

00572

525



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA
ESTREPTOMICINA Y DE LA ESTREPTIDINA FRENTE A
IONES METALICOS Y EN DIFERENTES MEDIOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA INORGANICA)
P R E S E N T A :
G. ALBERTO TOXQUI TERAN



MEXICO, D.F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274626



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Graciela Meza Ruiz
Primer vocal	Dr. Manuel Fernando Rubio Arroyo
Secretario	Dra. Laura María Gasque Silva
Primer suplente	Dr. David Díaz
Segundo suplente	Dr. Sylvain Bernés

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.



Q. Alberto Toxqui Terán

Sustentante



Dra. Norah Y. Barba Behrens

Asesora

AGRADECIMIENTOS

A Yahvéh

A México

A mi familia

A la U.N.A.M. y a la Facultad de Química por las facilidades otorgadas para la realización de éste trabajo.

Shemá

“Ojo por ojo y el mundo se quedará ciego”
Mahatma Gandhi

“Tengo un sueño...”
Martin Luther King

“La ciencia es explorar y divertirse. La imaginación es más
importante que el conocimiento”
Albert Einstein

Agradecimientos

A la Dra. Noráh Y. Barba Behrens por su asesoría y consejos en la realización de esta tesis.

A la Dra. Graciela Meza Ruiz por sus contribuciones a este trabajo.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Sylvain Bernés por la obtención de la estructura cristalina.

A la Q. Marisela Gutierrez Franco por la obtención de los espectros de infrarrojo.

A Oscar Yañez M. por la obtención de los espectros de RMN en disolución.

Al Dr. Guillermo Mendoza Díaz por la obtención de los espectros de RMN en estado sólido.

A la Q. Carmen Vazquez Ramos por la obtención de los análisis termogravimétricos.

Al Dr. Anatoli Iatsimirski y al Dr. David Díaz por permitirme usar el espectrofluorometro empleado en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico prestado durante mis estudios de maestría, así como a los proyectos E-27876 de CONACyT y DGAPA IN222096.

INDICE

	Página
Glosario	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Introducción	vi
I. Antecedentes	
1.1. Generalidades.	1
1.2. Características de la estreptomicina.	2
1.3. Actividad antimicrobiana de la estreptomicina.	3
1.4. Reacciones características de la estreptomicina.	3
1.5. Compuestos propuestos con estreptomicina.	4
Objetivos	6
II. Metodología	
2.1. Parte experimental.	
2.1.1. Reactivos.	7
2.1.2. Instrumentación	7
2.1.3. Síntesis	8
2.1.3.1. Obtención del sulfato de estreptidina.	
2.1.3.2. Obtención de las sales clorhidrato.	
2.1.3.3. Método general de preparación de los compuestos con sulfato de estreptomicina.	
2.1.3.4. Método general de preparación de los compuestos con clorhidrato de estreptomicina y estreptidina.	
2.1.4. Análisis elementales.	8
2.1.5. Método para la trimetilsililación de aminoazúcares.	10
2.2. Parte teórica.	11

III. Resultados y discusión

3.1. Estudio experimental acerca de la estreptomicina y la estreptidina.	
3.1.1. Espectroscopía de infrarrojo.	12
3.1.2. Análisis por RMN.	
3.1.2.1. RMN de ^{13}C de la estreptomicina.	14
3.1.2.1. RMN de ^{13}C de la estreptidina.	17
3.1.3. Estudio por difracción de rayos-X del sulfato de estreptomicina.	19
3.1.4. Análisis de los espectros electrónicos de absorción en la región UV-vis.	22
3.1.5. Estudio fluorométrico.	24
3.2. Estudio teórico acerca de la estreptomicina y de la estreptidina.	27
3.3. Estudio por espectroscopia UV, RMN y CG de la reacción de hidrólisis de estreptomicina.	33
3.4. Análisis espectrofotométrico de la estreptomicina frente a iones metálicos.	43
3.4.1. Caracterización de los compuestos obtenidos con estreptomicina y estreptidina.	44
Conclusiones	53
Perspectivas	54
Bibliografía	55
Apéndice	
I. Información cristalográfica del $(\text{STD})(\text{H}_2\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})$.	58
II. Métodos químico-teóricos.	62
Anexos	
I. Constantes de disociación ácida, pKa.	67
II. Análisis termogravimétrico (TGA)	68

GLOSARIO

STP	Estreptomicina
STD	Estreptidina
M	Molaridad
N	Normalidad
UV	Ultravioleta (200-400nm)
UV-vis	Ultravioleta-visible (200-2500nm)
A_r	Absorbancia relativa (reflectancia difusa, sólido)
λ (nm)	Longitud de onda de absorción (nanómetros)
ν (cm ⁻¹)	Número de onda (centímetros a la menos uno)
F (c.p.s.)	Fluorescencia (cuentas por segundo)
$\lambda_{\text{emisión}}$ (nm)	Longitud de onda de emisión (nanómetros)
IR	Infrarrojo (4000-450 cm ⁻¹)
calc.	Calculado
exp.	Experimental
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
ppm	partes por millón
Å	Angstrom (10 ⁻¹⁰ m)
MeOH	Metanol
μ (MB)	momento magnético (magnetones de Bohr, MB)
μ_e (Debye)	momento dipolar eléctrico (Debye)
PM3	MNDO parametrizado (<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i>)
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
ΔH_f	calor de formación
CG	Cromatografía de gases
EM	Espectroscopía de masas
I	Fuerza iónica
T(°C)	Temperatura (grados Celcius)
TGA	Análisis termogravimétrico

RESUMEN

En la presente tesis se efectúa el estudio del comportamiento de la estreptomina y de la estreptidina frente a iones metálicos y en diferentes medios. Para lo cual, se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico de la estreptomina y estreptidina, en estado sólido y en disolución. Adicionalmente, se llevaron a cabo reacciones de estreptomina y de estreptidina con sales de Co(II), Ni(II), Cu(II), y Ca(II) en diferentes condiciones de reacción y se realizó un análisis teórico conformacional de la estreptomina y la estreptidina, así como el estudio de la influencia de los grupos guanidinos sobre la fluorescencia característica que presenta la estreptomina.

Los resultados que se obtuvieron muestran que la estreptomina en medio ácido produce estreptidina, y en medio básico se detecta la presencia de maltol, un derivado inositolico y de un derivado furanósico. Se observó que la estreptomina presenta una conformación helicoidal estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares, siendo los grupos guanidinos no equivalentes y responsables de la fluorescencia que exhibe la estreptomina y la estreptidina. Así mismo, se encontró que los iones metálicos de transición y el ion calcio desplazan al ion sulfato.

ABSTRACT

In the present thesis a behavioral study of streptomycin and streptidine towards metal ions and in different media was carried out. Spectrophotometric analysis of streptomycin and streptidine, in solid state and in solution, were performed. Additionally, reactions of streptomycin and streptidine with Co(II), Ni(II), Cu(II), and Ca(II) salts in different conditions were studied. A conformational theoretical analysis of streptomycin and streptidine was carried out. Also a study about the characteristic fluorescence presented by streptomycin.

The obtained results showed that streptomycin in acidic media produces streptidine, and in basic media is detected the presence of maltol, a inositolic derivative and a furanolic derivative. It was observed that streptomycin presents a helicoidal conformation stabilized by intramolecular hydrogen bonds, being the guanidines groups not equivalent and responsible of the fluorescence that streptomycin and the streptidine exhibit. Also, it was found that the transition metal ions and the calcium ion displace the sulfate ion and they occupy the same interaction site.

INTRODUCCION.

Hoy en día el uso de los antibióticos está muy generalizado, en particular el de los aminoglicósidos como la estreptomina. La estreptomina se emplea en el tratamiento contra las infecciones por bacterias Gram negativas resistentes a otros antibióticos. Desde que se inició su empleo por allá de los años 40's, se describió que este antibiótico tenía efectos vestibulotóxicos muy severos. Más adelante se desarrollaron otros aminoglicósidos semisintéticos que si bien no eran tóxicos para la función vestibular, lo eran para la parte auditiva, y todos ellos eran nefrotóxicos. Aunque todos ellos son estructuralmente muy parecidos, aún no se sabe a que parte de la molécula se debe su oto o nefrotoxicidad, por lo que la dilucidación de sus propiedades químicas es de suma importancia tomando como modelo a la estreptomina (STP).

Se ha propuesto que los iones metálicos influyen en la actividad antimicrobiana de la estreptomina, en particular el calcio ^{1,2,3}. En estudios precedentes se ha analizado el comportamiento de la estreptomina frente a algunos iones metálicos en disolución, pero las características de los probables compuestos de coordinación que se forman todavía no han sido dilucidadas ^{5,6,7,8,9}. Por consiguiente, ya que ha propuesto una posible interacción del antibiótico con algún ion metálico, se planteó llevar a cabo un estudio de la interacción de la estreptomina con iones metálicos de interés biológico como: Co(II), Ni(II), Cu(II), y Ca(II), teniendo como propósito el determinar los sitios probables de coordinación y el comportamiento de la estreptomina (STP) y la estreptidina (STD), ante iones metálicos particularmente en medio acuoso y metanólico.

Por otro lado, se ha observado que la inyección intramuscular de estreptomina induce la acumulación de un compuesto fluorescente en el oído interno de roedores. Para investigar si esta fluorescencia es debida a la STP por si misma, a uno de sus productos de degradación, o a una modificación química de la molécula, se realizaron una serie de experimentos fluorométricos con la STP en diferentes disoluciones acuosas amortiguadas.

En el presente trabajo se muestra, inicialmente (capítulo I) una revisión bibliográfica sobre los aspectos químicos y clínicos más relevantes en torno a la estreptomina. Posteriormente, se presenta la metodología empleada, así como los análisis elementales de los compuestos usados (capítulo II). Con el objeto de facilitar la discusión y el análisis de los resultados obtenidos, el capítulo III se divide en varias secciones.

En la sección 3.1 y 3.2 se presenta el estudio realizado en torno de las características de la STP y la STD en estado sólido , en disolución, y de acuerdo a los cálculos teóricos. En la sección 3.3 se expone y analiza la reacción de hidrólisis de estreptomina por UV, RMN y CG, y por último, en la sección 3.4, se muestra el análisis espectrofotométrico de la estreptomina y la estreptidina frente a iones metálicos. Después, se presenta la bibliografía consultada y las conclusiones. Por último, en el apéndice I se presentan antecedentes relevantes en torno a los estudios químico-teóricos, y en el apéndice II se muestran los datos cristalográficos del sulfato de estreptidina.

I. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades.

Los aminoglicósidos son químicamente similares pues tienen una o dos bases derivadas del scilo inositol, unidas a dos o tres aminoazúcares¹⁰. La base en la estreptomina es la estreptidina, y en todos los demás aminoglicósidos la base es la 2-deoxiestreptamina (fig.1). Los aminoazúcares están unidos por enlaces glucosídicos, de ahí su nombre.

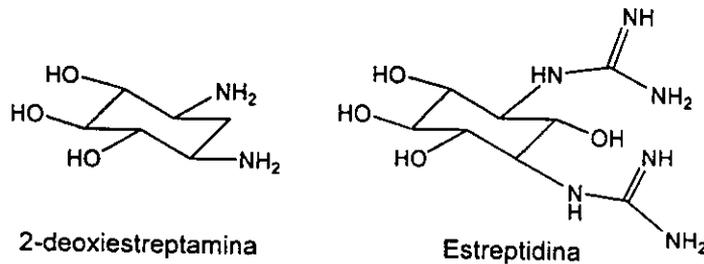


Figura 1. Bases derivadas del scilo-inositol.

