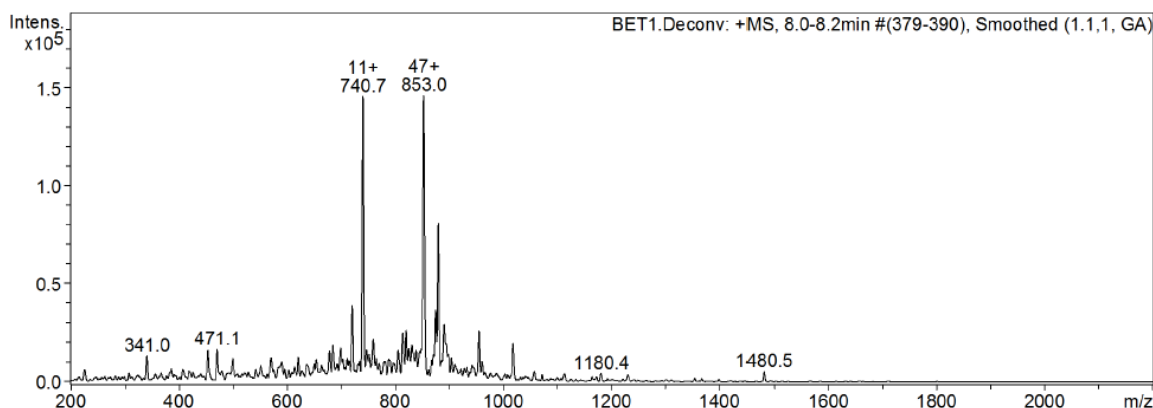


Figura 27. Espectro de masas del compuesto de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* no inhibida.

6.3.2. Análisis del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.

En el cromatograma de iones totales del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam se conservan aproximadamente los mismos tiempos de retención en comparación con el cromatograma de la β -lactamasa no inhibida, la diferencia es que se presenta mayor intensidad en cada una de las señales.

De acuerdo con la separación cromatográfica del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam que se presenta en la figura 28 se seleccionaron las señales que presentaron coincidencia en el rango de los tiempos de retención observados en el análisis de β -lactamasa no inhibida, para establecer comparaciones con los aumentos en el peso molecular debidos a la unión con el inhibidor.

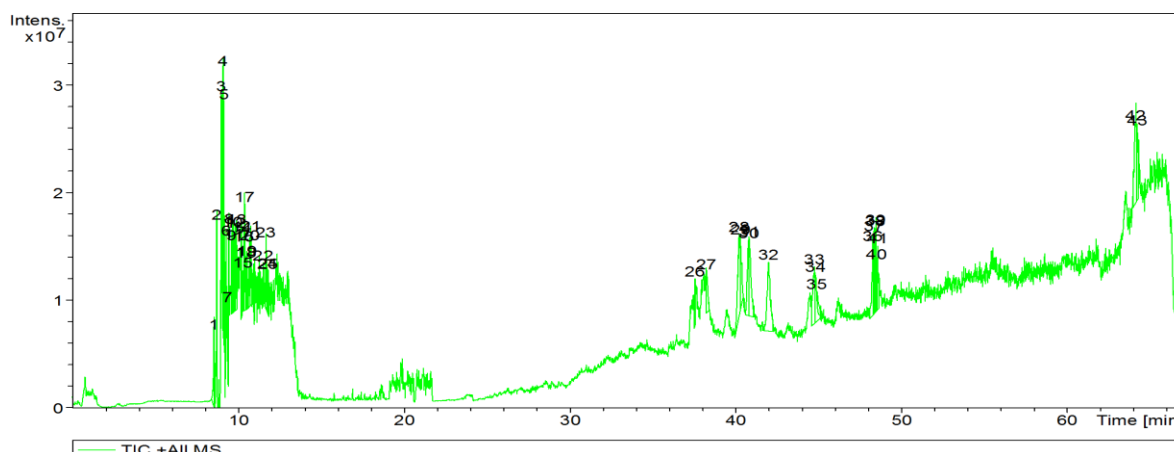


Figura 28. Cromatograma de iones totales de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* inhibida con tazobactam en una relación molar de 1:100 (β -lactamasa: inhibidor).

De acuerdo con los resultados experimentales que se resumen en la tabla 9, en un tiempo de retención de 8.4 minutos es posible separar el complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam correspondiente a un aumento de 106 Da en la masa molecular de la enzima, el cual se explica por la unión covalente que se establece entre la β -lactamasa y el tazobactam, y de acuerdo con las modificaciones posteriores que ocurren en el sitio activo de la enzima, se forma el malonil semialdehído hidrato, el cual representa un aumento de 88 Da. La formación posterior del aducto con agua en condiciones experimentales genera un aumento adicional de 18 D, dando como resultado la formación del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam de 40152.7 Da detectado por espectrometría de masas y representado en la figura 29 [42].

En los siguientes tiempos de retención del proceso cromatográfico se logró la separación de otras proteínas con diferentes pesos moleculares, a los 8.6 minutos la masa de mayor abundancia relativa en unidades de masa/carga es de 24532.2, a los 9.4 minutos es de 56794.5 y a los 44.8 minutos la masa de mayor abundancia relativa es de 29124.0.

Tabla 9. Características de las masas obtenidas a partir de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con tazobactam en relación molar 1:100.

Tiempo retención (min)	Promedio masas (m/z)	Masas de mayor abundancia relativa (m/z)	Incremento en las masas ¹ (Da)
8.4	30549.8	40152.7	106
8.6	37264.1	24532.2	--
9.4	26467.4	56794.5	--
44.8	15023.6	29124.0	--

¹ El incremento en las masas es con relación al peso molecular de la β -lactamasa obtenido experimentalmente, correspondiente a 40046 Da.

A continuación en el espectro de masas de la figura 29 se representa conjunto de iones generados en el complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam donde se puede observar el ion 648.5 [M + 62H]⁶²⁺, con una masa isotópica de 40207.0 Da, el cual corresponde a la masa molecular del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam en su forma de malonil semialdehido hidrato con la formación de un aducto con agua.

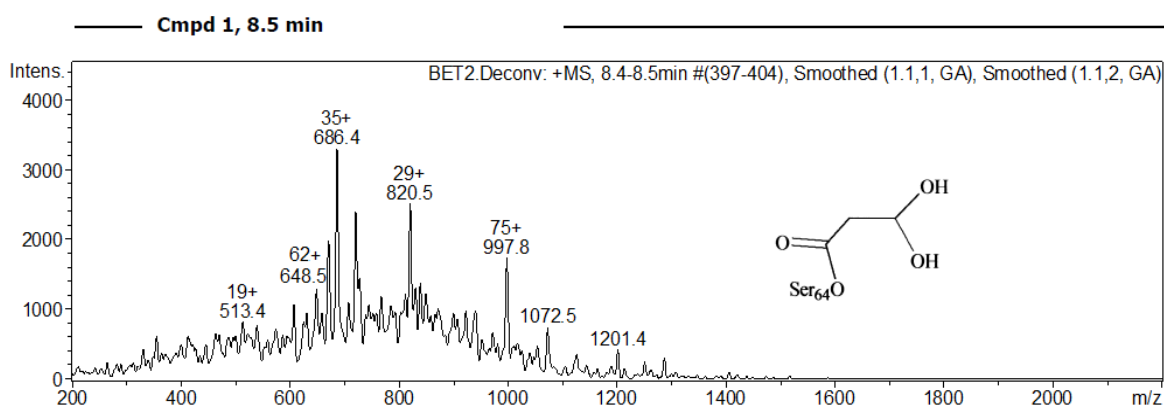


Figura 29. Espectro de masas de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* inhibida con tazobactam en su forma de malonil semialdehido hidrato.

6.3.3. Análisis del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.

En las mismas condiciones experimentales de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, se realizó el análisis para conocer el aumento en el peso molecular total de la enzima β -lactamasa, debido a la unión covalente con la chalcona sintetizada.

En el cromatograma de iones totales de la figura 30, correspondiente al complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona, es posible evidenciar un leve aumento en los tiempos de retención en comparación con la enzima no inhibida, se detectó el incremento en el peso molecular de la enzima originado por la formación de un complejo covalente con la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona en aducto con el DMSO utilizado para solubilizar el compuesto.

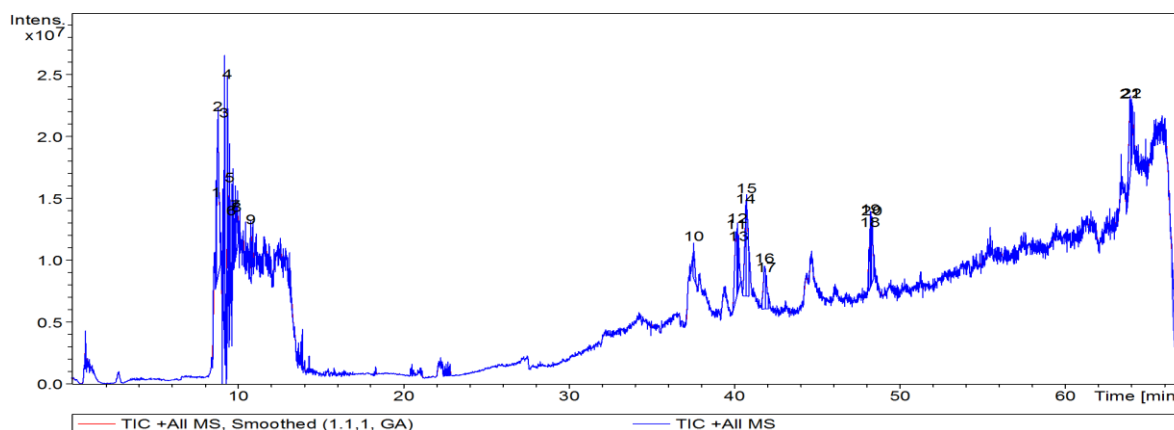


Figura 30. Cromatograma de iones totales de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con chalcona en una relación molar de 1:100 (β -lactamasa: inhibidor).

Tal como se resume en la tabla 10, transcurridos los primeros 9.8 minutos del corrido cromatográfico se detectó en el espectro de masas un incremento de 360 Da debido a la formación del complejo de inhibición de la β -lactamasa de 40046.0

Da y la chalcona de 282 Da en aducto con el DMSO utilizado para solubilizar el compuesto, dando como resultado final una masa molecular de 40406 Da, correspondiente al complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona.

Tabla 10. Características de las masas obtenidas a partir de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con la chalcona sintetizada en proporciones molares de 1:100 (β -lactamasa: inhibidor).

Lista de compuestos	Tiempo de retención	Promedio de masas (m/z)	Masas de mayor abundancia relativa (m/z)	Incremento en las masas ¹ (Da)
1	8.6	41026.3	42530.3	
7	9.8	29144.9	40406.4	360
18	48.2	23203.1	4060.8	

¹ El incremento en la masa es de acuerdo al peso molecular de la β -lactamasa: 40046 Da.

El complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona se identificó mediante el ion 841.8 $[M + 48H]^{48+}$, que representa una masa isotópica de 40392.7 Da correspondiente al complejo de inhibición formado entre la β -lactamasa y la chalcona en aducto con el DMSO. En la figura 31 aparece el espectro de masas con el perfil masa/carga del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona, el espectro se observa la intensidad de los iones y el complejo de inhibición formado.

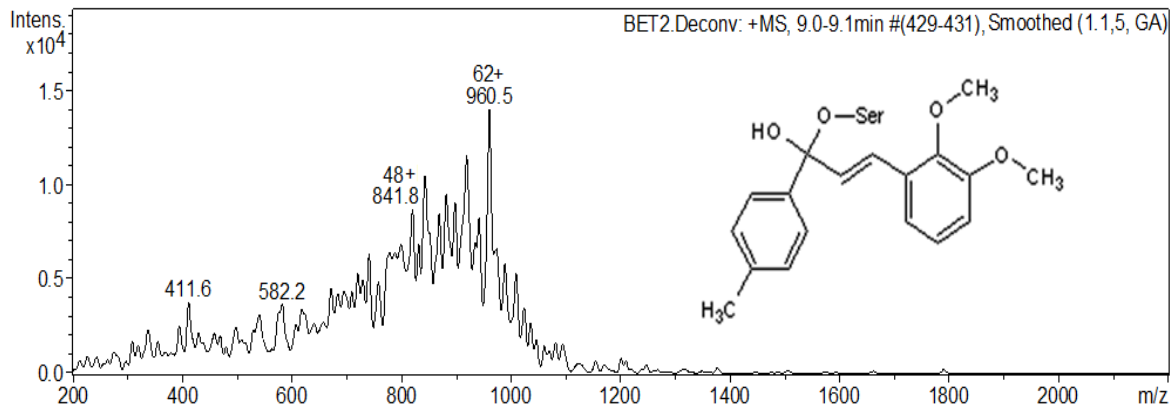


Figura 31. Espectro de masas del complejo de inhibición β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con la chalcona.

6.4. Análisis de los péptidos trípticos de la enzima β -lactamasa y sus complejos de inhibición mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.

Se realizó la separación cromatográfica y el análisis mediante espectrometría de masas de los péptidos obtenidos a partir de la digestión tríptica de la enzima β -lactamasa y previa inhibición por separado con el tazobactam y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, se aplicó el mismo procedimiento experimental con el fin de detectar el péptido que contiene los aminoácidos catalíticos de la enzima y sus posibles uniones covalentes con los inhibidores evaluados.

6.4.1. Análisis de los péptidos trípticos de la enzima β -lactamasa mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.

El siguiente es el cromatograma de iones totales de la enzima β -lactamasa digerida con tripsina en el cual aparece la separación de los péptidos trípticos obtenidos y sus tiempos de retención.

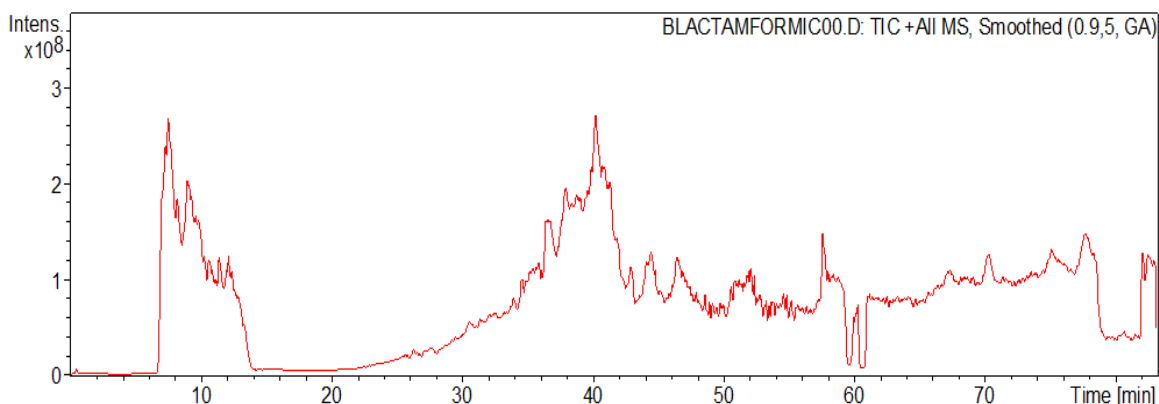


Figura 32. Cromatograma de iones totales de la digestión tríptica de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*.