Se han desarrollado cuatro clases de aminoglicósidos, que a su vez están divididos en sus derivados: la estreptomina (estreptomina y dihidroestreptomina), la kanamicina (kanamicina, amikacina y tobramicina), la neomicina (neomicina) y la gentamicina (gentamicina y netilmicina)¹⁰. Todos los aminoglicósidos se derivan de especies del género *Streptomyces*, con excepción del grupo gentamicina que se origina de *Micromonospora purpurea*, *M. Echinospira* y *M. Actinomyctes*.

Los aminoglicósidos se presentan como polvos blancos o amarillentos, inodoros y sumamente higroscópicos, pero estables en solución y resistentes a los cambios de pH (2 a 12), así mismo, son muy solubles en agua pero poco en disolventes orgánicos. Los productos base tienen un pH fuertemente alcalino, mientras que los sulfatos tienden a ser ligeramente ácidos¹⁰.

Estos fármacos son pobremente absorbidos por el tubo intestinal, por lo cual, son generalmente administrados por inyección intramuscular, y se dice que se eliminan por vía urinaria en más del 90%. Dado que son policatiónicos, cruzan las membranas muy pobremente y aún está en duda si son o no metabolizados.

Estos antibióticos administrados en dosis elevadas y prolongadas, pueden producir tres importantes efectos adversos: i) nefrotoxicidad, que resulta de la insuficiencia renal y la necrosis de los túbulos renales, ii) ototoxicidad, que se presenta como la destrucción de las células sensoriales en el aparato vestibular y en el coclear, y iii) parálisis neuromuscular, que se manifiesta como una parálisis respiratoria, que se antagoniza (contrarresta) al administrar calcio¹.

Durante el tratamiento con cualquier aminoglicósido, se puede afectar el oído ya sea su porción coclear o la vestibular ¹⁰. Dependiendo del órgano afectado y el avance del daño, el resultado puede ser la pérdida del equilibrio, vértigo, ataxia (trastorno en la coordinación del movimiento voluntario), y pérdida de la audición (parte coclear). La dihidroestreptomina, la neomicina, la paromomicina, la aminosidina y la kanamicina afectan primariamente a la parte coclear, mientras que la estreptomina, la gentamicina y la tobramicina lo hacen, fundamentalmente, sobre la vestibular. La dihidroestreptomina ha sido abandonada y retirada de algunas farmacopeas por la facilidad con que provoca sorderas, generalmente irreversibles, incluso en recién nacidos cuyas madres habían sido tratadas con este antibiótico durante el embarazo ¹¹.

La ototoxicidad de estos antibióticos está en relación con su acumulación en la perilinfa coclear y parece que la netilmicina es, de todos ellos, el que se elimina de ésta con mayor rapidez, lo que podría explicar la menor incidencia de alteraciones auditivas o vestibulares en animales de experimentación ¹² y durante el tratamiento de enfermos con éste antibiótico; así, la ototoxicidad de la netilmicina es significativamente menor que la de la tobramicina ¹³.

1.2. Características de la estreptomina.

La STP es un antibiótico aminoglicósido, cuyo nombre químico es "o - 2 - desoxi - 2 - (metilamino) - α - L - glucopiranosil - (1→2) - o - 5 - desoxi - 3 - c - formil - α - L - luxafuranosil -(1→4) - N,N' - bis(aminoiminometil) - D - estreptamina". Siendo su fórmula condensada $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$, y su peso molecular de 581.58 g/mol ¹⁴. La STP está constituida de tres componentes: estreptidina, L-estreptosa, y N-metil-α-L-glucosamina (fig. 2).

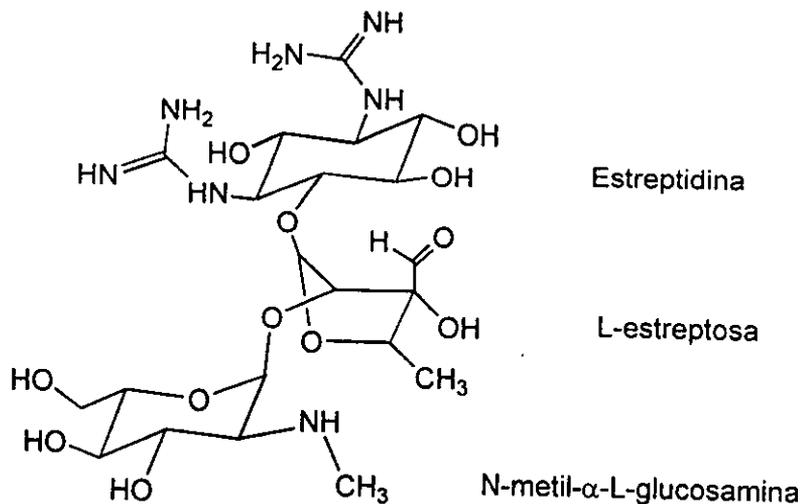


Figura 2. Estructura de la estreptomina.

La STP es un base tri-acídica, no cristalina la cual forma sales estables tales como el sulfato $(STP)_2(H_2SO_4)_3$, el clorhidrato $(STP) \cdot 3HCl$, y una sal doble clorhidrato-cloruro de calcio $[(STP)(HCl)_3]_2CaCl_2$. Tanto la estreptomicina, como sus sales, presentan actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*. Generalmente, se administra en forma de sulfato, el cual se encuentra disponible comercialmente en México ^{15,16}.

El sulfato de estreptomicina tiene la fórmula condensada $C_{42}H_{84}N_{14}O_{36}S_3$. Es un polvo blanco, inodoro, muy higroscópico, que no es afectado por la luz y es muy soluble en agua, pero prácticamente insoluble en alcohol, cloroformo y éter ¹⁴.

Los grupos guanidino, que son fuertemente básicos, junto con el carácter hidrofílico general de la molécula inhiben la absorción gastro-intestinal de la STP, por lo cual es administrada por vía intramuscular, se distribuye en todos los fluidos extracelulares del organismo, y se excreta por vía urinaria principalmente¹⁷.

1.3. Actividad antimicrobiana de la estreptomicina.

La estreptomicina se produce por fermentación microbiana de la *Streptomyces griseus* y fue aislada por Schatz *et al.*¹⁸ en 1944. Ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-negativas, es usada para el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de bacterias.

La actividad de la estreptomicina abarca principalmente al *Mycobacterium tuberculosis*, aunque también actúa contra *Brucella*, *Erysipelothrix*, *Haemophilus ducreyi*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas mallei*, *Nocardia*, *Yersinia*, *Pasteurella*, *Francisella tularensis*, y *Shigella*; es variable frente a neumococo, *Escherichia coli* y coliformes, *Haemophilus influenzae*, gonococo, meningococo, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. Es inactiva ante *Bacteroides*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, virus, hongos y parásitos¹⁰.

La actividad antimicrobiana es destruida por el rompimiento del enlace glucosídico entre la estreptidina y la L-estreptosa, al reemplazar los grupos guanidinos por grupos amino, o por la carbobenziloxidación de la amina secundaria¹⁹.

1.4. Reacciones características de la estreptomicina.

La caracterización química de la STP ha sido con base en el aislamiento de sus productos de hidrólisis. Se ha propuesto que la hidrólisis básica da lugar a tres productos (estreptidina, maltol y N-metil- α -L-glucosamina), mientras que la hidrólisis ácida produce solo dos productos (estreptidina y estreptobiosamina) (fig. 4). En disoluciones alcalinas (0.1N de NaOH) las sales de STP son inestables, hidrolizándose rápidamente para formarse el maltol a partir de la L-estreptosa. El enlace glucosídico de la estreptobiosamina se rompe por la hidrólisis prolongada con ácidos fuertes (6N) formándose la N-metil- α -L-glucosamina, siendo la L-estreptosa degradada en el proceso¹⁷.

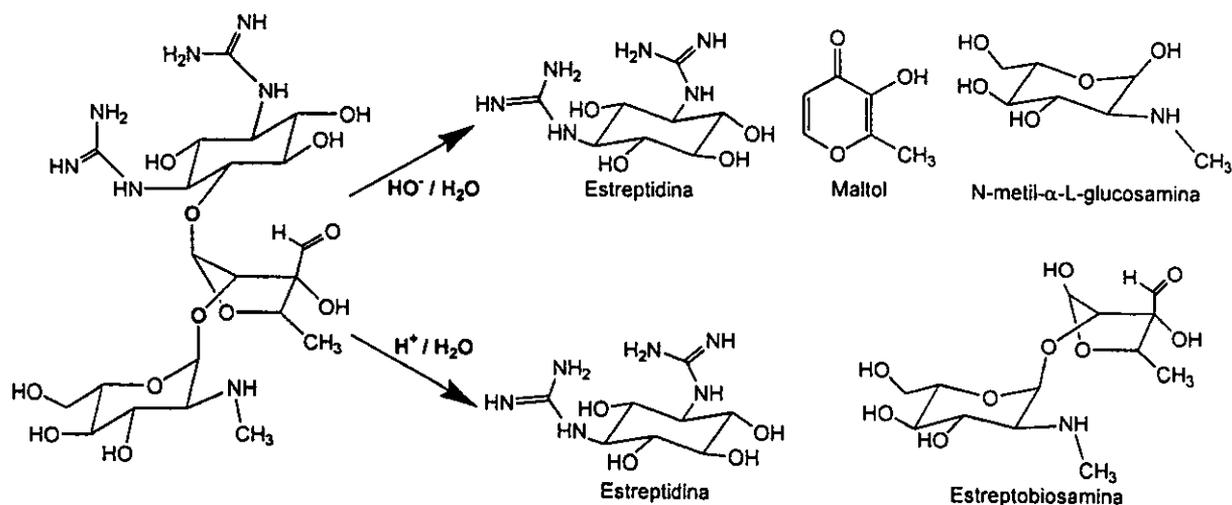


Figura 3. Productos de hidrólisis de la STP.

En disolución acuosa, las sales son estables entre pH 4 y 7, disminuyendo su potencial bactericida fuera de éste intervalo. Las disoluciones acuosas del sulfato de STP son ácidas, y son insuficientemente estables para permitir su esterilización por autoclave para su posterior administración.

La STP manifiesta propiedades características del grupo aldehído libre en la molécula, formando oximas, hidrozonas y semicarbazonas. Puede ser reducido catalíticamente en disolución acuosa utilizando paladio e hidrógeno, sin pérdida de la actividad antibacterial, obteniéndose la dihidroestreptomicina. Así también, puede oxidarse mediante reacción con agua de bromo, obteniéndose el ácido carboxílico correspondiente, el ácido estreptomicínico (fig. 5), el cual es inactivo¹⁷.

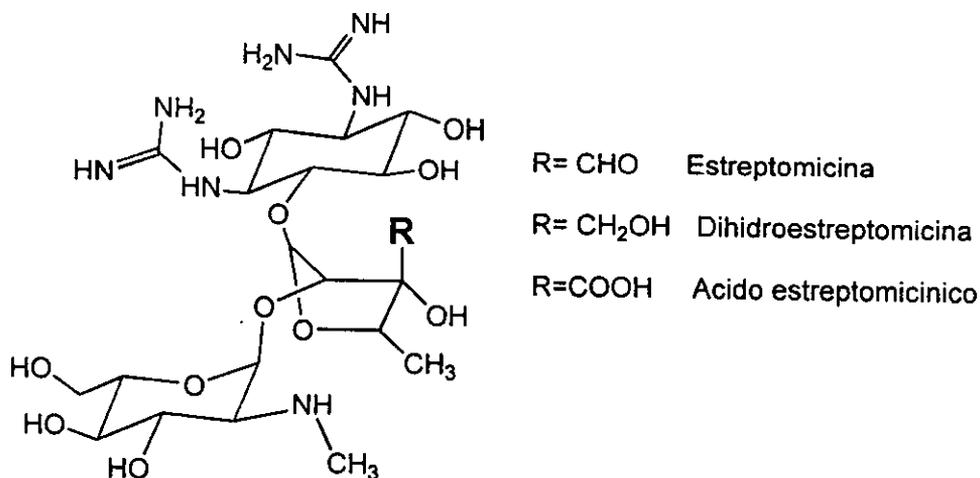


Figura 4. Derivados de la estreptomicina.

1. 5. Compuestos propuestos con estreptomicina.

Diversos factores influyen sobre la actividad antimicrobiana del antibiótico, entre éstos se encuentra la

concentración y el pH del medio. Se ha propuesto que la presencia de algunos iones metálicos (Co(II), Ni(II), Cu(II) y Zn(II)) incrementan la actividad de la estreptomicina³.

En la bibliografía se encuentran diversos estudios acerca de la interacción de iones metálicos con STP efectuados en disolución. Se ha descrito la preparación de complejos con Co(II), Ni(II) y Cu(II) en disolución acuosa y en disolución agua-etanol⁴, en concentraciones equimolares con respecto al sulfato de STP. En dicho trabajo se mantuvo un pH=9 por adición de NaOH, obteniéndose compuestos contaminados con el correspondiente hidróxido del metal, siendo dichos compuestos caracterizados por análisis elemental y punto de fusión.

Así también, se ha realizado la determinación de la constante de disociación ácida del perclorato de STP ($pK_a=8.0$), además de las constantes de estabilidad de sus complejos con Cu(II) ($\log K=3.72$), Ni(II) ($\log K=2.09$) y Co(II) ($\log K=2.17$) proponiéndose una estequiometría 1:1 (metal:ligante), para los compuestos formados⁵. Las mediciones se realizaron por titulación potenciométrica de pH (en disolución acuosa), empleando NaOH (0.5M) como titulante, manteniendo una fuerza iónica constante a 0.1M (NaClO₄) y una temperatura de 30°C.

En un estudio previo a este trabajo, se analizó el comportamiento en disolución por RMN de ¹³C, de compuestos derivados de la interacción de la STP y sales de Co(II), Ni(II), Cu(II), y Ca(II)⁶, en el cual se menciona que los desplazamientos químicos de los derivados metálicos son muy similares a los del sulfato de STP, observándose una interacción débil metal-ligante. Se propone, sin embargo, que la STP forma complejos sólidos estables con los iones metálicos empleados, los cuales se coordinan a los átomos de nitrógeno de los grupos guanidinos.

En general, se ha estudiado la interacción en disolución de iones metálicos con la STP, sin embargo, no se ha llevado a cabo una caracterización completa de dichos compuestos, excepto para un complejo de Cu(II) donde se ha sugerido enlaces Cu-O con la STP⁷. Este compuesto tiene la fórmula [Cu(II)-STP•4H₂O], y fue sintetizado a partir de sulfato de STP y sulfato de Cu(II) en un medio básico empleando KOH.

Por otro lado, se ha estudiado cómo el calcio y el magnesio influyen en el mecanismo de acción del antibiótico, en donde el fármaco interactuaría con el calcio para formar un complejo calcio-STP, inhibiendo el transporte de calcio e incrementando el de magnesio a través de la membrana celular^{1, 2}. Así mismo, se ha descrito la formación de compuestos de CaCl₂ con STP (1:1), no especificándose qué clase de compuestos se forman⁸. En 1946 se sintetizó un compuesto sólido a partir de CaCl₂ y heliantato de STP proponiéndose, con base en el análisis elemental del compuesto, la formación del compuesto CaCl₂-triclóridrato de STP⁹. A partir de ese año únicamente se ha hecho referencia a este compuesto, sin que se hayan publicado nuevas rutas de síntesis para su obtención, así como sobre su caracterización.

OBJETIVOS

- Realizar una caracterización química y espectroscópica de la estreptomina y de la estreptidina, por medio de las técnicas de análisis elemental, espectroscopía de IR, RMN, UV-vis, fluorescencia y difracción de rayos-X.
- Investigar el comportamiento de la estreptomina y de la estreptidina en medio ácido y básico, y frente a iones metálicos en medio acuoso y metanólico.
- Hacer un análisis teórico conformacional de la estreptomina y de la estreptidina, para estudiar la estereoquímica y disponibilidad de sitios reactivos de cada molécula.
- Contribuir al esclarecimiento de la acción específica vestibulotóxica de la estreptomina, a partir de sus propiedades químicas.

II. METODOLOGIA

2.1. EXPERIMENTAL

2.1.1. Reactivos.

Todas las sales metálicas (cloruros) empleadas fueron grado analítico marca J.T. Baker. Las sales para los amortiguadores fueron obtenidas de Sigma como grado analítico. El sulfato de estreptomicina fue de los laboratorios Lakeside, Pisa y Sigma. Todos los reactivos fueron usados sin purificación adicional.

El clorhidrato de estreptomicina y las sales de estreptidina fueron sintetizados a partir del sulfato de estreptomicina marca Sigma.

En algunas reacciones se utilizó metanol como disolvente marca E. Merck, grado analítico y en otros casos agua desionizada. El agua fue destilada y luego desionizada en un compact ultrapure water system Easypure RF.

2.1.2. Instrumentación.

Los análisis elementales se llevaron a cabo en un analizador elemental Fisons Instruments EA 1108 (CHNS-O), usando sulfanilamida (para análisis de CHNS) y acetanilida (para análisis de CHN) como estándares de calibración (en un intervalo de 2 a 3 mg).

Los espectros de IR medio ($4000-450\text{cm}^{-1}$) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599-B por la técnica de pastilla de KBr. Los espectros de IR lejano ($700-70\text{cm}^{-1}$) se realizaron en un espectrofotómetro Nicolet 740 FT-IR en pastillas de polietileno.

Los datos de difracción del sulfato de estreptidina, fueron colectados a 293 K en un difractómetro automático Siemens P4/PC usando radiación monocromática de Mo-K α ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$). La estructura se resolvió usando el programa SHELXTL.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C en disolución se realizaron en equipos Varian 300 y 400 (MHz). Los compuestos fueron estudiados en disoluciones de D_2O a $T=25^\circ\text{C}$ (a $[\text{C}] = 65-75\text{mg/mL}$) usando acetona como referencia externa. Los espectros de ^{13}C en sólido se corrieron en un equipo Varian Unity plus 300.

La caracterización por espectroscopía UV-Vis en sólido (a $T=25^\circ\text{C}$) y en disolución (a $T=25^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$ y $I=0.1$) se realizó en un espectrofotómetro Cary 5E UV-VIS-NIR de Varian, siendo el intervalo de trabajo para sólido de $250\text{nm}(40000\text{cm}^{-1})$ a $2500\text{nm}(4000\text{cm}^{-1})$ y de $190\text{nm}(52632\text{cm}^{-1})$ a $1360\text{nm}(7353\text{cm}^{-1})$ para disolución.

Los espectros de fluorescencia fueron determinados en un espectrofluorómetro Spex Fluoromax en un intervalo de $350-750 \text{ nm}$ a una longitud de onda de excitación de 366 nm , usando un "slit" de 1.175 a $T=25^\circ\text{C}$.

La cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas se realizó con un equipo GCQ System, empleando una columna capilar J&W Scientific DB-5MS ($30\times 0.25\text{mm D.I.}\times 0.25\text{m}$), trabajando en un intervalo de $20-820 \text{ m/z}$.

El pH de las soluciones fueron establecidas por un Benchtop pH/ISE meter model 720A Orion, usando amortiguadores de referencia a pH=4.0 (acetatos) y pH=7.0 (fosfatos).

El momento magnético se midió en una balanza de susceptibilidad magnética Johnson-Matthey-Gouy siguiendo el método de Evans para muestras sólidas en polvo.

2.1.3. Síntesis

2.1.3.1. Obtención del sulfato de estreptidina ($C_8H_{18}N_6O_4 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$).

A una disolución de sulfato de estreptomicina (1g) en agua (78mL) se le agrega H_2SO_4 concentrado (2mL) y acetona (70mL). La disolución resultante se calienta (a 60°C) durante 48 hrs hasta que presenta una coloración naranja y un precipitado blanco. El precipitado se separa mediante filtración y se lava con agua y posteriormente con acetona. Para cristalizarlo, el precipitado se disuelve en agua acidulada con H_2SO_4 y se deja evaporando la disolución lentamente hasta la aparición de cristales.

Puede reducirse el tiempo de obtención (2hrs) aumentando la acidez (1M) y la temperatura (80°C).

2.1.3.2. Obtención de las sales clorhidrato.

A un equivalente de sulfato de STP (o STD) disuelto en agua, se le agrega tres equivalentes de $BaCl_2$. El correspondiente precipitado blanco de $BaSO_4$ se filtra y la disolución es evaporada lentamente.

2.1.3.3. Método general de preparación de los compuestos con sulfato de estreptomicina.

Los compuestos fueron preparados usando tres equivalentes de la sal metálica y uno del sulfato de STP. Los compuestos son formados independientemente de la relación empleada de sulfato de STP - sal metálica (1:1, 1:3, 1:5). La mezcla fue suspendida en metanol (50mL), y mantenida a reflujo durante 48 hrs. El sulfato de STP que no reacciona es filtrado y la disolución evaporada a sequedad. El sólido obtenido es lavado con una mezcla de etanol - acetato de etilo (3:1) para eliminar la sal metálica. Por último, el compuesto insoluble se separa por filtración y se seca a vacío.

2.1.3.4. Método general de preparación de compuestos con clorhidrato de estreptomicina y estreptidina.

Estos compuestos se preparan usando un equivalente de la sal metálica y uno del clorhidrato de STP (o STD). Los compuestos son formados independientemente de la relación empleada de clorhidrato de STP (o STD) - sal metálica (1:1, 1:2, 2:1). La mezcla se disuelve en agua (o metanol), y es evaporada hasta sequedad. El sólido obtenido es lavado con una mezcla de etanol - acetato de etilo (3:1), filtrado y secado a vacío. Para solidificar completamente los compuestos, se lavan varias veces con acetona.

NOTA: Todos los compuestos se deben mantener en un desecador ya que son higroscópicos. En algunos casos, se mantienen en la estufa (75°C) hasta que sequen.

2. 4. Análisis elementales.

En la tabla 1 se presentan los análisis elementales (a.e.) del maltol, la D-glucosamina y la guanidina empleadas .

En la tabla 2, se muestran los a.e. de las diferentes marcas de estreptomina usadas comúnmente en México. Ya que la fórmula mínima para el sulfato de estreptomina es $C_{42}H_{84}N_{14}O_{36}S_3$ y el compuesto es higroscópico, es necesario considerar moléculas de agua para ajustar los porcentajes experimentales. El número de moléculas de agua son presentados también en la tabla 3. Adicionalmente, se observó que al mantener a la estreptomina a temperatura ambiente en contacto con el aire, el fármaco muestra un nivel de saturación de diez moléculas de agua (tabla 4), lo cual es importante considerar al momento de hacer un análisis cuantitativo del aminoglicósido. Por último, se muestran los a.e. del cloruro de estreptomina (tablas 5 y 6), y del sulfato y el cloruro de estreptidina (tabla 7).

Tabla 1. Análisis elementales.

Compuesto	%C	%H	%N	%O	%S
Maltol $C_6H_6O_3$	57.14	4.80	-----	38.06	-----
Sigma	59.40	5.00	0.0	-----	0.0
D-Glucosamina $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$	33.42	6.54	6.50	37.10	-----
Aldrich	33.35	6.53	6.43	-----	0.0
Guanidina $CH_5N_3 \cdot HCl$	12.57	6.33	43.99	-----	-----
Sigma	12.50	6.36	43.61	-----	0.0

Tabla 2. Análisis elementales.