La β -lactamasa fue sometida a digestión con tripsina, endoproteinasa encargada de la ruptura de los enlaces peptídicos en el extremo carboxílico de los aminoácidos básicos como lisina y arginina, se separó el producto de la proteólisis mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas y se establecieron comparaciones con las secuencias de péptidos reportados en las bases de datos de proteómica.

En la base de datos ExPasy (<http://www.expasy.ch>) se han reportado un total de 27 péptidos derivados de la digestión con tripsina para la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* y sus características principales como las secuencias de los péptidos resultantes, la posición de los sitios de ruptura, la longitud y la masa de

los mismos. En la tabla 11 se presentan estas características reportadas en la base de datos consultada.

Al realizar el análisis experimental mediante espectrometría de masas, correspondiente al producto de la digestión con tripsina de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, se encontraron 12 péptidos que presentaron coincidencias en cuanto a las masas moleculares de los péptidos reportados en la base de datos ExPasy, la descripción de cada uno de ellos se presenta en la tabla 11.

Tabla 11. Características de los péptidos trípticos de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*.

Tiempo de Retención (min)	Masa teórica ¹	Masa observada	Secuencia de péptidos	Aminoácidos (Posición)	Longitud péptido
7.2	2613.029	2616.4	AQSVPGMAVAVIYQQPHYYTFGK	22-45	24
11.4	2300.637	2303.8	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22
81.9	1277.443	1280.8	TFTGVLGGDAIAR	68-80	13
60.9	993.000	994.2	YWPQLTGK	92-99	8
51.7	1222.409	1223.0	LDHTWINVPK	184-193	10
51.8	1352.428	1357.2	AEEAHYAWGYR	194-205	11
12.3	1437.000	1435.5	VSPGMLDAQAYGVK	211-224	14
65.8	2721.070	2720.1	TNVQDMANWVMANMAPENVADASK	225-249	25
77.6	3239.000	3244.2	IGSMYQGLGWEMLNWPVEANTVVEGSDSK	262-290	29
57.6	1879.273	1879.2	VALAPLPVAEVNPPAPPVK	291-309	19
75.2	1845.147	1846.0	QIGIVMLANTSYPNPAR	333-349	17
60.8	1356.541	1357.4	VEAAYHILEALQ	350-361	12

¹ Datos de la digestión tríptica de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* provenientes de la base de datos ExPasy, especializada en proteómica.

El primer péptido que se detectó a los 7.2 minutos corresponde a una secuencia de 24 aminoácidos: AQSVPGMVAVIYQGPHYTFGK comprendidos entre las posiciones 22 y 45, el peso molecular de este péptido es de 2613 Da, el cual en las condiciones experimentales de espectrometría de masas está representado por el ion 654.1 $[M + 4H]^{4+}$.

De acuerdo con la información obtenida de la base de datos ExPasy para la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* digerida con tripsina, el péptido en el que se encuentran los aminoácidos catalíticos de la enzima Ser 64 y Lys 67, tiene una longitud de 22 aminoácidos comprendidos entre las posiciones 46 y 67 con la secuencia de aminoácidos ADIAANKPVTPTQLFELGSISK y un peso molecular de 2300 Da.

Los resultados de los estudios experimentales realizados por espectrometría de masas a partir de la digestión trípica de la β -lactamasa demuestran la presencia del ion 2303.8 $[M + 1H]^{1+}$ con un tiempo de retención de 11.4 minutos, indicando la presencia de la secuencia de aminoácidos del sitio activo de la β -lactamasa, la cual es fundamental para identificar los complejos covalentes formados con el tazobactam como inhibidor de referencia y con la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como inhibidor de prueba.

A continuación en la figura 33 se presenta el espectro del péptido ADIAANKPVTPTQLFELGSISK de β -lactamasa, el cual comprende los aminoácidos catalíticos y corresponde al sitio activo de la enzima. El ion 2303.8 $[M + 1H]^{1+}$ representa la masa molecular de 2303.8 Da.

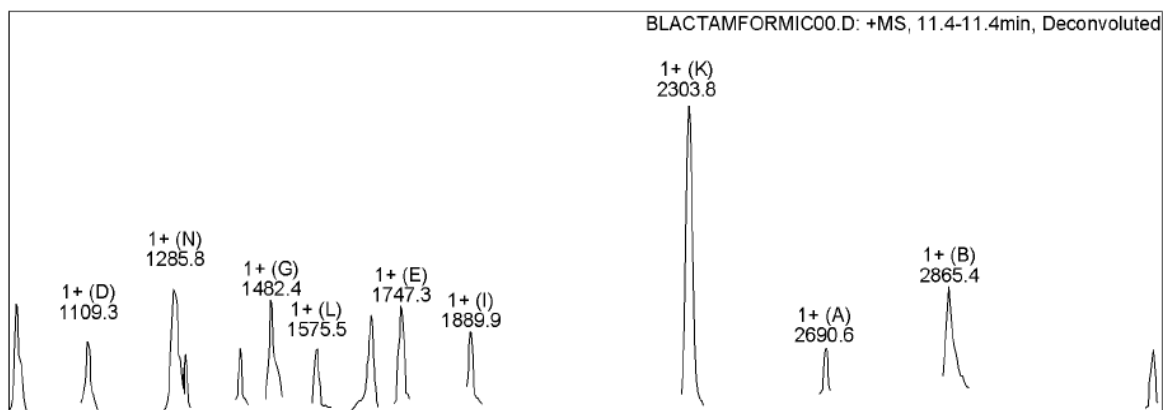


Figura 33. Espectro de masas correspondiente al péptido de masa molecular 2303.8 Da correspondiente al sitio activo de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*. Tipo IV. Sigma.

Continuando con la secuencia de aminoácidos de la enzima entre las posiciones 68-80, se encuentra el péptido TFTGVLGDAIAR con una longitud de 13 aminoácidos y un tiempo de retención de 81.9 minutos, la masa molecular está representada por el ión $320.2 [M + 4H]^{4+}$ que corresponde a una masa molecular de 1280.8 Da y coincide con la secuencia reportada en la base de datos consultada.

Otro de los péptidos obtenidos como producto de la digestión con tripsina y que fue detectado experimentalmente en un tiempo de retención de 60.9 minutos, corresponde a la secuencia YWPQLTGK de 8 aminoácidos, que comprende las posiciones 92-99 de β -lactamasa, con una masa molecular de 993 Da y está representado por el ión $497.1 [M + 2H]^{2+}$ en el estudio realizado mediante espectrometría de masas.

A los 51.7 minutos del corrido cromatográfico se detectó a través del estudio de espectrometría de masas el péptido de 10 aminoácidos comprendido entre las posiciones 184-193 con la secuencia LDHTWINVPK, de peso molecular de

1222.443 Da, el cual está representado a través del ión 612.0 $[M + 2H]^{2+}$ y corresponde a uno de los fragmentos peptídicos de la enzima β -lactamasa.

De la misma manera, se identificó el ión 452.4 $[M + 3H]^{3+}$, correspondiente al péptido AEEAHYAWGYR de 11 aminoácidos, comprendido entre las posiciones 194-205 de la enzima β -lactamasa y con una masa molecular de 1352.428 Da.

Continuando con el análisis por espectrometría de masas del producto de la digestión con tripsina de la enzima β -lactamasa, en las posiciones comprendidas entre 211 y 224 se encuentra el péptido VSPGMLDAQAYGVK, con una longitud de 14 aminoácidos y una masa molecular teórica de 1437.0 Da, representada por el ion 478.5 $[M + 3H]^{3+}$, de acuerdo con los datos obtenidos experimentalmente.

Otro de los péptidos importantes encontrados a lo largo del análisis está representado por el ión 906.7 $[M + 3H]^{3+}$, el cual corresponde a una masa obtenida experimentalmente de 2720.1 Da y corresponde al péptido TNVQDMANWVMANMAPENVADASLK con una masa teórica de 2721.070 Da.

El péptido comprendido entre las posiciones 262-290 de 29 aminoácidos, correspondiente a la secuencia IGSMYQGLGWEMLNWPVEANTVVEGSDSK de β -lactamasa, tiene un peso molecular teórico de 3239.0 Da, experimentalmente se obtuvo el ión 1081.4 $[M + 3H]^{3+}$ correspondiente a una masa de 3244.2 Da, la cual es representativa para este péptido.

En el tiempo de retención de 57.6 minutos se identifico la masa experimental de 626.4 $[M + 3H]^{3+}$, correspondiente a la secuencia de 19 aminoácidos VALAPLPVAEVNPPAPPVK, comprendida entre las posiciones 291-309 con una masa teórica de 1879.273 Da.

Transcurridos los 75,2 minutos iniciales del corrido cromatográfico de los péptidos de la enzima β -lactamasa, se identificó el ión 1845.7 $[M + 1H]^{1+}$, el cual corresponde a la secuencia QIGIVMLANTSYPNPAR de 17 aminoácidos

comprendidos entre las posiciones 333-349, la masa teórica reportada en la base de datos ExPaSy es de 1845.147 Da.

Finalizando el análisis de los péptidos trípticos de β -lactamasa, en un tiempo de retención de 60.8 minutos se identificó el ión 678.7 $[M + 2H]^{2+}$, con una masa de 1357.4 Da, correspondiente a la secuencia de 12 aminoácidos VEAAYHILEALQ de la enzima β -lactamasa.

A continuación en la tabla 12 se presenta el resumen donde se incluyen los iones detectados y las masas moleculares de cada uno de los péptidos, producto de la digestión con tripsina, que fueron identificados mediante espectrometría de masas.

Tabla 12. Péptidos identificados experimentalmente mediante espectrometría de masas.

Posición	Secuencia	Tiempo de Retención (min)	Ión	Masa (Da)
22-45	AQSVPGMVAVIYQGPHYTFGK	7.2	654.1 $[M + 4H]^{4+}$	2616.4
46-67	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	11.4	2303.8 $[M + 1H]^{1+}$	2303.8
68-80	TFTGVLGGDAIAR	81.9	320.2 $[M + 4H]^{4+}$	1280.8
92-99	YWPQLTGK	60.9	497.1 $[M + 2H]^{2+}$	994.2
184-193	LDHTWINVPK	51.7	612.0 $[M + 2H]^{2+}$	1223.0
194-205	AEEAHYAWGYR	51.8	452.4 $[M + 3H]^{3+}$	1357.2
211-224	VSPGMLDAQAYGVK	12.3	478.5 $[M + 3H]^{3+}$	1435.5
225-249	TNVQDMANWVMANMAPENVADASK	65.8	906.7 $[M + 3H]^{3+}$	2720.1
262-290	IGSMYQGLGWEMLNWPVEANTVVEGSDSK	77.6	1081.4 $[M + 3H]^{3+}$	3244.2
291-309	VALAPLPVAEVNPPAPPVK	57.6	626.4 $[M + 3H]^{3+}$	1879.2
333-349	QIGIVMLANTSYPNPAR	75.2	1845.7 $[M + 1H]^{1+}$	1845.7
350-361	VEAAYHILEALQ	60.8	678.7 $[M + 2H]^{2+}$	1357.4

6.4.2. Análisis del producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.

Los incrementos en el peso molecular del péptido del sitio activo de la enzima se deben a la formación del complejo de inhibición mediado por enlace covalente entre los aminoácidos del sitio activo de la β -lactamasa y el tazobactam, los diferentes fragmentos derivados de la acción catalítica son formados por rompimientos en los enlaces más susceptibles del tazobactam quedando al final un fragmento con peso molecular 2352 Da, correspondiente a la unión con el fragmento de tazobactam que ha perdido el anillo triazolil sustituido y el fragmento de enamina, a continuación en la figura 34 se presenta el cromatograma de iones totales donde se representa la separación cromatográfica de los péptidos trípticos provenientes del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam en los diferentes tiempos de retención del compuesto.

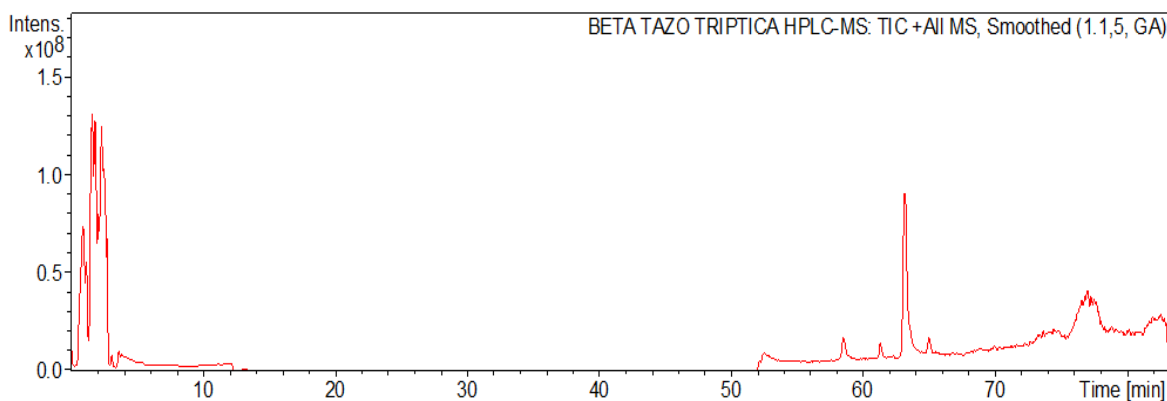


Figura 34. Cromatograma de iones totales de la digestión tríptica de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con el tazobactam.

Los espectros de masas y las representaciones moleculares de los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam constituyen las evidencias experimentales para demostrar que los aumentos en el peso molecular del péptido del sitio activo se deben a la unión inicial con el tazobactam y a pérdidas posteriores de los grupos funcionales susceptibles, donde es posible detectar la formación de complejos de inhibición irreversibles con el tazobactam de 322 y 300 Da y también con fragmentos menores derivados de la pérdida y fragmentación de los grupos funcionales más susceptibles del tazobactam con masas isotópicas de 284, 256, 232 y 52 Da relacionados con su forma enamina, en la tabla 13 se resumen las características de los cinco compuestos en los cuales se evidenciaron los aumentos en el peso molecular del péptido del sitio activo de la enzima, debido a la unión covalente con el tazobactam.

Tabla 13. Características de los péptidos trípticos de la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con tazobactam y sus derivados.