Compuesto	%C	%H	%N	%O	%S
Sulfato de estreptomina ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$)₂(H_2SO_4)₃	34.61	5.81	13.46	39.54	6.60
Lakeside	32.69	6.30	12.71	-----	6.296
Pisa	32.71	6.30	12.57	-----	6.291
Sigma	31.79	6.41	12.28	-----	6.519

Tabla 3. Análisis elementales.

Sulfato de STP	Experimental / Calculado								Ajuste n H ₂ O
	%C		%H		%N		%S		
Lakeside	32.69	32.60	6.30	6.12	12.71	12.67	6.29	6.21	5
Pisa	32.71	32.22	6.30	6.18	12.57	12.52	6.29	6.14	6
Sigma	31.79	31.50	6.41	6.29	12.28	12.24	6.52	6.00	8

Tabla 4. Análisis elementales.

Compuesto	%C	%H	%N	%O	%S
Sulfato de estreptomina decahidratado ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$)₂(H_2SO_4)₃(H_2O)₁₀	30.81	6.40	11.97	44.94	5.87
Lakeside	30.54	6.94	11.88	-----	-----
Pisa	30.82	6.43	12.28	-----	-----
Sigma	30.35	6.79	11.46	-----	-----

Tabla 5. Análisis elementales.

Compuesto	%C	%H	%N	%O	%S
Cloruro de estreptomicina (C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂)(HCl) ₃	36.50	6.13	14.19	27.79	-----
"De STP Lakeside"	31.72	6.31	12.33	-----	0.0
"De STP Pisa"	32.21	6.38	12.91	-----	0.0
"De STP Sigma"	33.57	6.97	12.93	-----	0.0

Tabla 6. Análisis elementales.

Compuesto	%C	%H	%N	%O	%S
Cloruro de estreptomicina hexahidratado (C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂)(HCl) ₃ (H ₂ O) ₆	31.57	6.81	12.27	36.04	0.0
"De STP Lakeside"	31.52	6.78	12.18	-----	0.0
"De STP Pisa"	31.75	6.79	12.28	-----	0.0
"De STP Sigma"	31.35	6.43	11.86	-----	0.0

Tabla 7. Análisis elementales.

Sulfato de estreptidina C ₈ H ₁₈ N ₆ O ₄ ·H ₂ SO ₄ ·H ₂ O	25.40	5.86	22.21	38.06	8.47
"De STP Lakeside"	25.50	5.81	21.71	-----	8.04
"De STP Pisa"	25.99	6.05	22.00	-----	8.65
"De STP Sigma"	25.60	6.86	21.37	-----	9.37
Cloruro de estreptidina C ₈ H ₁₈ N ₆ O ₄ (HCl) ₂ ·H ₂ O	27.20	6.28	23.79	22.65	0.0
"De STP sigma"	27.82	7.03	23.53	-----	0.0

2.1.5. Método para la trimetilsililación de amino-azúcares.

El procedimiento consiste en neutralizar 1 mg de muestra con HCl, liofilizarla y adicionarle 0.2 mL de Bis(trimetilsilil)acetamida (BSA)/ Trimetilclorosilano (TMCS) / piridina (100:1:400, v/v/v), y calentarla por 6 hrs a 75 °C, en un contenedor de vidrio cerrado (fig. 6). Se procura mantener en frío el medio de reacción hasta analizarlos por GC y EM, pues los compuestos que se forman son suelen ser inestables.

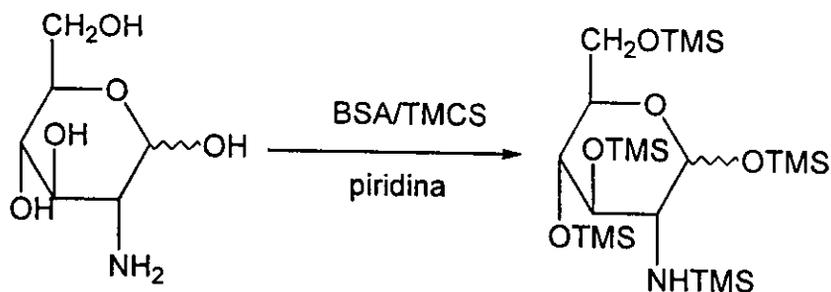


Figura 5. Obtención de derivados trimetilsililados de aminoazúcares.

2.2. Parte teórica.

El procedimiento para obtener los datos de cada una de las moléculas consta de varias etapas. La geometría inicial de cada estructura se obtuvo por mecánica molecular MM2 a partir del programa Chem 3D Pro 3.2 (el cual se maneja en una PC Pentium a 100MHz). Posteriormente, se procedió a tomar las coordenadas geométricas para introducirlas al método semiempírico PM3, y obtener la optimización total de cada molécula (usando los parámetros de "default"). El PM3 empleado es del programa Spartan 4.0 instalado en una Silicon Graphics Workstation Personal Indigo, al cual también se tuvo acceso a través de una PC Gateway 486/33C como emulador de terminal. Por último, se recopilaron y analizaron los datos teóricos obtenidos.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de investigar y entender el comportamiento de la estreptomina frente a iones metálicos y proponer su probable acción tóxica, es necesario estudiar las características físicas, químicas y espectroscópicas que nos ayuden a evaluar dicha interacción. Por tanto, no tan sólo se caracterizó a la estreptomina, sino también a su derivado, la estreptidina, la cual es de interés por los grupos guanidinos que presenta, y que son característicos de la estreptomina dentro de los aminoglicósidos. La caracterización se llevó a cabo en estado sólido y en disolución, puesto que es importante considerar el aspecto hidrofóbico de las moléculas a nivel biológico. Debido a las reacciones de hidrólisis que puede presentar la estreptomina, fue conveniente considerar adicionalmente sus otros productos de hidrólisis en disolución (maltol, derivado de la estreptosa, y glucosamina), así como a la guanidina (análogo de la estreptidina) con el propósito de descartar posibles interferencias en los experimentos realizados.

3.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL ACERCA DE LA ESTREPTOMICINA Y LA ESTREPTIDINA.

3.1.1. Espectroscopía de infrarrojo.

Las vibraciones de los diferentes grupos presentes en la molécula de estreptomina y estreptidina aparecen en frecuencias muy cercanas (fig. 6 y 7). Sin embargo, es posible asignar algunas de las señales características de estos compuestos:

- Una banda intensa en el intervalo de $3500-3100\text{ cm}^{-1}$ es debida a las vibraciones ν (N-H--N)_{st} (3400 cm^{-1}) y ν_s (N-H)_{st} ($3200-3100\text{ cm}^{-1}$) del grupo guanidino, así como a las vibraciones ν_s (O-H)_{st} ($3500-3250\text{ cm}^{-1}$) y ν_s (C-H)_{st} ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$)²⁰.
- En la región de $1680-1630$ se define una banda intensa que corresponde a la vibración ν_s (C=N)_{st} del grupo guanidino. Esta señal se desdobra para las sales sulfato²⁰.
- Las señales intensas en 1042 cm^{-1} en estreptomina y 1005 cm^{-1} en estreptidina son debidas a la vibración ν_s (N-C-N)_{st}. En la región de 800 a 450 cm^{-1} se observa una banda ancha de baja intensidad correspondiente a la vibración δ (N-H)²⁰.
- En el caso de las sales sulfato, se observa una banda intensa alrededor de 1114 cm^{-1} debida a la vibración $\nu_{as}(\text{S=O})_{st}$ del SO_4^{2-} iónico²⁰.

En la tabla 8 se muestran las bandas de IR .

Tabla 8. Principales vibraciones en el IR (en cm^{-1}) de las sales STP y STD.

Compuesto	ν (N-H--N) _{st} , ν_s (N-H) _{st} ν_s (O-H) _{st}	ν_s (C=N) _{st}	ν_s (N-C-N) _{st}	δ (N-H)	ν_{as} (S=O) _{st}
(STP) ₂ (H ₂ SO ₄) ₃	3378, 3200	1674, 1636	1054	589	1114
(STP)(HCl) ₃	3376, 3198	1668	1042	562	-----
(STD)(H ₂ SO ₄)	3345, 3212	1660, 1636	1005	584	1113
(STD)(HCl) ₂	3342, 3192	1667	1005	560	-----
Guanidina.HCl	3402, 3150	1640	1010	516	-----

En las figura 6 y 7, se muestran los espectros de las sales de estreptomina y estreptidina.

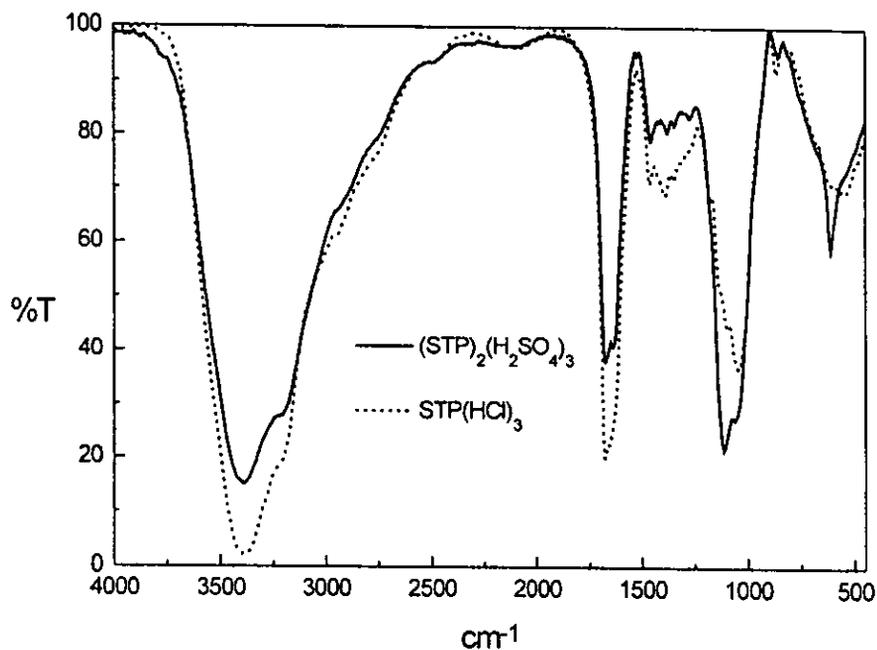


Figura 6. Sales de STP.

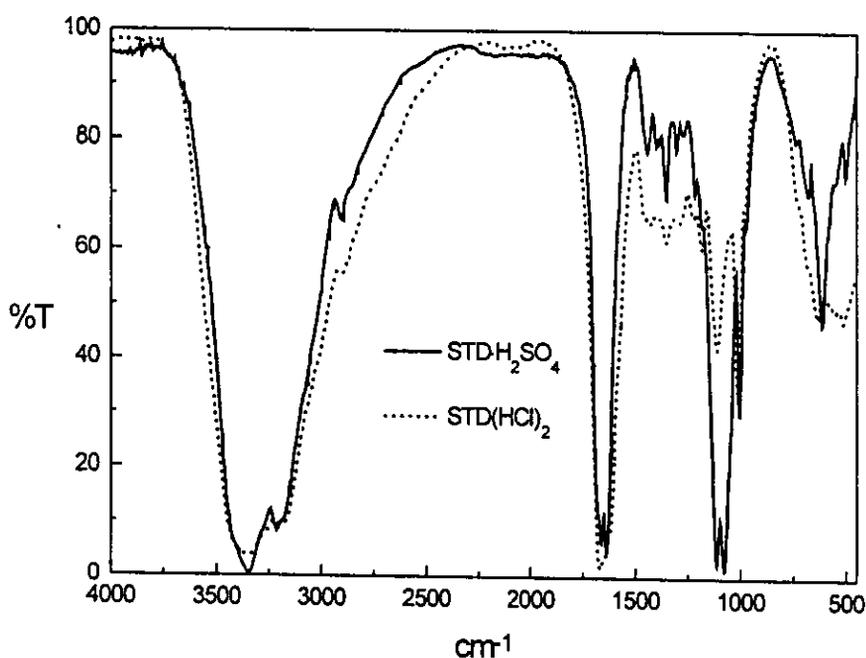


Figura 7. Sales de STD.

3.1.2. Análisis por RMN.

Se llevó a cabo un análisis por RMN de ^{13}C en disolución acuosa de las tres diferentes presentaciones de sulfato de STP comercial. Los espectros presentan las mismas señales y desplazamientos (tabla 9 y fig. 8) que están informados en la literatura ^{6, 21}.

Adicionalmente se estudiaron los espectros de RMN de ^{13}C en disolución del cloruro de STP, el sulfato de STD y el cloruro de STD.

3.1.2.1. RMN de ^{13}C de la estreptomicina (STP).

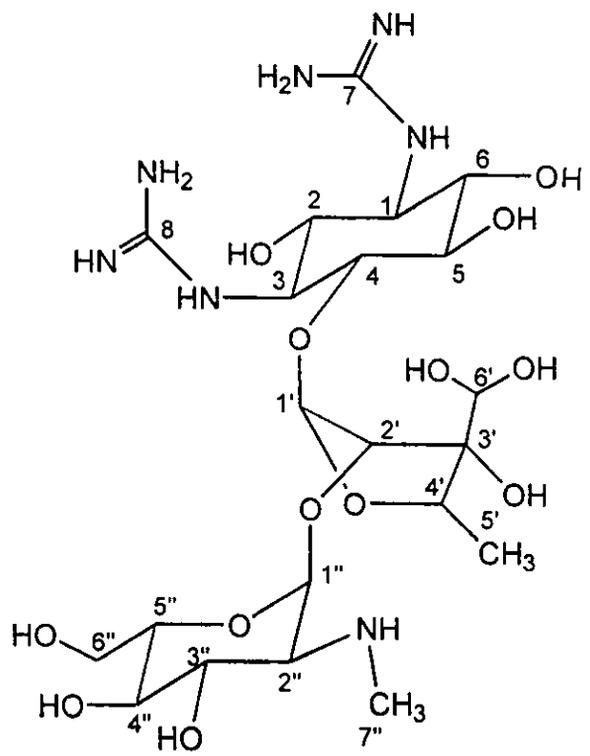
De acuerdo al trabajo de RMN de ^{13}C y ^{15}N realizado por Hull et. al.²¹, se demostró que el aldehído del sulfato de STP no está presente en disolución acuosa, sino que forma un hidrato estabilizado por el grupo hidroxilo en el C-3' de la L-estreptosa (tabla 9), así mismo, se establece que los grupos metilamina y guanidinos de la STP se encuentran protonados.

El espectro RMN del cloruro de STP no cambia significativamente con respecto al del sulfato de STP (tabla 9 y fig. 8), esto nos sugiere que la conformación en disolución de la STP se mantiene independientemente del contraión. Por otra parte, tal como se informa en la literatura, no se observa la señal del grupo aldehído (que debería aparecer alrededor de 200 ppm), y sí una señal a 89.1 ppm correspondiente al grupo $-\text{CH}(\text{OH})_2$. Otra observación importante es que los desplazamientos para los carbonos C-7 y C-8 de los grupos guanidinos son

ligeramente diferentes entre sí en ambas sales de STP, esto indica que uno de los grupos guanidinos interactúa más con el resto de la molécula.

Otro aspecto adicional que se estudió fue la RMN de ^{13}C en sólido del sulfato de STP (fig. 9). Como se puede observar, el espectro es de menor resolución que los realizados en disolución. Sin embargo, aun cuando hay sobreposición de señales (bandas anchas por tiempos de relajación largos) es posible ver que son semejantes a las encontradas en disolución, pero desplazadas a bajo campo (por 4.6 ppm). Las señales que se pueden comparar con claridad son las correspondientes a los grupos guanidinos a 162.22 ppm (a 157.62 ppm en disolución), la del C-5' del grupo metilo de la estreptosa a 16.80 ppm (a 12.17 ppm en disolución), la del C-1' de la estreptosa a 109.49 ppm (a 105.69 ppm) y la del C-7'' del grupo metilo de la glucosamina a 37.12 ppm (a 31.75 ppm en disolución). En el espectro en sólido no aparece la señal del aldehído (200 ppm), debido a que este grupo se hidrata fácilmente al contacto con la humedad del ambiente.

Tabla 9. Estructura, asignación y desplazamientos en RMN de ^{13}C para STP en disolución (D_2O).

Estructura de la STP en disolución	$(\text{STP})_2(\text{H}_2\text{SO}_4)_3$	$(\text{STP})(\text{HCl})_3$
	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
	1 58.467	1 58.492
	2 70.273	2 70.667
	3 57.782	3 57.970
	4 77.666	4 77.469
	5 72.956	5 72.979
	6 71.167	6 71.228
	7 157.859	7 157.911
	8 157.382	8 157.456
	1' 105.689	1' 105.522
	2' 84.135	2' 84.379
	3' 81.929	3' 81.987
	4' 77.159	4' 77.229
	5' 12.170	5' 12.170
	6' 89.144	6' 89.177
	1'' 94.092	1'' 94.242
	2'' 60.972	2'' 61.124
	3'' 69.080	3'' 69.264
	4'' 68.902	4'' 68.956
	5'' 72.568	5'' 72.698
	6'' 60.077	6'' 60.229
	7'' 31.756	7'' 31.869

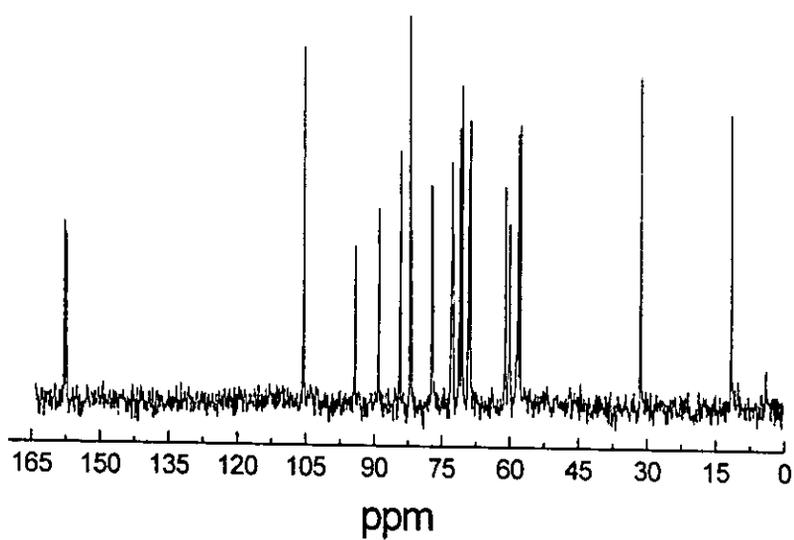
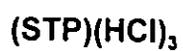
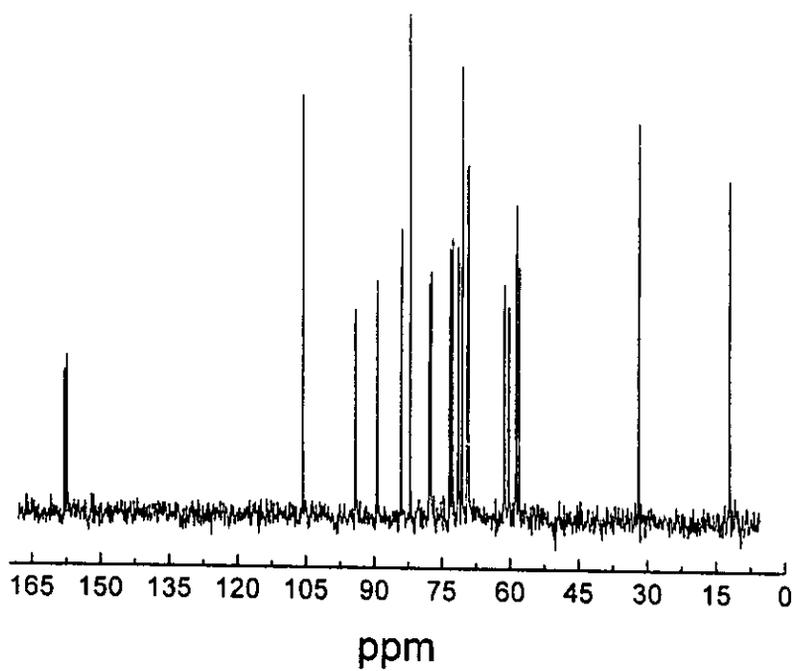
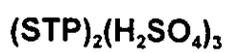


Figura 8. Espectros de RMN de ^{13}C para las sales de STP en disolución (D_2O).

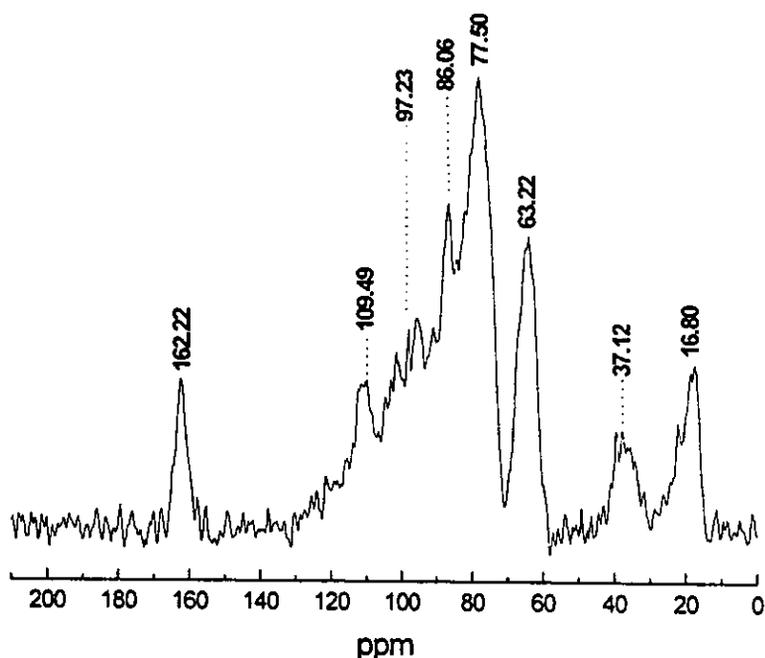
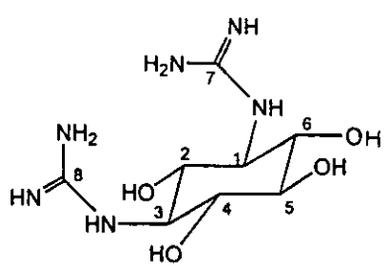


Figura 9. Espectros de RMN de ^{13}C para $(\text{STP})_2(\text{H}_2\text{SO}_4)_3$ en sólido.