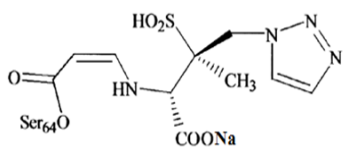
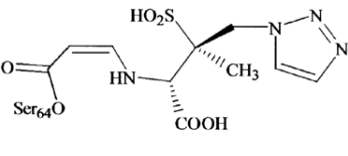
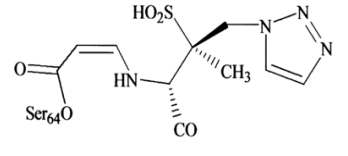
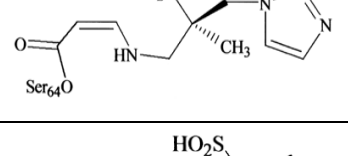
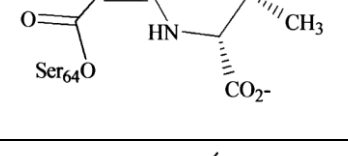
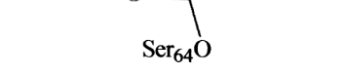
T. de Ret (min)	Masa teórica	Masa observada	Secuencia de péptidos	Aminoácidos (Posición)	Longitud péptido	Incremento
11.4 ¹	2300	2304	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	0
1.1	2622	2622	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	322
63.1	2600	2600	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	300
2.1	2556	2558	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	256
2.2	2584	2584	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	284
2.2	2532	2532	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	232
2.4	2352	2352	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	52

¹ Corresponde al análisis realizado a partir de los péptidos trípticos de β -lactamasa intacta.

Es muy importante analizar las representaciones esquemáticas de los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam, para comprender los perfiles de relación masa/carga que representan los incrementos en el peso molecular de los péptidos, producto de la digestión con tripsina de cada uno de los complejos de inhibición relacionados con el tazobactam, a continuación se presenta de forma secuencial de acuerdo con el mecanismo de inhibición reportado para el

tazobactam, cada uno de los espectros de masas que corresponden a las uniones covalentes de la serina del sitio activo con el tazobactam y fragmentos derivados, en la tabla 14 se resumen las características de los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam y se incluye la estructura, la masa molecular al igual que la relación masa/carga detectada mediante espectrometría de masas. [42].

Tabla 14. Complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam detectados mediante espectrometría de masas.

Estructura molecular	Descripción	Relación masa/carga	% Abundancia Relativa
	Complejo enamina β -lactamasa/tazobactam 2300 Da + 322 Da = 2622 Da	656.3 [M + 4H] ⁴⁺	16.40
	Complejo enamina β -lactamasa/tazobactam 2300 Da + 300 Da = 2600 Da	867.4 [M + 3H] ³⁺	77.21
	Deshidroxilación β -lactamasa/tazobactam 2300 Da + 284 Da = 2584 Da	646.8 [M + 4H] ⁴⁺	35.52
	Descarboxilación β -lactamasa/tazobactam 2300 Da + 256 Da = 2556 Da	852.7 [M + 3H] ³⁺	23.18
	Pérdida del anillo aminotetrazolio β -lactamasa/tazobactam 2300 Da + 232 Da = 2532 Da	507.3 [M + 5H] ⁵⁺	41.64
	Complejo propionilado β -lactamasa/tazobactam 2300 Da + 52 Da = 2352 Da	471.3 [M + 5H] ⁵⁺	59.39

El análisis mediante espectrometría de masas del producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, permitió la detección de varios complejos de inhibición mediados por la unión covalente que no han sido reportados previamente en las publicaciones científicas como en el caso de las masas moleculares correspondientes al complejo enamina, complejo de deshidroxilación, complejo de descarboxilación. El complejo con el tazobactam debido a la pérdida del anillo aminotetrazolio y el complejo propiolilado ya se han detectado mediante espectrometría de masas y por lo tanto cuentan con el soporte bibliográfico [42, 59].

6.4.2.1. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam de sodio.

La formación de los complejos de inhibición se inicia con la reacción nucleofílica entre la serina catalítica del sitio activo en posición 64 y el carbono carbonílico del anillo β -lactámico del tazobactam, en su forma de tazobactam de sodio, esta reacción genera un aumento de 322 Da en el peso molecular del péptido del sitio activo de la enzima, esta unión covalente se representa esquemáticamente en la figura 35 donde aparece el complejo de acilación inicial formado entre la β -lactamasa y el tazobactam de sodio.

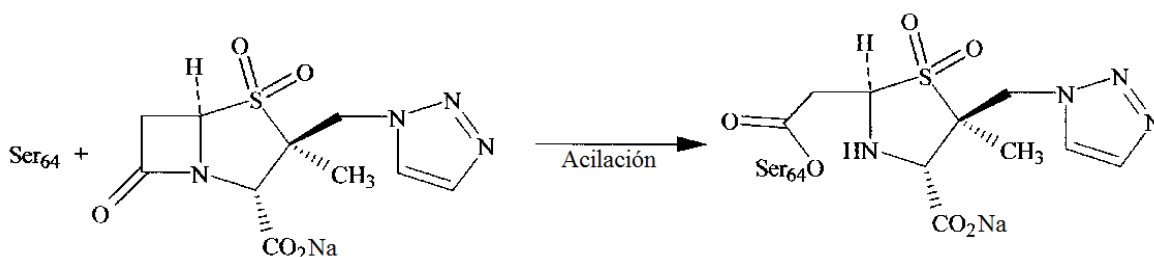


Figura 35. Complejo de inhibición formado entre el péptido del sitio activo de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con el tazobactam de sodio con un peso molecular de 322 Da.

Al analizar el complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam de sodio se detectó el ion 656.3 $[M + 4H]^4+$ con un porcentaje de abundancia relativa de 16.40%, el cual corresponde a una masa isotópica de 2622.1 Da y es la evidencia experimental de la formación de un enlace covalente entre el péptido del sitio activo de 2300 Da con el tazobactam de sodio de 322 Da, a continuación en el espectro de masas de la figura 36 se encuentra el perfil masa/carga del complejo de inhibición formado.

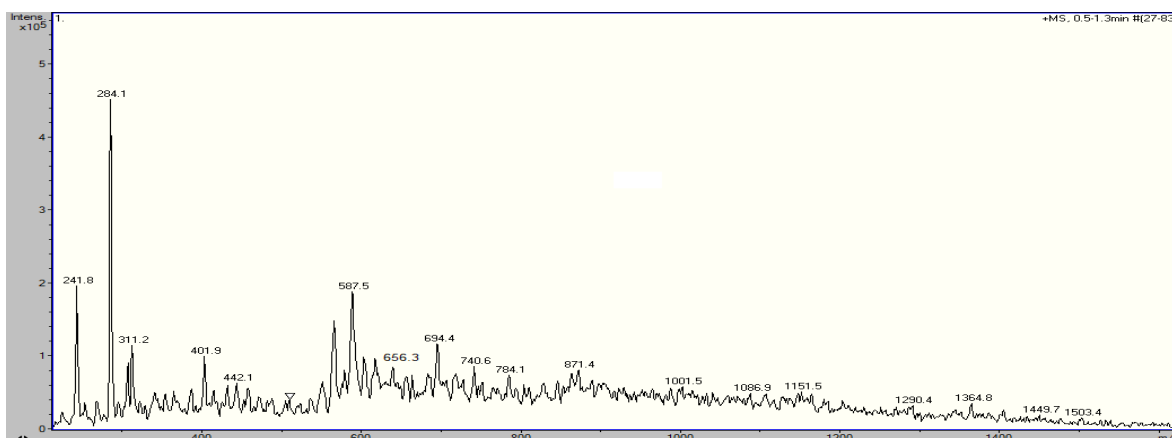


Figura 36. Espectro de masas del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam donde aparece el ion 656.3 $[M + 4H]^4+$ que representa la formación del enlace covalente entre la enzima y el tazobactam de sodio.

6.4.2.2. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam.

Una vez formado el complejo de acilación estable entre la enzima y el tazobactam, la reacción siguiente es la ruptura del enlace carbono-azufre del anillo de sulfona tiazolidinona y posteriormente ocurre la transaminación de imina a enamina, como parte fundamental en la formación del complejo de inhibición estable, los pasos de la reacción posterior a la formación del complejo de acilación con el tazobactam han sido reportados previamente por otros autores a partir de estudios de espectrometría de masas y se esquematizan a continuación en la figura 37 [42].

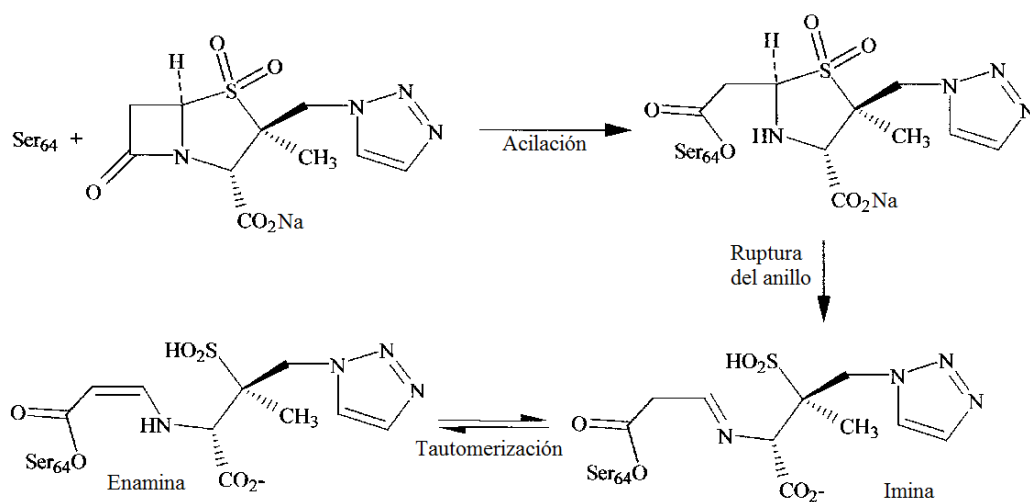


Figura 37. Representación esquemática del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, posterior a la formación del enlace covalente.

Los complejos imina y enamina formados a partir de la unión covalente con el tazobactam, generan un aumento de 300 Da en el peso molecular de la enzima, el estudio realizado mediante espectrometría de masas permitió la identificación de un complejo con una masa molecular de 2600 Da, generado por la unión entre el péptido del sitio activo de 2300 Da y el tazobactam que puede estar en su forma de imina o enamina con una masa molecular 300 Da.

En el espectro de masas de la figura 38 que aparece a continuación, se puede observar el ion $865.5 [M + 3H]^{3+}$ con un porcentaje de abundancia relativa de 77.21% el cual representa una masa isotópica de 2600 Da y corresponde al complejo de inhibición formado entre la β -lactamasa y los complejos de imina y enamina derivados del tazobactam.

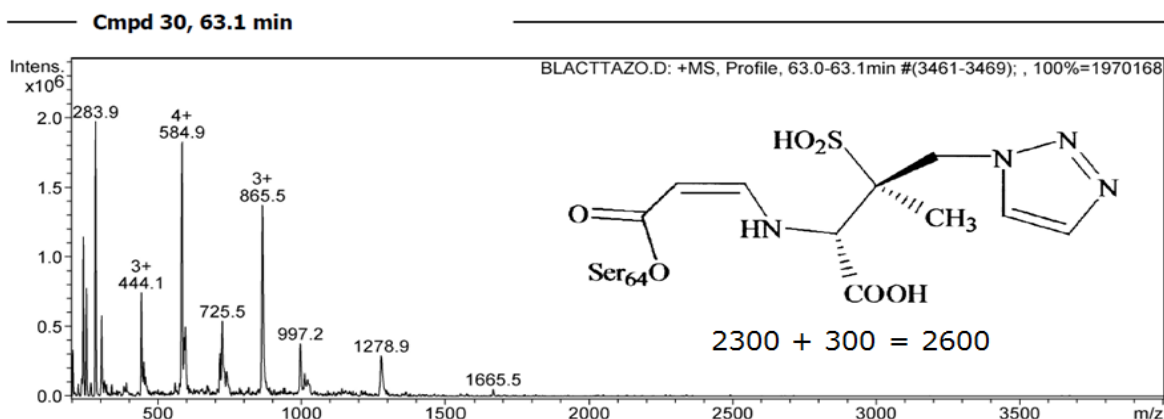


Figura 38. Espectro de masas del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam donde aparece el ion 865.5 $[M + 3H]^{3+}$ con una masa molecular de 2600 Da.

A partir del enlace covalente formado entre la enzima β -lactamasa y el tazobactam fue posible detectar mediante espectrometría de masas la formación de otros cinco complejos de inhibición derivados del rompimiento de los enlaces más susceptibles en la molécula del tazobactam, los cuales ocurren posteriormente a la formación del complejo enamina que presenta mayor estabilidad que el complejo imina desde el punto de vista químico.

Los estudios de espectrometría de masas permitieron la identificación del péptido del sitio activo con la enamina acilada, derivada del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam y las pérdidas posteriores del hidroxilo, el carboxilato y del anillo amino-tetrazolio del tazobactam, tal como se resume en la tabla 14, cuando en el complejo de inhibición con la enamina derivada del tazobactam se pierde el grupo hidroxilo el peso molecular es de 2584 Da, cuando ocurre la descarboxilación del complejo el peso molecular corresponde a 2556 Da y con la pérdida del anillo amino-tetrazolio el peso molecular del complejo formado es de 2532 Da, estas rupturas de los enlaces susceptibles del tazobactam y sus complejos de inhibición no habían sido reportadas previamente. En la fase final del análisis, se detectó un aumento de 52 Da en el peso molecular del péptido del sitio

activo, el cual puede corresponder a la formación del complejo propiolilado con la serina del sitio activo, la formación de este complejo ha sido previamente reportada en estudios de espectrometría de masas [42, 59].

En la siguiente sección se presentan los espectros y la descripción de los iones que corresponden a cada uno de los complejos de inhibición formados a partir del complejo de acilación covalente β -lactamasa/tazobactam.

6.4.2.3. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la deshidroxilación del tazobactam.

Uno de los grupos susceptibles de ruptura en el tazobactam es el grupo hidroxilo, la reacción de deshidroxilación ocurre de manera espontánea, influenciada por las condiciones de ionización después de la formación del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, el análisis por espectrometría de masas permitió la identificación del ion 646.8 $[M + 4H]^{4+}$ con un porcentaje de abundancia relativa de 35.52% y una masa isotópica de 2584 Da, el cual representa el fragmento del sitio activo de 2300 Da unido al fragmento de la enamina del tazobactam sin el hidroxilo. El espectro de masas del complejo covalente entre la Serina catalítica de la β -lactamasa y el tazobactam, posterior a la reacción de deshidroxilación, se presenta en la figura 39, en la cual también aparece la representación estructural del complejo de inhibición formado con la Serina del sitio activo en posición 64.

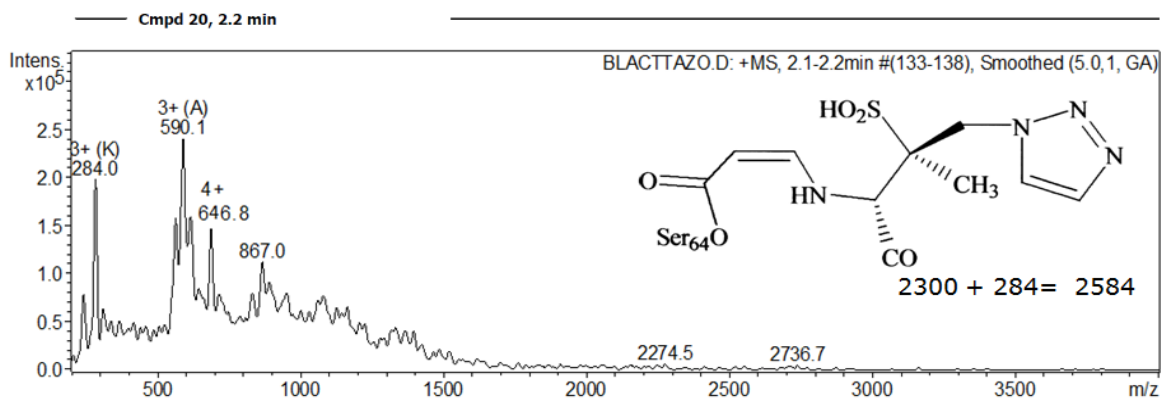


Figura 39. Espectro de masas del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam formado debido a la reacción de deshidroxilación, el ión 646.8 $[M + 4H]^{4+}$ representa la masa molecular resultante de 2584 Da.

6.4.2.4. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la descarboxilación del tazobactam.

Las reacciones de descarboxilación ocurren con frecuencia y de forma espontánea en el medio acuoso, en el caso del tazobactam la pérdida del carboxilato una vez formada la enamina del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, genera el fragmento del sitio activo con masa molecular de 2556 Da y está representado en el espectro de masas de la figura 40 donde aparecen los iones resultantes del complejo covalente entre el péptido del sitio activo de la β -lactamasa y el fragmento del tazobactam con posterior descarboxilación. El ion 852.7 $[M + 3H]^{3+}$, presenta un porcentaje de abundancia relativa de 23.18% y genera una masa isotópica de 2556 Da correspondiente al complejo de inhibición formado entre la β -lactamasa a través de la Serina en posición 64 y el fragmento del tazobactam desprovisto del grupo carboxilato.

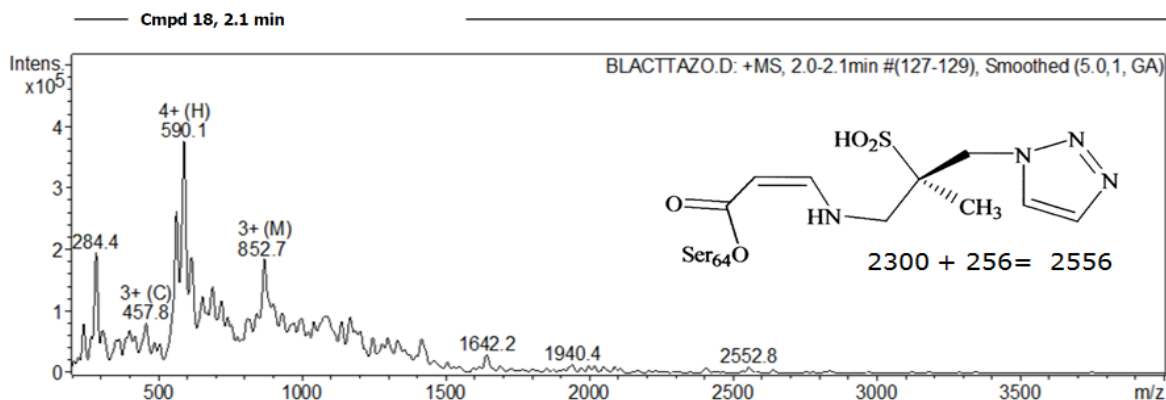


Figura 33. Espectro de masas del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la descarboxilación del tazobactam, el ión 852.7 $[M + 3H]^{3+}$ representa la masa molecular resultante de 2556 Da.

6.4.2.5. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la eliminación del anillo amino tetrazolio del tazobactam.

El enlace con el anillo triazolil sustituido es susceptible de ruptura en las condiciones de ionización empleadas para el análisis por espectrometría de masas, el complejo de inhibición formado entre el péptido del sitio activo y el tazobactam con la pérdida del anillo amino-tetrazolio corresponde a una masa de 2532 Da, representada en el espectro de masas de la figura 41, en el cual aparece el ion 507.3 $[M + 5H]^{5+}$ con un porcentaje de abundancia relativa de 41.64% y genera una masa isotópica de 2532 Da para representar el complejo de inhibición formado con el fragmento del tazobactam, con la posterior reacción de eliminación que da lugar a la pérdida del anillo amino-tetrazolio.

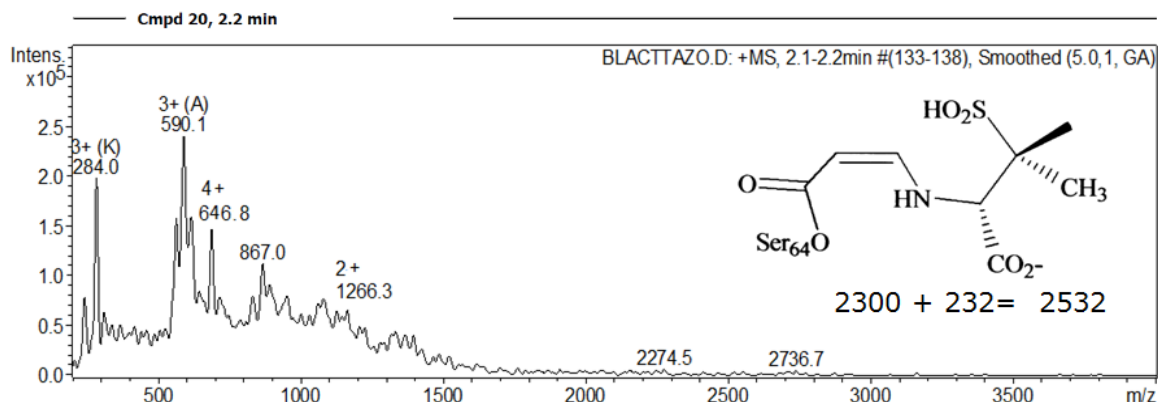


Figura 34. Espectro de masas del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam debido a la eliminación del grupo amino tetrazolio, el ión 507.3 $[M + 5H]^{5+}$ representa la masa molecular resultante de 2532 Da.

6.4.2.6. Complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, producto de la formación del complejo propiolilado.

El mecanismo propuesto de inactivación de β -lactamasa por parte del tazobactam incluye la formación de un complejo irreversible seguido por la pérdida de la enamina que genera una masa molecular adicional de 52 Da en el péptido del sitio activo, la cual puede ser atribuida a la formación de un complejo covalente irreversible de tipo propiolilado entre la serina 64 del sitio activo y el fragmento de tazobactam de 52 Da [42, 59]. A continuación se presenta la estructura molecular del complejo de inhibición relacionado con la masa molecular de 2352 Da, del fragmento del sitio activo detectado mediante espectrometría de masas.

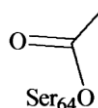


Figura 42. Estructura química del complejo propiolilado con el aminoácido catalítico Ser⁶⁴ de la enzima β -lactamasa.

La formación del complejo de inhibición irreversible fue detectada a partir del ion 471.3 $[M + 5H]^{5+}$ con un porcentaje de abundancia relativa de 59.39%, el cual genera una masa isotópica de 2352 Da. El espectro de masas obtenido se presenta a continuación en la figura 43.

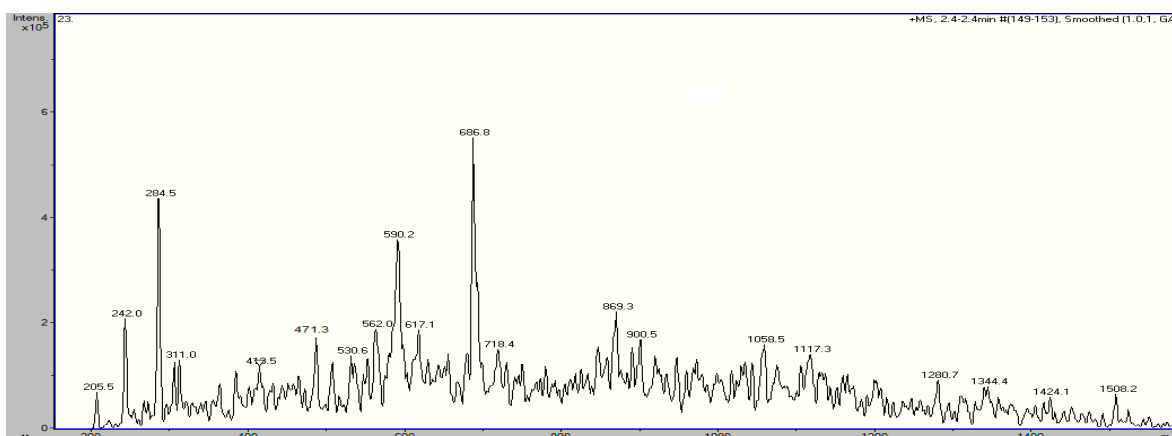


Figura 43. Espectro de masas del complejo propionilado formado entre el péptido del sitio activo de la β -lactamasa y el tazobactam, el ión 471.3 $[M + 5H]^{5+}$ representa la masa molecular resultante de 2352 Da.

6.4.3. Análisis del producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ESI/IT/MS.

Se realizó el análisis del producto de la digestión con tripsina, obtenido a partir de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, inhibida con la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC/ESI/IT/MS) con la finalidad de identificar los péptidos que participan en la formación de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona, como se detectaron aumentos en la masa molecular únicamente en el péptido del sitio activo, se logró confirmar la inhibición de tipo competitivo del compuesto y mediante la comparación de los perfiles

peptídicos de la β -lactamasa tripsinizada y del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona tripsinizado, se identificaron los fragmentos de unión establecidos por enlaces covalentes entre la β -lactamasa y la chalcona sintetizada.

Al realizar el análisis de los espectros de masas en los tiempos de retención de 61.2 y de 81.6 minutos del corrido cromatográfico, se registraron aumentos en la masa molecular del péptido del sitio activo de la enzima β -lactamasa, en esta sección se presentan cada uno de los espectros de masas que corresponden a la unión covalente de la serina del sitio activo con la chalcona y las reacciones posteriores de fragmentación de la chalcona en el sitio activo de la enzima donde finalmente ocurre la formación de un complejo de inhibición estable.

A continuación en la figura 44 se presenta el cromatograma de iones totales, producto de la separación de los péptidos del producto de la digestión con tripsina obtenidos a partir del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona, donde se pueden identificar los diferentes tiempos de retención de cada uno de los iones.

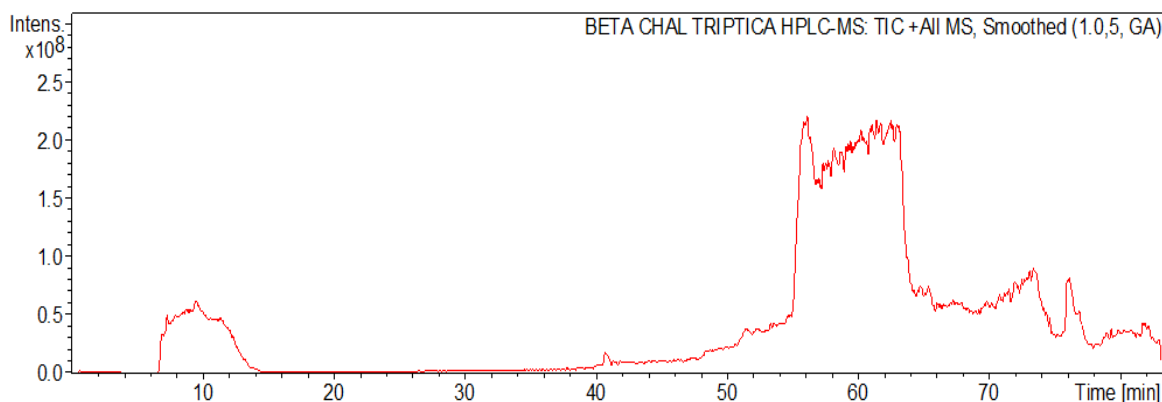


Figura 44. Cromatograma de iones totales del producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición la β -lactamasa/chalcona.

Los estudios de espectrometría de masas permitieron la detección de dos complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona representados por el aumento en la masa molecular del péptido del sitio activo de la enzima. Las características de las

modificaciones de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre el péptido del sitio activo de la enzima β -lactamasa, se resumen en la tabla 15.

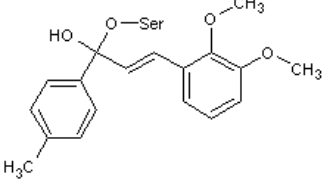
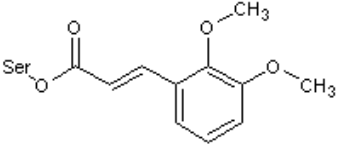
Tabla 15. Características del péptido del sitio activo de la enzima β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, debido a la acción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona.

T. de Ret (min)	Masa teórica	Masa observada	Secuencia de péptidos	Aminoácidos (Posición)	Longitud péptido	Incremento
11.4	2300	2304	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	0
61.2	2660	2660	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	360
81.6	2507	2507	ADIAANKPVTPQTLFELGSISK	46-67	22	207

Como resultado de la acción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, el péptido del sitio activo de la enzima incrementa su masa molecular en 360 Da, este aumento es detectado al analizar el espectro de masas correspondiente al tiempo de retención de 61.2 minutos en el corrido cromatográfico. Continuando con el seguimiento al péptido del sitio activo de la enzima β -lactamasa, también se identificó un aumento de 207 Da en un tiempo de retención de 81.6 minutos, de acuerdo con estos aumentos detectados en la masa molecular del péptido catalítico, es posible que la inhibición enzimática ocurra en dos etapas de reacción secuenciales.

En la tabla 16 se resumen las características de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona detectados mediante espectrometría de masas, en los cuales se representa la estructura química, la masa molecular, la relación masa/carga y el porcentaje de abundancia relativa de los iones detectados en espectrometría de masas.

Tabla 16. Complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona detectados mediante espectrometría de masas.

Estructura molecular	Descripción	Relación masa/carga	% Abundancia Relativa
	Complejo de acilación β -lactamasa/chalcona	665.0 [M + 4H] ⁴⁺ 2660 Da	58.42
	Complejo β -lactamasa/chalcona dimetoxifenil-propenona	837.2 [M + 3H] ³⁺ 2507 Da	37.89

El análisis de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona detectados mediante espectrometría de masas permite conocer los perfiles de relación masa/carga que representan los incrementos en el peso molecular del péptido del sitio activo, con la finalidad de comprender el modo de acción de la chalcona y su interacción en el sitio activo de la enzima.