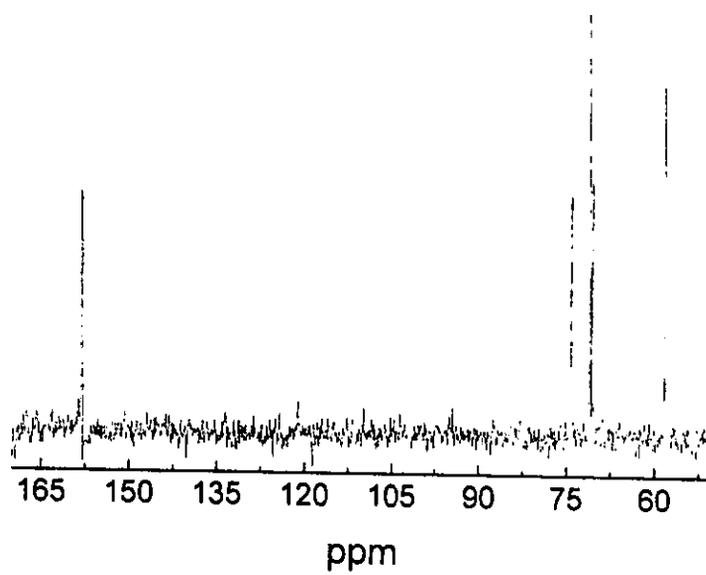
3.1.2.2. RMN de ^{13}C de la estreptidina (STD).

Por otro lado, por el número de señales y desplazamientos de los espectros de RMN de ^{13}C en disolución de las sales de STD (tabla 10 y fig. 10), se deduce que la molécula de STD es simétrica estructuralmente, en particular los grupos guanidinos. En el estudio también se contempló la RMN de ^{13}C en sólido del cloruro de STD (fig. 11). En sólido se observa la sobreposición de las señales de los carbonos C-7 y C-8 de los grupos guanidinos a 161.79 ppm, de los carbonos C-2, C-4, C-5 y C-6 en una señal única a 75 ppm y de los carbonos C-1 y C3 en una señal a 62.10 ppm, siendo todas equivalentes a las encontradas en disolución.

Tabla 10. Estructura, asignación y desplazamientos en RMN de ^{13}C para STD en disolución (D_2O).

	$(\text{STD})(\text{H}_2\text{SO}_4)$		$(\text{STD})(\text{HCl})_2$	
		$\delta(\text{ppm})$		$\delta(\text{ppm})$
1, 3	58.80	1, 3	58.80	
2	70.74	2	70.68	
5	71.41	5	71.31	
4, 6	74.53	4, 6	74.56	
7, 8	158.09	7, 8	157.96	

(STD)(H₂SO₄)



(STD)(HCl)₂

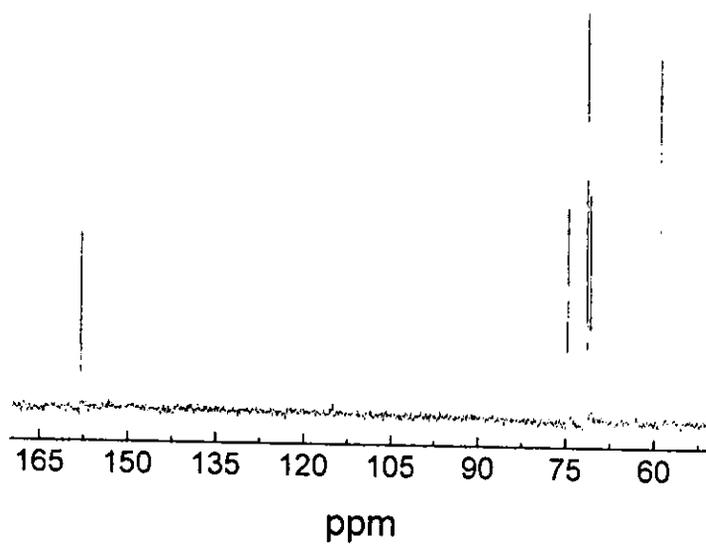


Figura 10. Espectros de RMN de ¹³C para las sales de STD en disolución (D₂O).

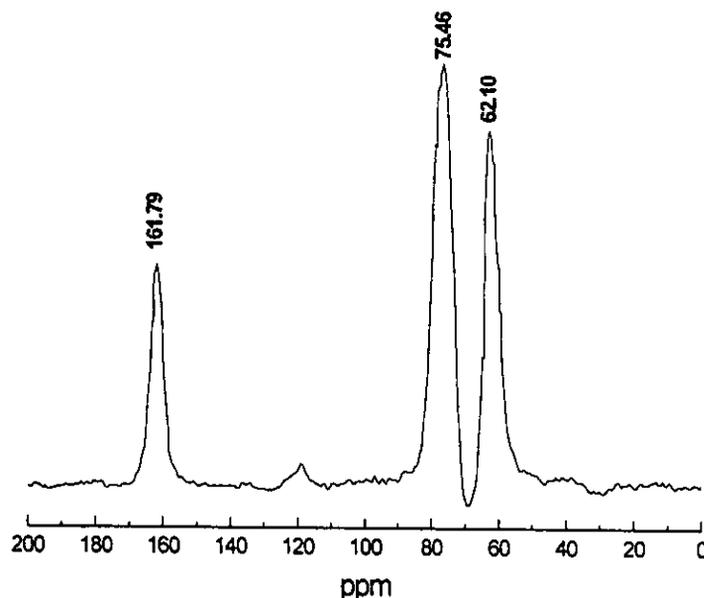


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C para $(\text{STD})(\text{HCl})_2$ en sólido.

3.1.3. Estudio por difracción de rayos-X del sulfato de estreptidina, $(\text{STD})(\text{H}_2\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})$.

Del sulfato de estreptomina se obtuvo el sulfato de estreptidina por hidrólisis, el cual fue posible cristalizar. En un trabajo previo⁶ se estudió esta molécula, sin embargo, se llevó a cabo la difracción de rayos-X de monocristal ya que resultó interesante realizar un análisis más detallado para conocer la naturaleza electrónica de los grupos sulfato cuando interactúan con los grupos guanidinos, así como, comparar los resultados experimentales con los del estudio teórico que se contemplaba realizar. La información cristalográfica básica se resume en el apéndice I. Se observa que en estado sólido (fig. 12) la STD adopta una conformación de silla con los sustituyentes en posiciones ecuatoriales (como el scilo-inositol), y que los grupos guanidinos son planares. En disolución la STD de la STP muestra esta misma conformación⁶.

Las distancias interatómicas entre los átomos de N, H y O de la STD, con los átomos de oxígeno del sulfato y del agua de hidratación (tabla 11 y fig. 13), denotan la existencia de interacciones por puente de hidrógeno que estabilizan a la molécula. El ion sulfato está estabilizado por diez puentes de hidrógeno, esencialmente con la molécula de agua y los grupos guanidinos, existiendo una mayor interacción con el N-8 (4 puentes de hidrógeno). Esto explica la diferencia en distancias de enlace C-N (tabla 12) que se esperaría que fueran similares, su alta insolubilidad y el que se favorezca la protonación de los nitrógenos de los grupos guanidinos, lo cual los hace menos disponibles para la coordinación.

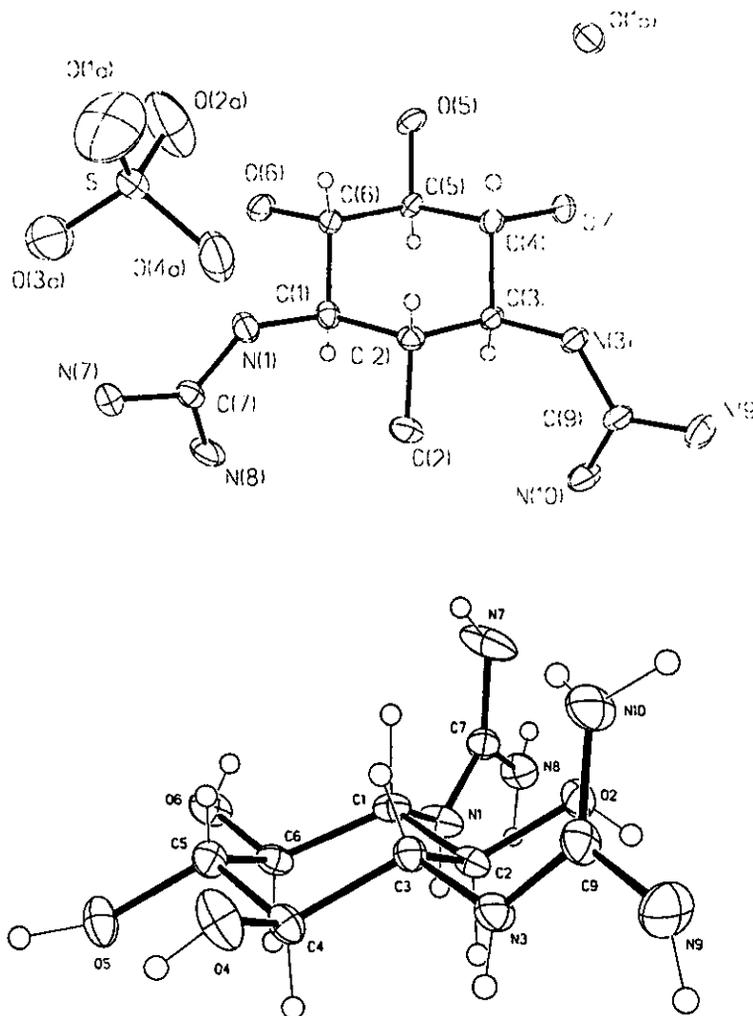


Figura 12. Estructura del (STD)(H₂SO₄)(H₂O) por difracción de rayos-X.

Tabla 11. Distancias interatómicas (Å) dentro del empaquetamiento para el (STD)(H₂SO₄)(H₂O).

N(1)-O(2a)	3.485	N(9)-O(2)	2.988
N(1)-O(4a)	3.259	N(9)-O(3a)	3.144
N(1)-S(1a)	3.766	N(10)-O(6)	2.908
N(7)-O(3a)	3.334	N(10)-O(3a)	3.334
N(8)-O(1a)	3.003	H(2)-O(1b)	2.805
N(8)-O(4a)	2.945	O(2)-H(1c)	2.805
N(8)-S(1a)	3.717	O(4)-O(6)	2.892
N(8)-S(1b)	3.825	O(4)-O(1b)	2.785
N(3)-O(4a)	2.965	O(5)-O(1b)	2.778
N(3)-S(1b)	3.665	O(5)-O(2a)	3.186
O(1b)-O(3a)	2.780	O(5)-S(1c)	3.540