La reacción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa en su primera etapa, se inicia con la formación del complejo de acilación, el cual es un intermediario tetrahedral que se forma a través de la reacción nucleofílica entre la serina catalítica del sitio activo de la β -lactamasa y el carbonilo de la chalcona, esta reacción inicial de adición nucleofílica es similar a la que ocurre en el caso de los fármacos β -lactámicos y su interacción con la enzima, ya sea como sustratos o como inhibidores. La representación esquemática de la formación del complejo de acilación β -lactamasa/chalcona, se presenta en la figura 45.

El estudio realizado mediante espectrometría de masas permitió la detección del ion $665.0 [M + 4H]^{4+}$, correspondiente al fragmento de 2660 Da donde se evidencia el aumento en la masa molecular del péptido del sitio activo de 2300 Da, debido a la unión con la chalcona de 282 Da, constituyendo el complejo de acilación en aducto con el DMSO de 78 Da. El espectro de masas correspondiente está representado en la figura 46.

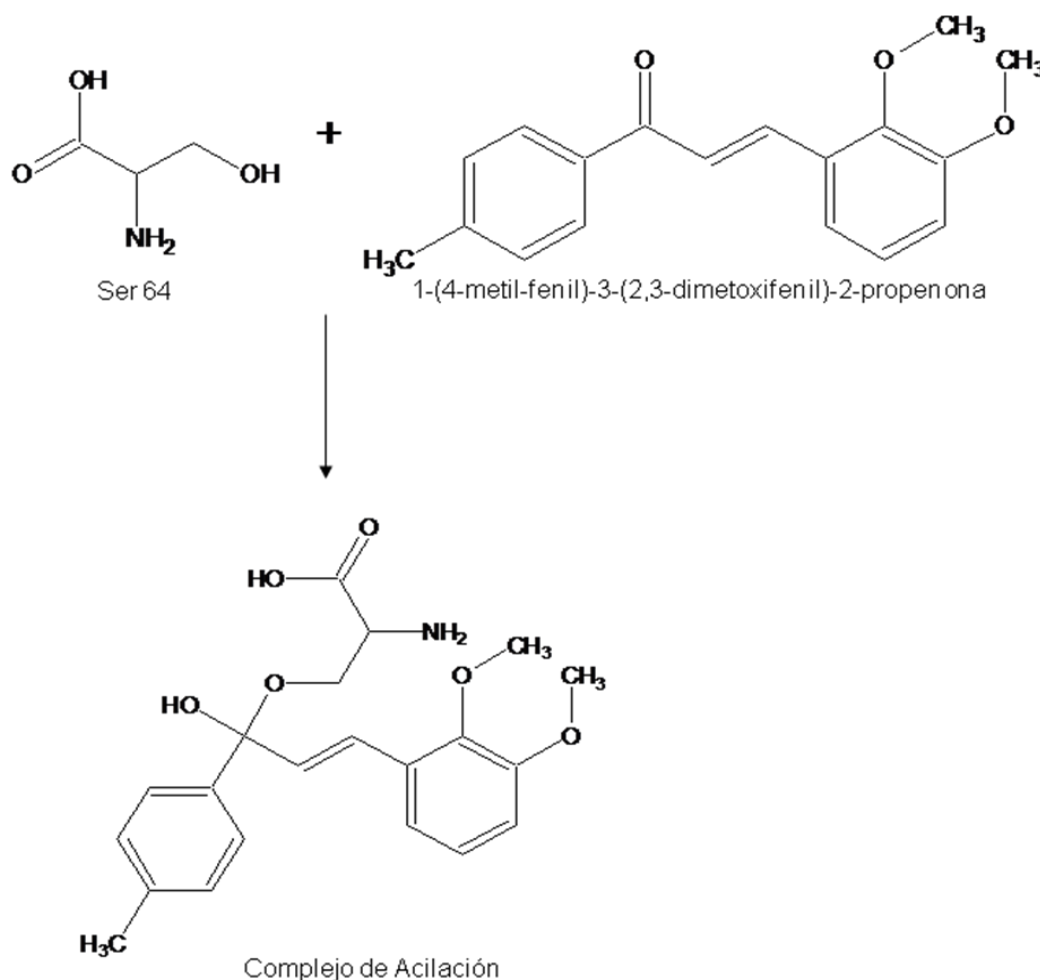


Figura 45. Representación esquemática de la reacción de adición nucleofílica que origina la formación del complejo de acilación β -lactamasa/chalcona.

En el espectro de masas de la figura 46 se encuentra el perfil masa/carga del complejo de inhibición formado a través de la acilación entre la serina catalítica de la β -lactamasa y el carbonilo de la chalcona.

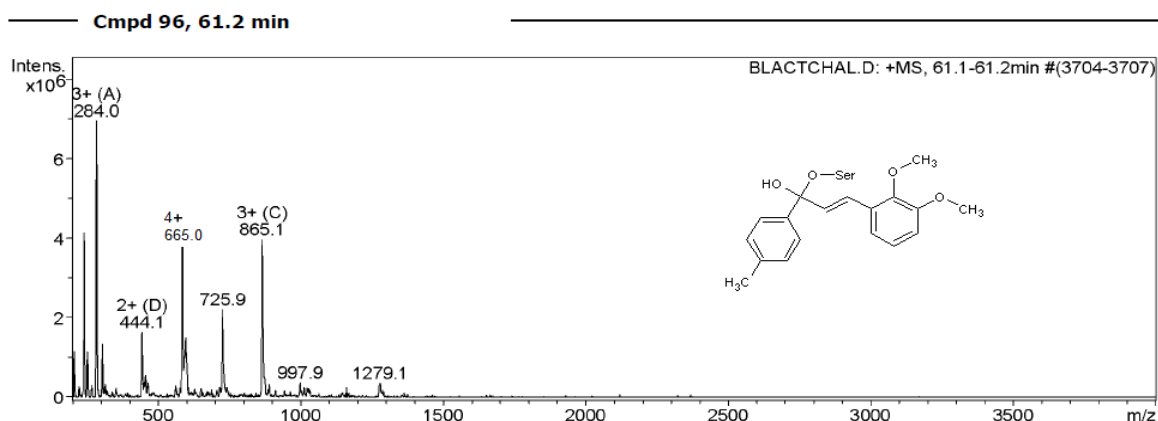


Figura 46. Espectro de masas del complejo de acilación formado entre el péptido de 2300 Da de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae* y la chalcona de 282 Da en aducto con DMSO.

Una vez formado el complejo de acilación, la reacción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa cursa la segunda fase, hasta generar el complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona a través de la reacción de eliminación en la cual se libera el grupo arilo proveniente del anillo A de la chalcona y se origina el complejo dimetoxifenil-propenona entre la serina catalítica de la enzima y la chalcona. La formación de este complejo de inhibición como producto final en la reacción explica la actividad inhibitoria del compuesto a partir de la formación de un complejo covalente detectado mediante espectrometría de masas. En la figura 47 se esquematiza la formación del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona en la fase final de reacción.

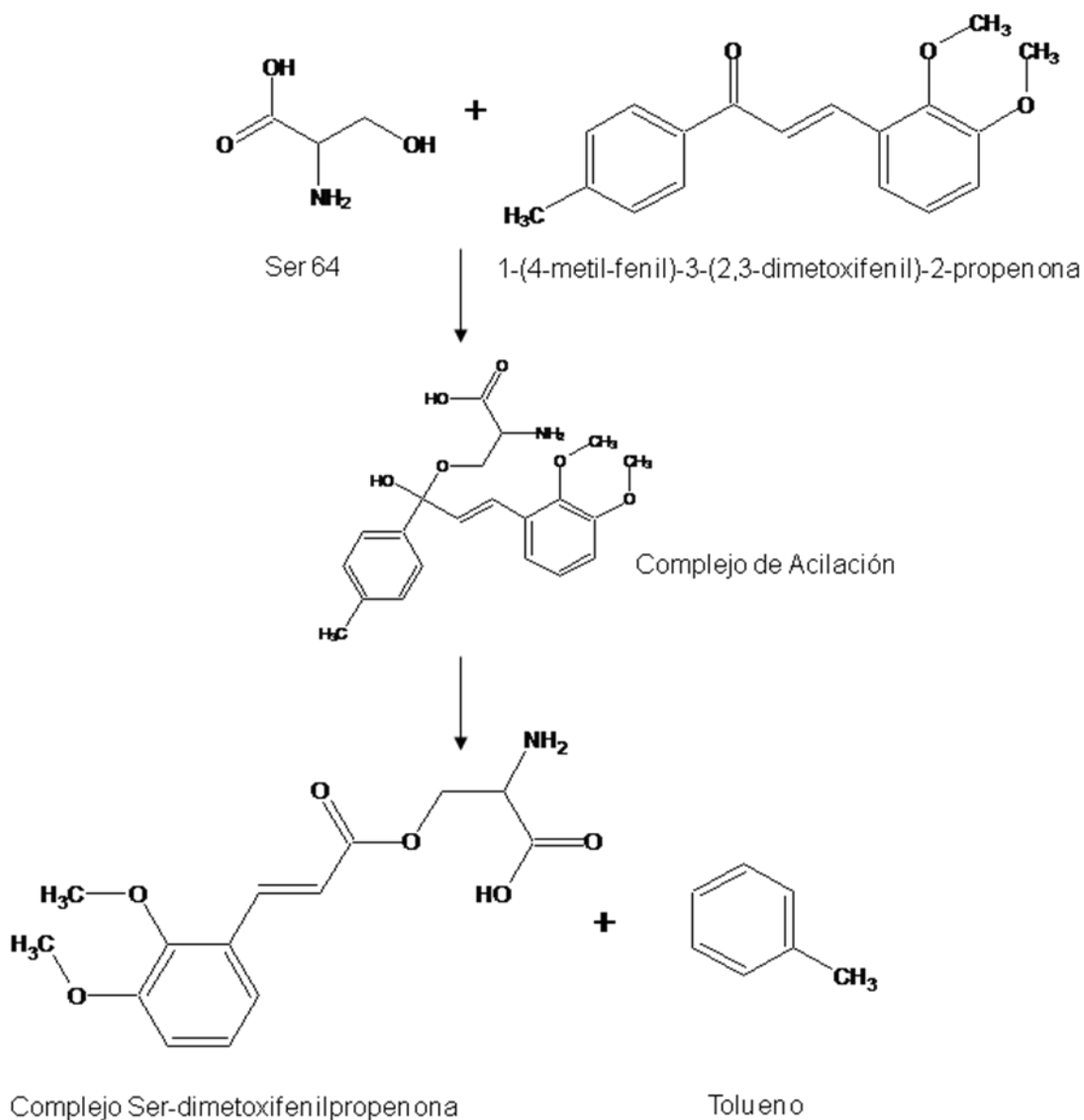


Figura 47. Representación esquemática de la formación del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona en la segunda fase de la reacción, donde se representa la unión covalente con el fragmento dimetoxifenil-propenona.

El estudio de espectrometría de masas permitió la detección del ion 837.2 [M + 3H]³⁺ con una masa isotópica de 2507 Da, el cual representa la formación del complejo dimetoxifenil-propenona. El espectro de masas del complejo de

inhibición β -lactamasa/chalcona, generado por la unión con el fragmento dimetoxifenil-propenona aparece a continuación en la figura 48.

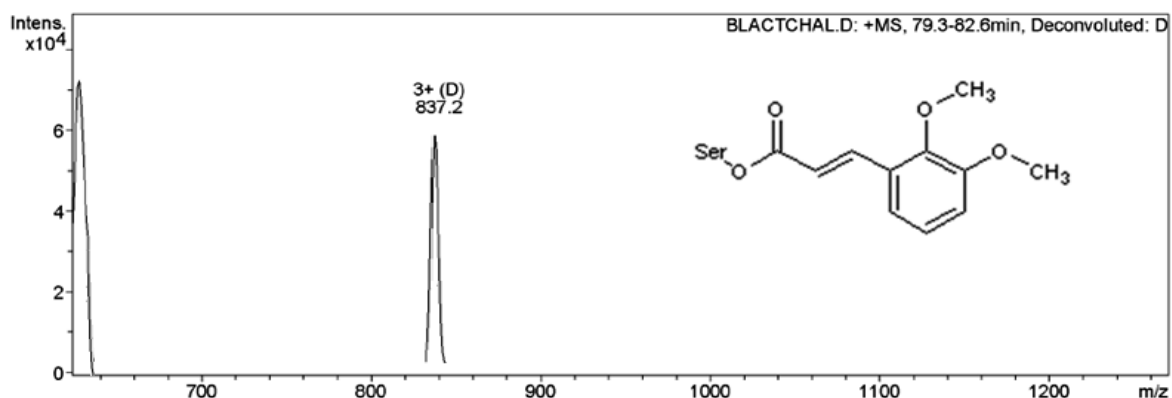


Figura 48. Espectro de masas del complejo de inhibición dimetoxifenil-propenona de la chalcona de 207 Da, el ión molecular de 837.2 $[M + 3H]^{3+}$ corresponde a la masa del fragmento de 2507 Da.

Los estudios de espectrometría de masas realizados con el fin de conocer la interacción de la chalcona en el sitio activo de la enzima β -lactamasa, permitieron proponer la secuencia de reacciones que explican la actividad inhibitoria del compuesto, donde inicialmente se presenta la formación del complejo covalente entre la β -lactamasa y la chalcona conocido como el complejo de acilación, el cual probablemente debido a las condiciones de espectrometría de masas sufre la reacción de eliminación del anillo A de la chalcona, lo cual da origen a la formación del complejo dimetoxifenilpropenona en la segunda etapa de la reacción. Tanto el complejo de acilación como el complejo dimetoxifenilpropenona se identificaron experimentalmente mediante espectrometría de masas con porcentajes adecuados de abundancia relativa en cada uno de los iones y con la finalidad de conocer las características termodinámicas y la viabilidad de la reacción inhibitoria, se realizaron estudios teóricos de modelación molecular que complementan los resultados experimentales.

6.5. Optimización de los complejos de inhibición β -lactamasa/chalcona.

Se realizaron estudios de modelación molecular utilizando el programa Gaussian 98 con la finalidad de optimizar la geometría y calcular los valores de energía del complejo de acilación y del complejo dimetoxifenil-propenona, de esta manera se obtuvieron resultados teóricos que permiten complementar los resultados experimentales de cinética enzimática y espectrometría de masas, con el propósito de aclarar el modo de acción de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona como compuesto inhibidor de la enzima β -lactamasa.

El complejo de acilación de la enzima β -lactamasa y la chalcona se inicia con la formación del enlace covalente entre la serina del sitio activo y el grupo carbonilo de la chalcona, los residuos catalíticos lisina y tirosina cumplen la función de estabilizar el complejo de inhibición por interacciones intermoleculares a través de enlaces de hidrógeno, la optimización de la geometría y de los parámetros energéticos correspondientes a los compuestos que intervienen en la reacción de inhibición refuerzan la comprobación de la hipótesis sobre el modo de acción inhibitorio de la chalcona sintetizada. En la figura 49 se presenta la geometría optimizada del complejo de acilación β -lactamasa/chalcona y las distancias intermoleculares entre los residuos catalíticos, calculadas utilizando la base de cálculo HF/6-31 G.

La reacción de eliminación posterior a la formación del complejo de acilación incluye la transformación de la chalcona en el sitio activo de la enzima mediante la pérdida del anillo A por fragmentación inducida en las condiciones de espectrometría de masas, generando la formación del complejo dimetoxifenilpropenona, el cual está representado en la figura 50 donde aparece la geometría optimizada y las distancias intermoleculares que determinan la interacción en el sitio activo de la enzima, calculadas al nivel HF/6-31G.

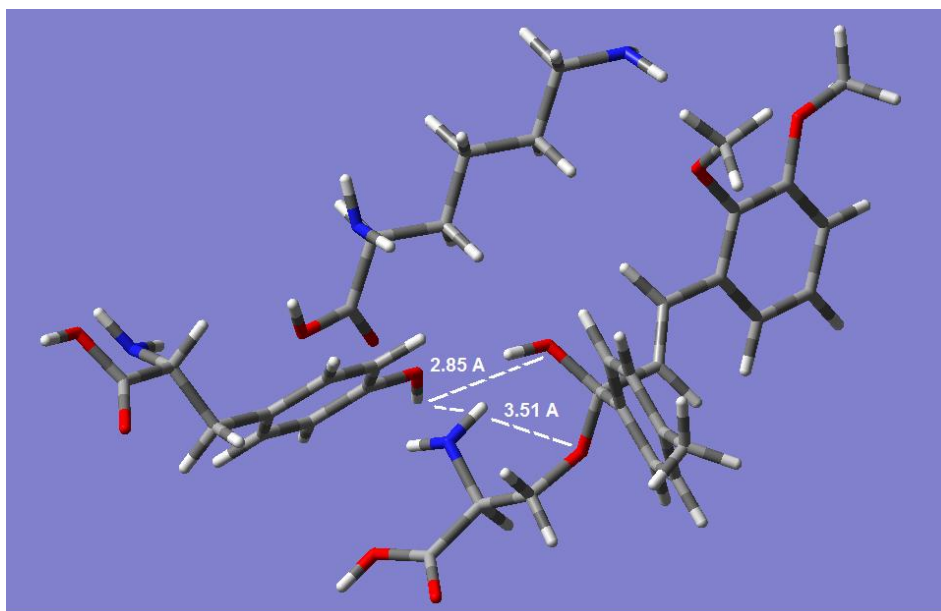


Figura 49. Geometría optimizada del complejo de acilación β -lactamasa/chalcona, calculada al nivel HF/6-31G.

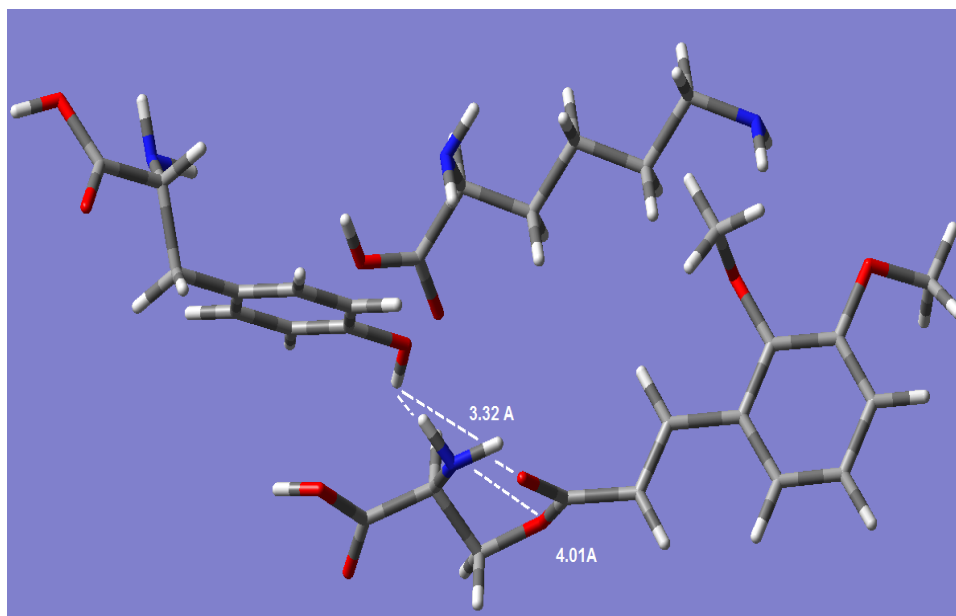


Figura 50. Geometría optimizada del complejo dimetoxifenilpropenona, calculada al nivel HF/6-31G.

La principal interacción intermolecular entre los aminoácidos catalíticos de la enzima β -lactamasa y la chalcona es la formación del enlace covalente entre el oxígeno de la Ser⁶⁴ y el carbono carbonílico de la chalcona, el complejo de inhibición formado se estabiliza a través de la formación de enlaces de hidrógeno con el residuo de Tyr¹⁵⁰.

Los estudios de modelación molecular del complejo de inhibición en la etapa de acilación y en la formación del complejo dimetoxifenilpropenona demuestran que la lisina en posición 67 establece enlaces de hidrógeno con los metoxilos del anillo B de la chalcona y el residuo de tirosina en posición 150 interactúa con el núcleo de la chalcona a través de los átomos de oxígeno, en la tabla 17 se presentan las distancias intermoleculares del complejo de acilación derivado de la interacción β -lactamasa/chalcona y del complejo dimetoxifenilpropenona, derivado de la pérdida del anillo A de la chalcona.

Tabla 17. Distancias intermoleculares en la interacción β -lactamasa/chalcona.

Tipo de interacción β -lactamasa/chalcona	Complejo de acilación	Complejo dimetoxifenilpropenona
	Distancia (Å)	Distancia (Å)
Tyr-OH ----- O-Ser	3.51160	4.01143
Tyr-OH ----- HO-Ser	2.85207	3.32579

Los valores obtenidos en cuanto a las distancias de los complejos de inhibición formados a partir de la interacción entre los residuos catalíticos de la enzima β -lactamasa y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, indican que las distancias intermoleculares en el complejo de acilación son menores en comparación con el complejo dimetoxifenilpropenona.

La optimización de los parámetros termodinámicos de los reaccionantes, el complejo de acilación, los productos de reacción y los estados de transición propuestos, permitieron conocer el perfil de energía libre y la viabilidad de la reacción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa. En la tabla 18 se presentan los valores de energía libre calculados al nivel HF/6-31G.

Tabla 18. Parámetros termodinámicos en la reacción inhibitoria de la chalcona sobre la enzima β -lactamasa.

Cálculos a HF/6-31G T=298,15 K P=1,0atm	G (Hartree)	ΔG (kJ/mol)
1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona	-916,0044680	
Serina	-396,4464020	
Estado de transición 1	-1312,369430	213,8
Complejo de acilación	-1312,431873	49,9
Estado de transición 2	-1312,284951	436,4
Serina-dimetoxifenilpropenona	-1042,928743	-41,6
Tolueno	-269,5379730	

El modo de acción inhibitorio de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa ocurre en dos etapas de reacción, en la primera etapa la serina activa de la enzima genera una reacción nucleofílica dirigida hacia el carbonilo de la chalcona y antes de la formación del enlace covalente del complejo de acilación, se presenta el primer estado de transición el cual se caracteriza por la transferencia del hidrógeno de la serina hacia el oxígeno carbonílico de la chalcona, de manera que esta primera etapa finaliza con la formación del complejo de acilación, con un valor calculado de energía libre correspondiente a 49.9 kJ/mol, tal como se representa en la figura 51.

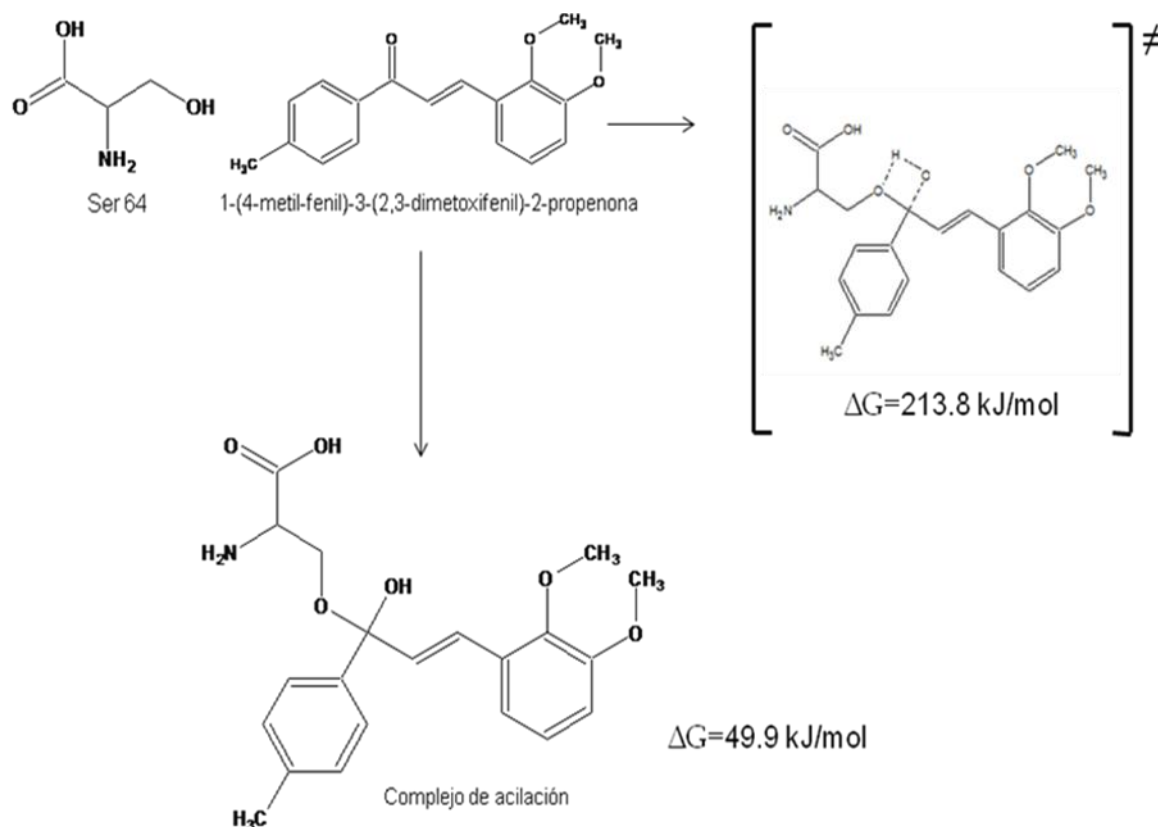


Figura 51. Representación esquemática de la formación del complejo de acilación β -lactamasa/chalcona en la primera etapa de la reacción inhibitoria, de acuerdo con los parámetros termodinámicos calculados al nivel HF/6-31G.

La reacción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa en la segunda etapa, continúa a partir del complejo de acilación y previo a la formación de los productos, se presenta el segundo estado de transición caracterizado por la transferencia del hidrógeno del complejo de acilación hacia el grupo arilo y de esta manera se originan los productos finales de la reacción, en la cual se destaca el complejo dimetoxifenil propenona como responsable del efecto inhibitorio. De acuerdo con los cálculos realizados, la energía libre de los productos de reacción es de -41.6 kJ/mol , este

valor comprueba la viabilidad de la reacción desde el punto de vista termodinámico, tal como se representa en la figura 52.

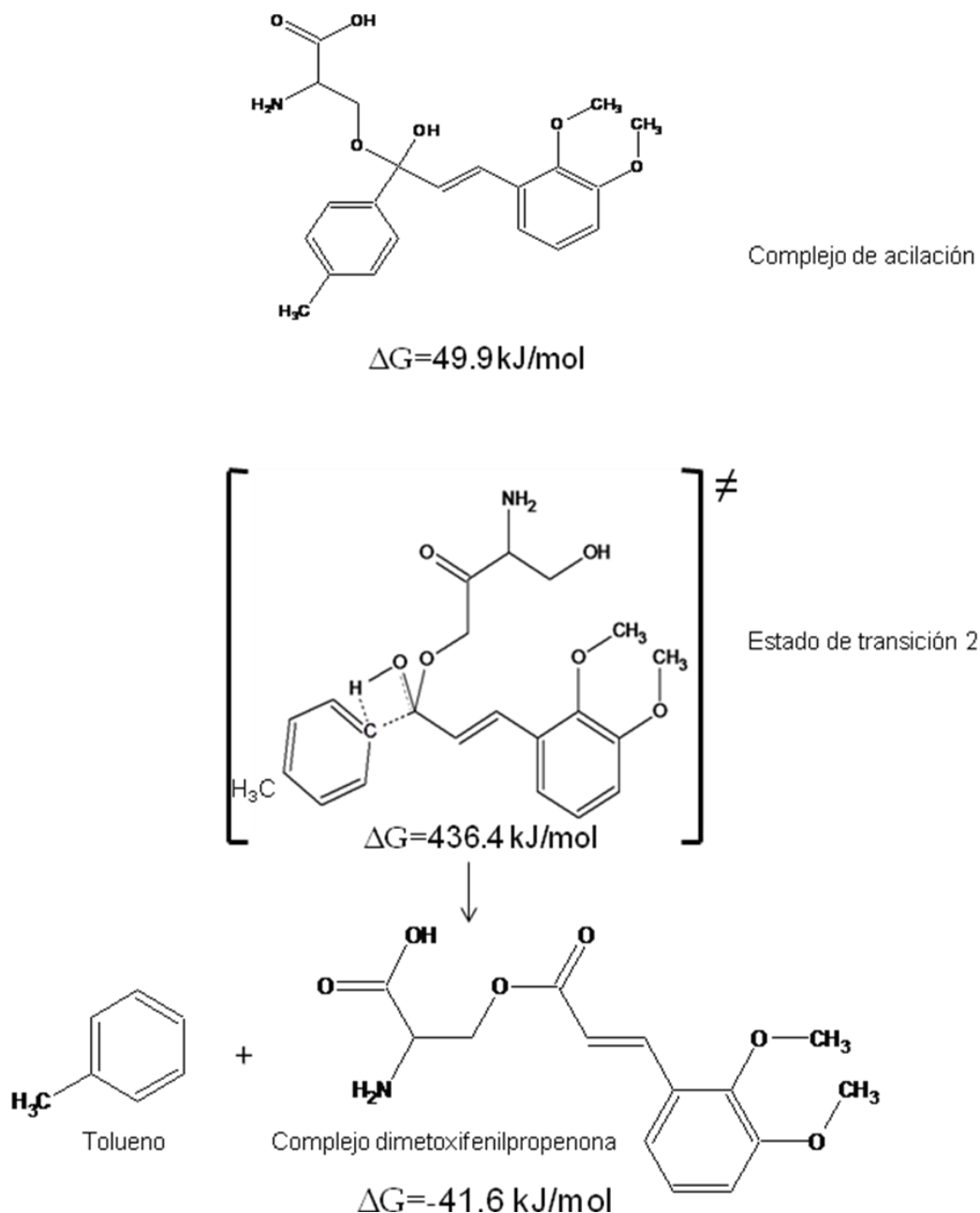


Figura 52. Representación esquemática de la formación del complejo dimetoxifenilpropenoa en la segunda fase de la reacción inhibitoria, de acuerdo con los parámetros termodinámicos calculados al nivel HF/ 6-31G.