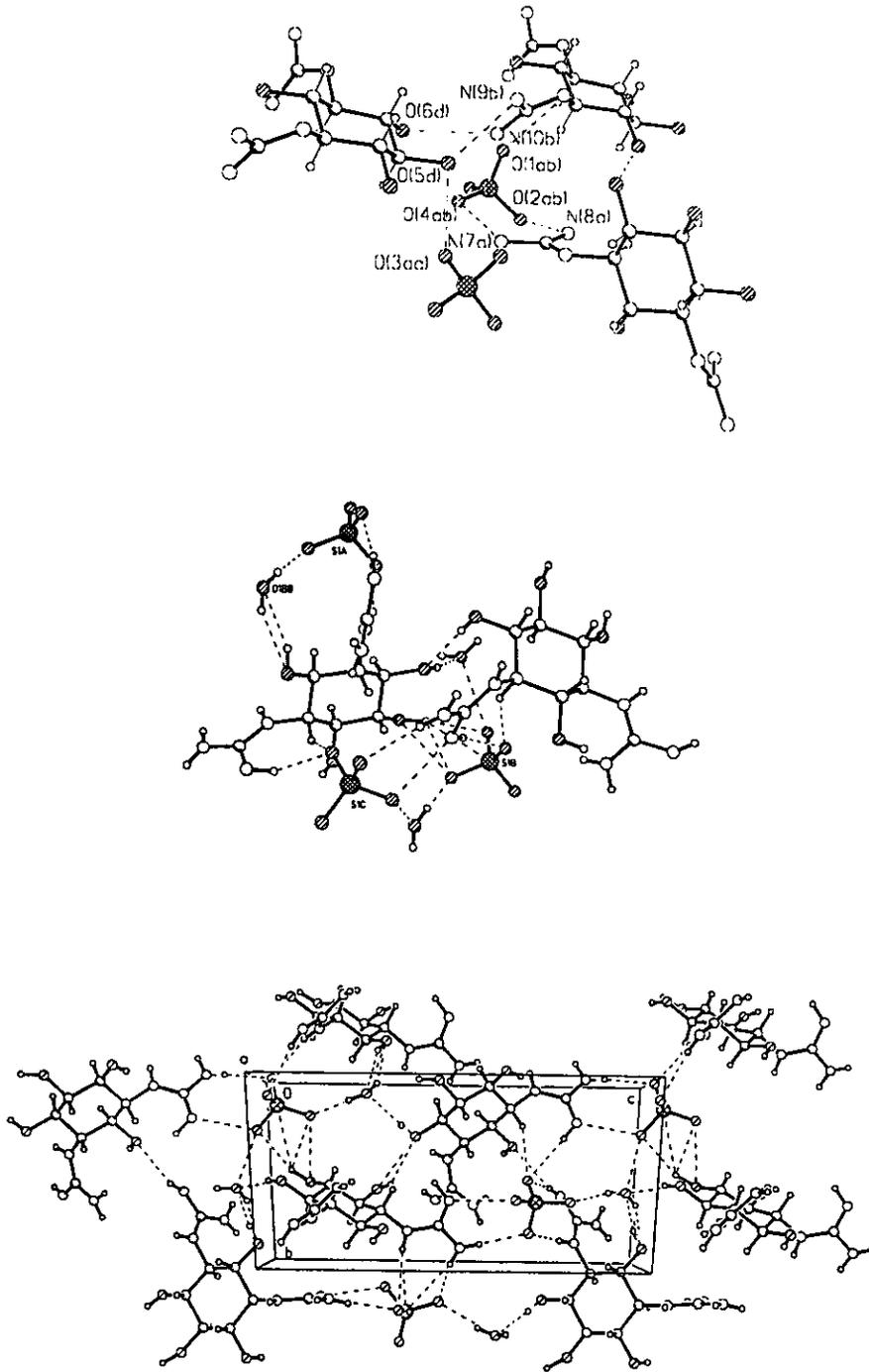


Figura 13. Interacciones intermoleculares de la $(STD)(H_2SO_4)(H_2O)$.

Tabla 12. Distancias de enlace (Å) entre átomos de carbono y nitrógeno de los grupos guanidinos.

C(1)-N(1)	1.451(7)	C(3)-N(3)	1.451(7)
C(7)-N(1)	1.337(7)	C(9)-N(3)	1.323(7)
C(7)-N(7)	1.302(8)	C(9)-N(9)	1.322(8)
C(7)-N(8)	1.343(8)	C(9)-N(10)	1.331(8)

Los grupos guanidinos presentan un entorno diferente entre sí, esto resulta de la mayor interacción por puentes de hidrógeno en torno a uno con relación al otro dentro del empaquetamiento. Por lo tanto, al no presentar el mismo entorno químico, esto se ve reflejado en el espectro de IR al desdoblarse la banda de la vibración ν_s (C=N)_{st} en las sales sulfato (ver tabla 8).

3.1.4. Análisis de los espectros electrónicos de absorción en la región UV-vis.

El espectro electrónico de absorción de una molécula en el UV-vis puede proveer información importante acerca del entorno químico del cromóforo en estudio, por consiguiente, el interés de emplear esta técnica fue el de observar si las bandas atribuidas a las transiciones electrónicas de los compuestos empleados se modificaban al cambiar el contraíón, tanto en sólido como en disolución. Por lo tanto, se compararon los espectros electrónicos de absorción de cada una de las sales de STP y STD (fig. 14), por la técnica de reflectancia difusa, para poder estudiar las interacciones en sólido de los contraiones con los grupos guanidinos. Se puede observar que los espectros son totalmente diferentes, pues las sales cloruro absorben en el intervalo estudiado, y las sales sulfato no presentan absorción alguna. La absorción en aproximadamente 27500 cm⁻¹ (365 nm), es característica del grupo guanidino correspondiente a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ 20.

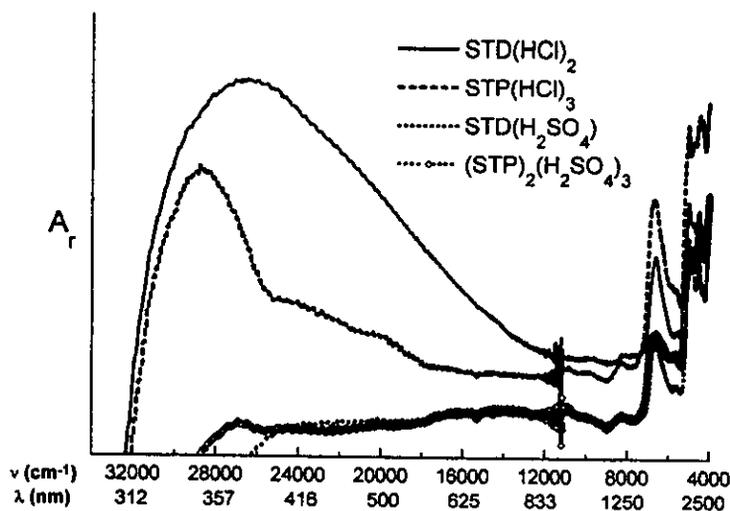


Figura 14. Espectros de reflectancia difusa de las sales de STP y STD.

Por el contrario, en estas moléculas el cromóforo (el grupo guanidino), es muy sensible al contraión empleado. Al usar el sulfato como contraión de la estreptomina y de la estreptidina, éste actúa como un grupo auxocromo, que favorece las transiciones electrónicas de $n \rightarrow \pi^*$, las cuales son de mucho menor absorptividad (10 a 100 L/(cm·mol)) con respecto a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ (1000 a 15 000 L/(cm·mol)). De tal manera, se observa un decremento de la absorción del guanidino, por el efecto hipocrómico del sulfato ^{22,23}.

Se puede observar, de los espectros de absorción de UV-vis en disolución acuosa de las sales de estreptomina y estreptidina (fig. 15 y 16), que independientemente del contraión, las bandas a 190nm no cambian. Sin embargo, la absorción de las sales sulfato es ligeramente menor que la de las sales cloruro a la misma concentración. De tal manera, se tiene que la interacción del contraión con los grupos guanidinos de la STP y de la STD se debilita por la solvatación. Por otro lado, se tiene que la ley de Lambert-Beer se cumple de 40 a 80 μM para el cloruro de STP y las sales de STD, y de 20 a 40 μM para el sulfato de STP.

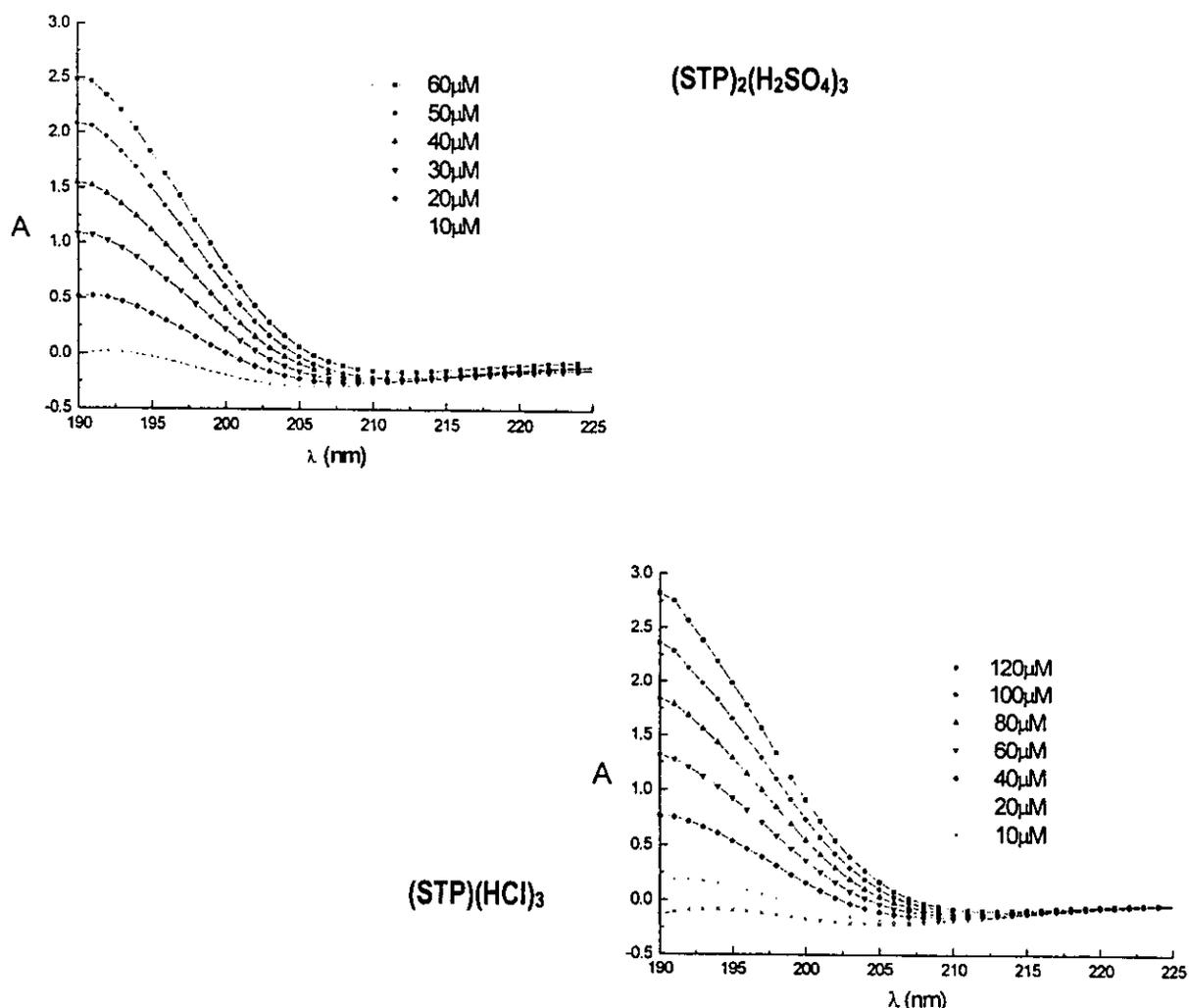


Figura 15. Espectros de UV-vis de sales de STP.