La representación detallada de la reacción completa entre la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona y la enzima β -lactamasa, las estructuras de los estados de transición propuestos y los parámetros termodinámicos calculados se encuentran en la figura 53.

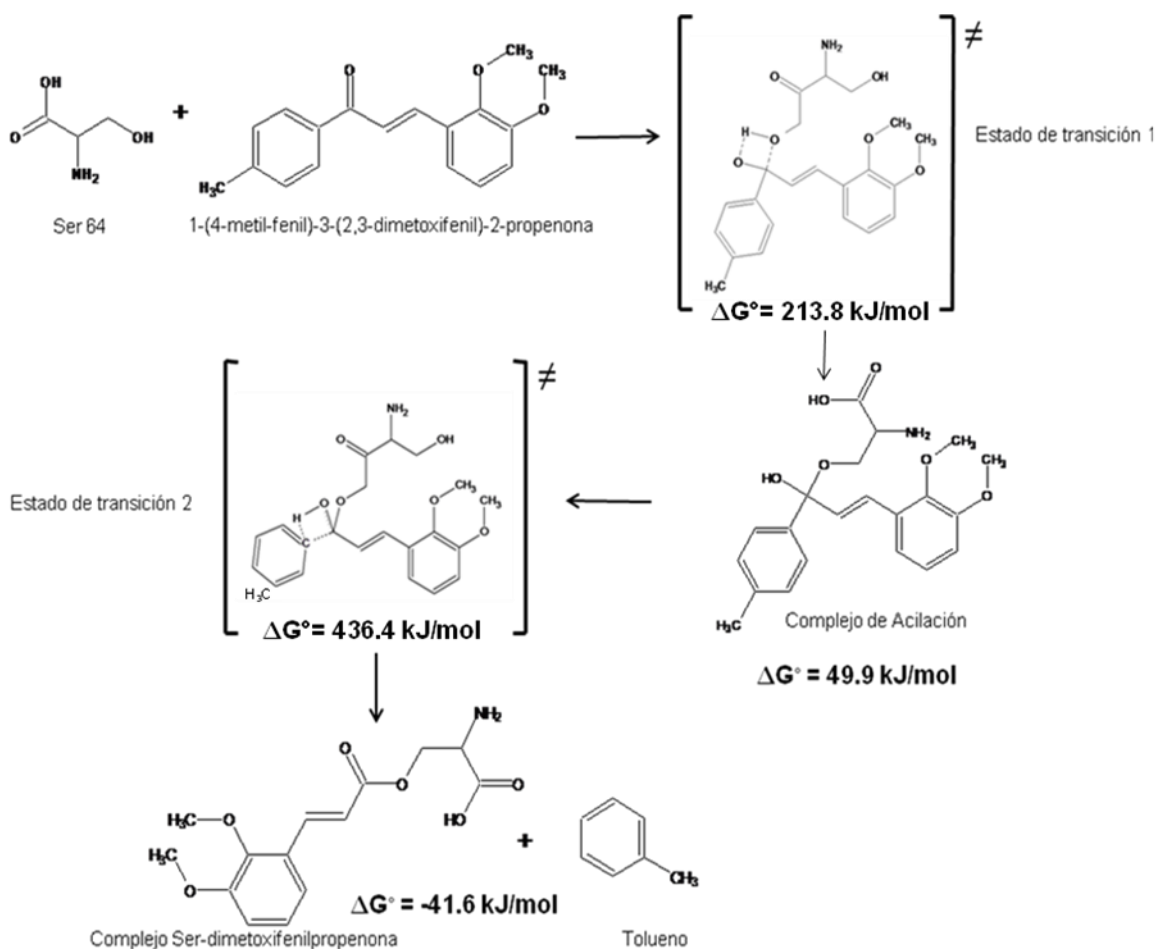


Figura 53. Representación esquemática de la reacción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa, de acuerdo con los parámetros termodinámicos.

Con la finalidad de representar los cambios de la energía libre de los reaccionantes, los estados de transición y los productos de reacción, ocurridos en el transcurso de la reacción inhibitoria, se calculó el perfil de energía libre de Gibbs, donde se esquematizan los valores calculados de energía libre en cada etapa de la reacción, en función de la coordenada de reacción inhibitoria, la gráfica correspondiente aparece en la figura 54.

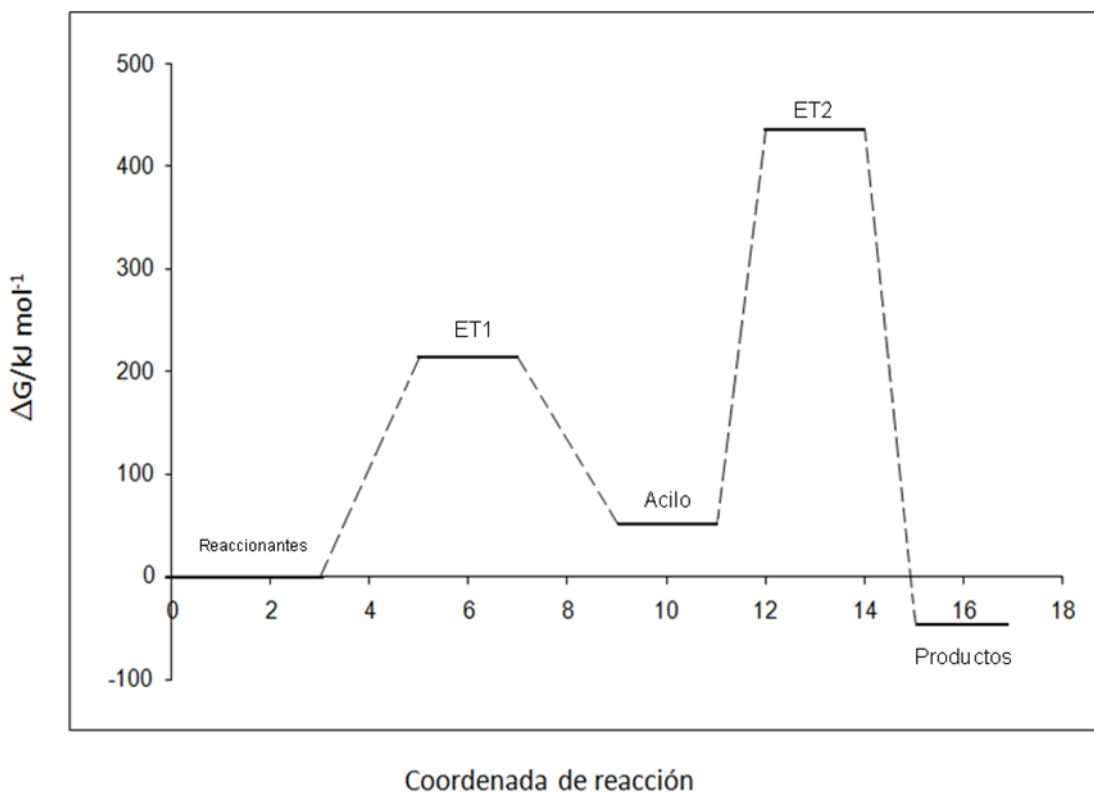


Figura 54. Perfil de energía libre de Gibbs en la reacción inhibitoria de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa.

En la primera etapa de la reacción posterior a la unión entre la serina nucleofílica del sitio activo de la enzima β -lactamasa y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona se genera el primer estado de transición con un valor de energía libre de 213.8 kJ/mol, el cual se estabiliza al formarse el complejo de acilación que presenta un valor de energía libre de 49.9 kJ/mol.

En la segunda etapa de la reacción, el complejo de acilación se transforma en el segundo estado de transición con un valor de energía libre de 436.4 kJ/mol, esta fase de la reacción ocurre de forma más lenta puesto que la barrera energética es mucho mayor y finalmente cuando ocurre la reacción de eliminación, se genera el complejo dimetoxifenil-propenona con un valor de energía libre de -41.6 kJ/mol, el cual confirma la viabilidad de la reacción inhibitoria de acuerdo con parámetros termodinámicos calculados.

7. CONCLUSIONES

7.1. La determinación experimental de los parámetros de cinética enzimática de la β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, como la velocidad máxima de $4,45 \times 10^{-4}$ $\mu\text{M}/\text{min}$ y la constante de afinidad correspondiente a $21,35 \mu\text{M}$ de ampicilina, permitieron establecer comparaciones y conocer el comportamiento de la enzima frente a los inhibidores evaluados.

7.2. La formación del complejo β -lactamasa-tazobactam está mediada por la inhibición competitiva e irreversible y se caracteriza por la unión covalente del inhibidor con el residuo Ser⁶⁴ del sitio activo de la enzima.

7.3. La chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona es un derivado de la benzalacetofenona con la capacidad de establecer el complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona que disminuye la afinidad de la β -lactamasa por la ampicilina sin afectar la velocidad catalítica de la reacción.

7.4. Las condiciones en la fuente de ionización y el voltaje en la trampa de iones en relación con los estudios realizados mediante espectrometría de masas facilitan la ruptura de algunos enlaces susceptibles en el tazobactam, de manera que experimentalmente se detectaron los iones moleculares correspondientes a la pérdida del grupo hidroxilo y del grupo carboxilato del tazobactam, estos compuestos se identificaron al realizar el análisis en las mismas condiciones experimentales con el tazobactam y con el producto de la digestión con tripsina del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam.

7.5. La separación mediante cromatografía líquida de alta resolución y el análisis mediante espectrometría de masas HPLC/ESI/IT/MS del liofilizado comercial de β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, permitió la determinación de la masa molecular de la enzima, la cual corresponde a 40046 Da, este valor se tomó como base para el análisis posterior de los complejos de inhibición.

7.6. El análisis de HPLC/ESI/IT/MS del complejo de inhibición β -lactamasa/tazobactam, permitió la detección de la unión covalente entre la enzima y el inhibidor en su forma de malonil semialdehído enol y la formación del aducto con agua, el cual genera un aumento de 106 Da en el peso molecular total de la β -lactamasa y está representado por una masa molecular de 40152 Da detectada mediante espectrometría de masas.

7.7. El complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona analizado mediante HPLC/ESI/IT/MS presenta una masa molecular de 40406 Da debido a la formación del complejo covalente con la chalcona de 282 Da y de un aducto con el DMSO de 78 Da, lo cual genera un aumento total de 360 Da en el peso molecular detectado para la enzima β -lactamasa.

7.8. Al comparar los resultados experimentales del producto de la tripsinización de la enzima comercial β -lactamasa P99 de *Enterobacter cloacae*, con la información reportada en la base de datos ExPasy de proteómica, se lograron identificar 12 péptidos trípticos de la enzima con sus respectivas secuencias, incluyendo principalmente el péptido del sitio activo en el que se encuentran la serina y la lisina catalíticas.

7.9. El análisis del producto de las digestiones con tripsina de los complejos de inhibición β -lactamasa/tazobactam y β -lactamasa/chalcona permitió calcular los aumentos en la masa molecular de la enzima, tomando como base el péptido del sitio activo comprendido entre las posiciones 46 y 67 correspondientes a la secuencia ADIAANKPVTPQTLFELGSISK en la que aparecen los aminoácidos catalíticos, serina en posición 64 y lisina en posición 67, la masa molecular de este péptido detectada mediante espectrometría de masas es de 2300 Da.

7.10. De acuerdo con los aumentos detectados en el peso molecular del péptido del sitio activo de la β -lactamasa y con base en el soporte bibliográfico se puede establecer la secuencia de reacciones que ocurren en el proceso de inactivación de la enzima por parte del tazobactam, el cual se inicia con la reacción de acilación entre la serina catalítica en posición 64 del sitio activo de la enzima y el carbonilo betalactámico del tazobactam, generando un aumento de 300 Da en la masa molecular de la enzima, luego se forma un intermediario estable de tipo enamina y se presentan rupturas de los enlaces más susceptibles en la estructura química del tazobactam, las cuales representan aumentos de 284, 256 y 232 Da y finalmente la enzima permanece inhibida de forma irreversible por la formación de un complejo estable con un derivado propiolilado del tazobactam con una masa molecular de 52 Da.

7.11. En el análisis mediante HPLC/ESI/IT/MS del complejo β -lactamasa/tazobactam tripsinizado se detectó la formación de varios complejos de inhibición mediados por la unión covalente con la serina catalítica del sitio activo y que no han sido reportados previamente como en el caso de las masas moleculares correspondientes al complejo enamina, complejo de deshidroxilación, complejo de descarboxilación y complejo con el tazobactam debido a la pérdida del anillo aminotetrazolio.

7.12. Mediante la técnica de HPLC/ESI/IT/MS se logró determinar los diferentes fragmentos del tazobactam derivados de la acción catalítica, los cuales son formados por rompimientos en los enlaces más susceptibles del tazobactam y generaron los siguientes aumentos en la masa molecular del péptido del sitio activo de la enzima: la deshidroxilación del tazobactam generó un aumento de 284 Da, la descarboxilación del tazobactam generó un aumento de 256 Da y la pérdida del anillo aminotetrazolium generó un aumento de 232 Da en el péptido del sitio activo de la enzima, quedando finalmente un fragmento con peso molecular 2352 Da, correspondiente a la unión en el sitio activo de la enzima de un fragmento de tazobactam de 52 Da.

7.13. El análisis del producto de la proteólisis del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona mediante HPLC/ESI/IT/MS permitió la detección del complejo de acilación generado entre la enzima β -lactamasa y la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona en forma de aducto con DMSO, de tal manera que se presentó un aumento total de 360 Da en el péptido del sitio activo de la enzima, con un porcentaje de 58,42% de abundancia relativa en la población de iones obtenidos.

7.14. El modo de acción inhibitorio de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona sobre la enzima β -lactamasa comienza con la formación del complejo de acilación y continúa con la reacción de eliminación, para favorecer la formación del fragmento dimetoxifenil-propenona de la chalcona, este complejo se detectó mediante espectrometría de masas con una masa molecular de 2507 Da y un porcentaje de abundancia relativa de 37,89%.

7.15. Los estudios teóricos de optimización de la geometría de los residuos catalíticos de la enzima β -lactamasa y los complejos de inhibición formados con la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, permitieron establecer las interacciones mediadas por puentes de hidrógeno y determinar las distancias intermoleculares, a partir de estos cálculos se evidenció mayor estabilidad en el complejo de acilación con la chalcona en comparación con el complejo formado con el fragmento de dimetoxifenil-propenona derivado de la chalcona, lo cual tiene relación con los porcentajes de abundancia relativa de los iones detectados mediante espectrometría de masas.

7.16. El modo de acción de la chalcona 1-(4-metil-fenil)-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-propenona, ocurre en dos etapas y se inicia a partir de la reacción nucleofílica por parte del péptido del sitio activo de la β -lactamasa con el carbonilo de la chalcona para la formación del complejo de acilación y en la segunda etapa de la reacción se libera el grupo arilo de la chalcona y se presenta la formación del complejo dimetoxifenil-propenona a través de la reacción de eliminación, dando como resultado la inactivación de la enzima, tal como se evidencia en el análisis de espectrometría de masas.

7.17. El análisis del complejo de inhibición β -lactamasa/chalcona mediante HPLC/ESI/IT/MS y los estudios teóricos al nivel HF/6-31G permitieron plantear el modo de acción inhibitorio de la chalcona, el cual se inicia con una reacción de adición nucleofílica seguida por la reacción de eliminación para generar un complejo de inhibición estable con un valor de energía libre de -41.6 kJ/mol que representa la viabilidad de la reacción propuesta desde el punto de vista termodinámico.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ligon, B.L. 2004. *Penicillin: Its Discovery and Early Development*. Seminars in Pediatric Infectious Diseases. **15**: 52-57.
2. Butler Mark. 2005. *Natural Products-The future Scaffolds for novel Antibiotics?*. Biochemical Pharmacology. **30**: p. 1-11.
3. Ligon, B.L. 2004. *Sir Alexander Fleming: Scottish Researcher Who Discovered Penicillin*. Seminars in Pediatric Infectious Diseases. **15**: 58-64.
4. McDevitt Damien, R.M. 2001. *Exploiting genomics to discover new antibiotics*. Trends in Microbiology. **9**: 611-617.
5. Miller, E.L. 2002. *The penicillins: a review and update*. Journal of Midwifery & Women's Health. **47**: 426-434.
6. Christine C. Sanders, Patricia A. Bradford, Anton F. Ehrhardt, Karen Bush, Kevin D.Young, Thomas A. Henderson, and W. Eugene Sanders. 1997. *Penicillin-Binding Proteins and Induction of AmpC β -Lactamase*. Antimicrob. Agents Chemother. **9**: 2013-2015.
7. Williams, J.D. 1999. *β -Lactamases and β -lactamase inhibitors*. International Journal of Antimicrobial Agents. **12**: S3-S7.
8. Kingston, W. 2000. *Antibiotics, invention and innovation*. Research Policy. **29**: 679-710.
9. Gerald L. Mandell, D., and Bennett's. , *Basic Principles in the Diagnosis and Management of Infectious Diseases*. 2005, Livingstone: Elsevier.
10. Levy, S.B. 2001. *Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction*. Clinical Infectious Diseases. **33**: 253-270.
11. Crespo., M.d.P. 2005. *La resistencia bacteriana: estamos preparados para detectarla?* Infectio. **9**: 31-45.
12. David G. White, Shaohua Zhao, Robert Sudler, Sherry Ayers, Sharon Friedman, et al. 2001. *The isolation of antibiotic resistant Salmonella from retail ground meats*. . The New England Journal Medicine. **345**: 1147-1154.
13. Fred C. Tenover. 2001. *Development and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents: An Overview*. Clinical Infectious diseases. **33**: S108-S115.
14. Gerard D. Wright. 2005. *Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modificación*. Advanced Drugs Delivery Reviews. **57**: 1451-1470.
15. Livermore David M. 1995. *β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance*. Clinical Microbiology Review. **8**: 557-584.

16. Bush Karen. 1989. *Characterization of β -Lactamases*. Antimicrobial Agents Chemotherapy. **33**: 259-263.
17. Bush Karen, Jacoby George A, Medeiros Antone A. 1995. *A functional Clasification Scheme for β -Lactamases and its correlation with Molecular Structure*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**: 1211-1233.
18. Livermore David M. 1998. *β -Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control*. Journal Antimicrobial Chemotherapy. **41**: 25-41.
19. Kenneth S. Thomson, E.S.M. 2000. *Version 2000: the new B -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium*. Microbes and Infection. **2**: 1225-1235.
20. Jacoby George A., 2006. *β -Lactamase Nomenclature*. Antimicrob. Agents and Chemother. **50**: 1123-1129.
21. Bush Karen. 1989. *Classification of β -Lactamases: Groups 1,2a, 2b, y 2b'*. Antimicrob. Agents Chemother. **33**(264-270): 264.
22. Bush Karen. 1989. *Classification of β -Lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4*. Antimicrob. Agents Chemother. **33**: 271-276.
23. Moreno Galleni, J.L.-B., Xavier Raquet, Alain Dubus, Didier Monnaie, James R. Knox and Jean-Marie Frere. 1995. *The enigmatic catalytic mechanism of active-site Serine B -lactamases*. Biochemical Pharmacology. **49**: 1171-1178.
24. Frère, J.-M. 1995. *Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics*. Molecular Microbiology. **16**: 385-395.
25. Fahd K. Majiduddin, I.C.M., Timothy G. Palzkill. 2002. *Molecular analysis of Beta-lactamase structure and function*. Int. J. Med. Microbiol. **292**: 127-137.
26. Moreno Galleni, F.L., Staffan Normark, Stewart Cole, Nadine Honore, Bernard Joris and Jean-Marie Frere. 1988. *Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae ampC* B -lactamase genes and their products*. Biochem. J. **250**: 753-760.
27. Gygi Steven P., Aebersold Ruedi. 2000. *Mass spectrometry and proteomics*. Current Opinion in Chemical Biology. **4**: 489-494.
28. Bioinformatics. *ExpASy Proteomics Server*. [Consultada 2010 Octubre 10]; Disponible en: <http://ca.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl>.
29. Bush Karen, Sykes Richard B. 1986. *Methodology for the Study of P -Lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. **30**: 6-10.

30. Marion S. Helfand, Robert A. Bonomo. 2005. *Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum b-lactamases and metallo-b-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens*. Current Opinion in Pharmacology. **5**: 452-458.
31. Scott K. Fridkin, Robert P. Gaynes. 1999. *Antimicrobial resistance in intensive care units*. Clinics in Chest Medicine. **20**: 303-315.
32. Howard S. Gold, Robert C. Moellering. 1996. *Antimicrobial-Drug Resistance*. New England Journal Medicine. **335**: 1445-1453.
33. Instituto Nacional de Salud. 2010 [Consultada Junio 15 de 2010]; Disponible en: <http://www.ins.gov.co/>.
34. Maria Virginia Villegas, A.C., Federico Perez, Maria Consuelo Miranda, Tania Zuluaga, John P. Quinn. 2004. *Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates from Colombian hospitals*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **49**: 217-222.
35. Michael A. Pfaller, R.N.J., Gary V. Doern, and Juan C. Salazar. 1999. *Multicenter Evaluation of Antimicrobial Resistance to Six Broad-Spectrum b-Lactams in Colombia: Comparison of Data From 1997 and 1998 Using the Etest Method*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **35**: 235-241.
36. GREBO., Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá. [consultada 23 de Abril de 2010.]; Disponible en: <http://www.grebo.org/>.
37. GERMEN, Grupo para el estudio de la resistencia a antibióticos en Medellín. 2010 [consultada 23 de Abril de 2010]; Disponible en: <http://www.grupogermen.org/>.
38. Organización Mundial de la Salud, *Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos*, OMS Editor. 2001.
39. Maja Babic, Andrea M. Hujer, Robert A. Bonomo. 2006. *What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases*. Drug Resistance Updates. **9**: 142-156.
40. Coleman Kent. 2006. *Extending the life of β -lactam antibiotics: New b-lactamase inhibitors*. Drug Discovery Today. **3**: 183-188.
41. Nydia A. Kuck, Nilda V. Jacobus, Michael D. Spengler, Raymond T. Testa. 1996. *In vitro activity of piperacillin/hazobactam against isolates from patients enrolled in clinical trials*. International Journal of Antimicrobial Agents **7**: 15-21.
42. Robert A. Bonomo, J.L., Yonghong Chen, Lily Ng, Andrea M. Hujer, Vernon E. Anderson. 2001. *Inactivation of CMY-2 L-lactamase by tazobactam: initial mass spectroscopic characterization*. Biochimica et Biophysica Acta. **1547**: 196-205.

43. Cañas Benito, L.-F.D., Ramos-Fernández Antonio, Camafeita Emilio and Calvo Enrique. 2006. *Mass spectrometry technologies for proteomics*. Briefings in functional genomics and proteomics. **4**: 295-320.
44. Takahashi Nobuhiro, I.T., *Proteomic Biology Using LC-MS*. . 2008: Wiley – Interscience.
45. Marc R Wilkins, R.D.A., Keith L. Willimas, Denis F. Hochstrasser. *Proteome Research: Concepts, technology and application*. Second Edition ed. 2007: Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York.
46. Vachet, G.L.G.R.W. 2003. *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nature Reviews Drug Discovery. **2**: 140-150.
47. Micetich RG, S.S., Maiti SN, Reddy AVN, Singh R. 2002. *β -Lactamases and their Inhibitors: An Update*. Current medicinal chemistry anti infective agents. **1**: 193-213.
48. Zhang Junmei, Brodbelt Jennifer S. 2003. *Structural characterization and isomer differentiation of chalcones by electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. **38**: 555-572.
49. C.X. Xue, S.Y.C., M.C. Liu, Z.D. Hu, B.T. Fan. 2004. *3D QSAR studies on antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones by CoMFA and CoMSIA*. European Journal of Medicinal Chemistry . **39**: 745-753.
50. Shen-JeuWon, C.-T.L., Lo-Ti Tsao, Jing-RuWeng, Horng-Huey Ko, Jih-PyangWang, Chun-Nan Lin. 2005. *Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents*. European Journal of Medicinal Chemistry. **40**: 103-112.
51. Felipe Herencia, M.L.F., Amalia Ubeda, JoséN. Domínguez, Jaime E. Charris, Gricela M. Lobo, M. José Alcaraz. 1998. *Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. **8**: 1169-1174.
52. Ruby John Anto, K.S., Girija Kuttan, M.N.A. Rao, V. Subbaraju, Ramadasan Kuttan. 1995. *Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds*. Cancer Letters. **97**: 33-37.
53. X.L. Liu, Y.J.X., M.L. Go. 2008. *Functionalized chalcones with basic functionalities have antibacterial activity against drug sensitive Staphylococcus aureus*. European Journal of Medicinal Chemistry. **43**: 1681-1687.
54. Frédéric Bois, A.B., Anne-Marie Mariotte, Gwenaëlle Conseil, Attilio Di Petro. 1999. *Synthesis and biological activity of 4-alkoxy chalcones: potential hydrophobic modulators of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. **7**: 2691-2695.

55. Cristina L. Mora, Maria Consuelo Jaramillo, Luis Esteban Vélez, Jelver Alexander Sierra. 2008. *Determinación de la capacidad inhibitoria de chalconas sobre Staphylococcus aureus productor de β -lactamasa*. Noticias Químicas. **30**: 91-92.
56. Consuelo Jaramillo, Cristina Mora, Luis E. Vélez, Gabriel J. Arango, Jairo Quijano. 2005. *Evaluation of Aromatic Compounds as β -Lactamase Inhibitors*. Pharmacologyonline. **3**: 650-655.
57. Jaramillo Consuelo, Mora Cristina, Vélez Luis Esteban, Quijano Jairo. 2009. *Kinetic and Theoretical Study of the Chalcones as Inhibitors of β -Lactamase Enzyme*. Medicinal Chemistry. **5**: 434-439.
58. Biotechnology, P. *In solution tryptic digestion and guanidination kit*. 2004. Disponible en: www.piercenet.com.
59. Youjun Yang, K.J., Keiko Tabei, Nelson Huang, Marshall M. Siegel, Yang-I Lin, Beth A. Rasmussen, and David M. Shlaes. 2000. *Mechanism of Inhibition of the Class A β -Lactamases PC1 and TEM-1 by Tazobactam*. The Journal of Biological Chemistry. **275**: 26674-26682.
60. M.J. Frisch, G.W.T., H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery, R.E. Stratmann Jr., J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. and A.D.D. Millam, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Omaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, *Gaussian 98*. 1998: Pittsburgh.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos al comité tutorial, integrado por la Dra. Consuelo Jaramillo, el Dr. Edison Osorio y el Dr. Jairo Quijano, su asesoría y acompañamiento constante permitieron la realización exitosa del presente trabajo de investigación.

A mi asesora del trabajo de investigación, la Dra. Consuelo Jaramillo por su orientación en este proceso de formación y por compartir conmigo sus conocimientos para el logro de los objetivos propuestos.

A la Universidad de Antioquia y al CODI, a través del proyecto CIQF-097 y del proyecto de Estrategia de Sostenibilidad Sostenibilidad.

Al postgrado en Ciencias Farmacéuticas, por la formación académica y la gestión administrativa.

Al Dr. César Segura y a Carlos Uribe en la unidad de espectrometría de masas de la SIU, por su apoyo en la realización de las actividades experimentales.

Al grupo de fisicoquímica Orgánica de la Universidad Nacional, dirigido por el Dr. Jairo Quijano, por la asesoría en los estudios teóricos computacionales.

Al comité de evaluadores integrado por la Dra. Ederley Vélez, la Dra. Consuelo Jaramillo y el Dr. Fernando Echeverry, por sus valiosos aportes que permitieron consolidar el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Gabriel Jaime Arango, director del grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas por brindarme la oportunidad de pertenecer a este gran equipo de trabajo.

A mi familia, especialmente a mi mamá Ernestina, quiero expresarles mis sentimientos de amor y gratitud.

Los más sinceros agradecimientos a mis amigos del Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas: a Consuelo, Gabriel Jaime, Neifer, Nora, Julián, Katalina, Guillermo, Jelver, Rafael, y Edison, por su acogida y apoyo desde el inicio de mis actividades en el grupo de investigación. A Karent, Oscar, Andrés y Luis Esteban por los buenos momentos que compartimos en nuestra formación académica. A los jóvenes investigadores: Jeniffer, David, Johana, Catalina, Julián Vanegas, Tatiana, Alejandra y Julián Castaño por su constante colaboración.

A todos los integrantes del Grupo de Inmunomodulación, dirigido por el Dr. Robinson Ramírez: Natalia, Yudy, Jorge, Maria, Diana, Kathy, Camilo y Alex. Gracias a todos por su amistad y apoyo incondicional.