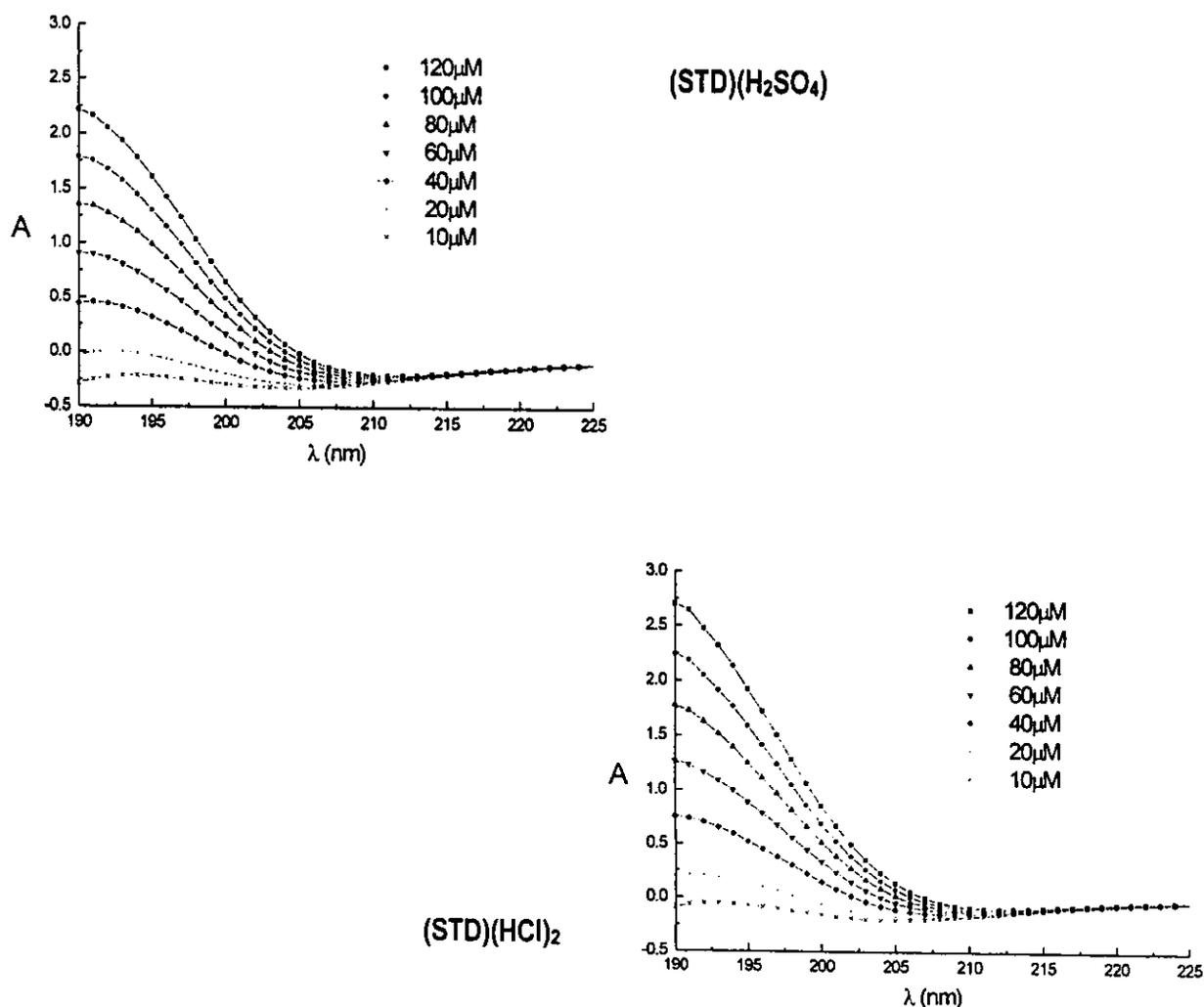


Figura 16. Espectros de UV-vis de sales de STD.

3.1.5. Estudio fluorométrico.

Conforme a la literatura, para determinar la STP se emplearon variantes al método fluorométrico diseñado por Faure, F. *et. al.* ²⁴, en el cual a una λ de excitación de 366 nm, el antibiótico presenta una banda de fluorescencia con máximo a una λ de emisión de 445 nm. En estudios farmacológicos que se han realizado *in vivo* con roedores, se ha observado que las células del oído interno fluorescen ²⁵, por lo tanto, para demostrar si la fluorescencia que se observa en los estudios *in vivo* es debida al antibiótico, se realizó un análisis por fluorescencia del $(\text{STP})_2(\text{H}_2\text{SO}_4)_3$ a diferentes concentraciones y medios acuosos. Las disoluciones empleadas en este trabajo fueron NaCl al 0.85%, a pH=7.0; amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1M, a pH=7.4; amortiguador de cacodilato de sodio (SCB) 0.1M, a pH=7.4; y paraformaldehído al 4%, en SCB 0.1M, a pH=7.3. Estas cuatro

disoluciones son usadas para la fijación *in vivo* de los tejidos que son estudiados mediante microscopía de fluorescencia.

El análisis de las diferentes disoluciones se siguió por fluorescencia en un intervalo de 350 a 750 nm, a una λ de excitación de 366 nm. La línea basal fue establecida con las disoluciones iniciales sin STP. Subsecuentemente, los espectros fueron registrados adicionando $(STP)_2(H_2SO_4)_3$ a la disolución original hasta registrar la concentración final de 30, 60, y 90 μM (concentración que se alcanza teóricamente en el oído interno). Cada espectro de fluorescencia realizado no se modificó por la adición de STP, independientemente de la concentración trabajada o la presentación comercial. Adicionalmente, se trabajó con una longitud de excitación de 488 nm (la cual es usada en microscopía de fluorescencia), observándose los mismos resultados. Uno de los espectros se muestra en la figura 17. De estos resultados se puede concluir que el antibiótico por sí mismo, a estas concentraciones, no fluoresce, a diferencia de los estudios reportados por Faure.

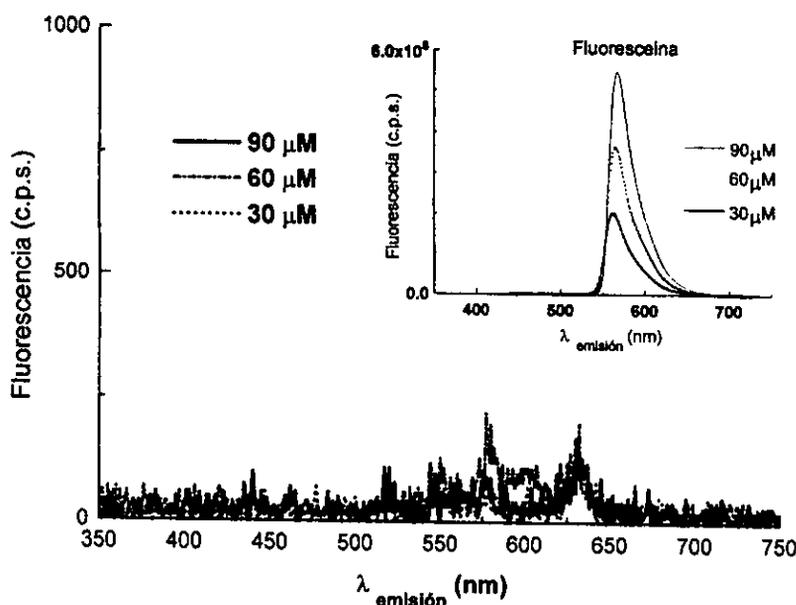


Figura 17. $(STP)_2(H_2SO_4)_3$ en disolución amortiguadora de fosfatos a pH=7.4

Para descartar cualquier abatimiento de la fluorescencia por concentración, se realizaron corridas de $(STP)_2(H_2SO_4)_3$ a concentraciones de 10^{-3} hasta 10^{-9} M (fig. 18). Puesto que se observa un aumento de señal al aumentar la concentración, se procedió emplear las sales de cloruro y sulfato de STP y STD a diferentes concentraciones (100 μM , 1mM, y 10mM (fig 19)), encontrándose que las sales cloruro son las que presentan mayor fluorescencia. El hecho de que la estreptomina y la estreptidina fluorescan menos cuando están presentes los iones sulfato, es debido a que el sulfato adiciona una transición de baja energía $n \rightarrow \pi^*$ a las

moléculas de STP y STD, abatiéndose la fluorescencia al promoverse el cruzamiento de intersistemas, disipándose la energía como fosforescencia ^{23,26}.

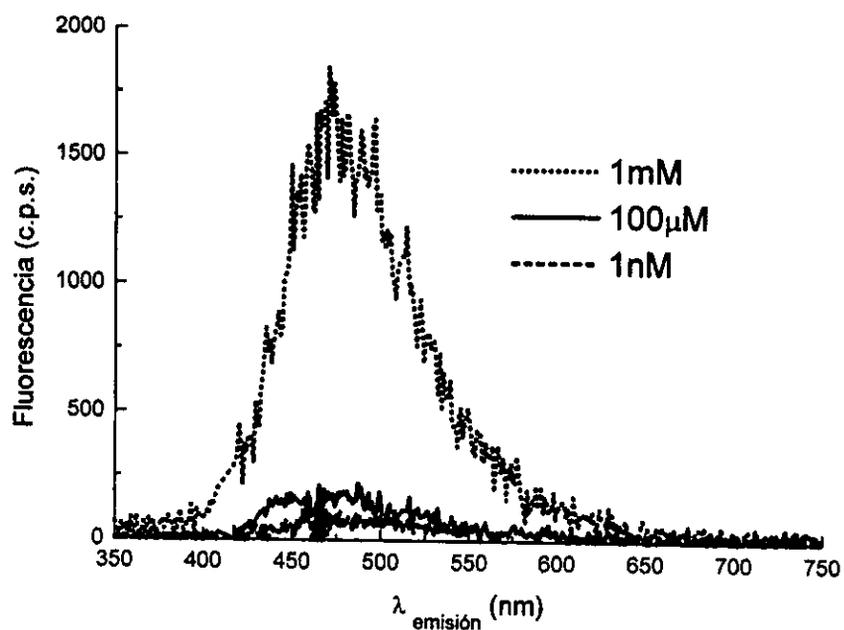


Figura 18. Fluorescencia de $(STP)_2(H_2SO_4)_3$ en agua a 25°C (pH=7).

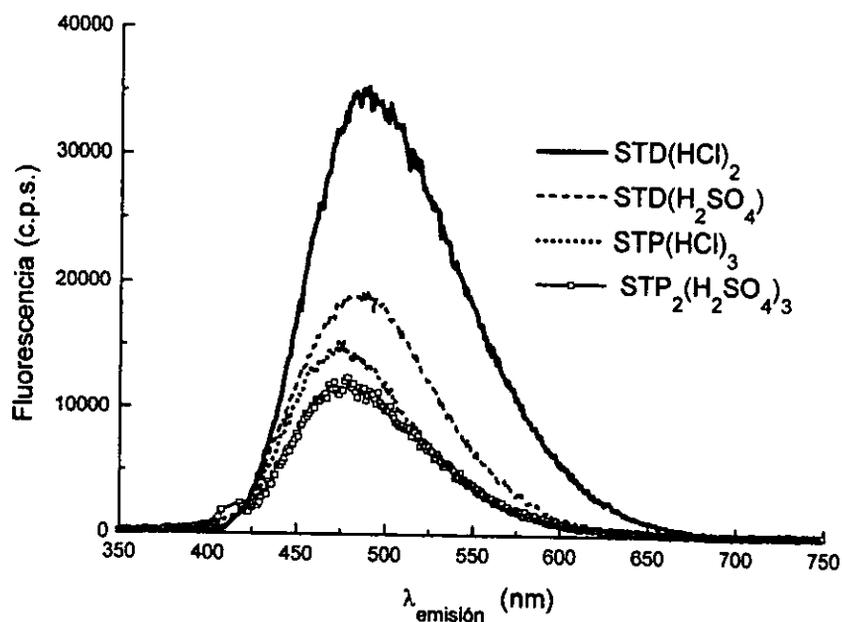


Figura 19. Fluorescencia de sales de STP y STD a 10mM en agua a 25°C (pH=7).

En la figura 20, se muestran los espectros de fluorescencia de las sales de STD en medio básico y ácido. Se trabajó sólo con la STD ya que la STP se hidroliza en estos medios. Es interesante ver cómo se ven afectados los grupos guanidinos por el pH. Se observa que en un medio básico se abate la fluorescencia y se desplazan las señales a 445nm y 470 nm para (STD)(H₂SO₄) y (STD)(HCl)₃ respectivamente, esto puede atribuirse a la solvatación sufrida por el estado excitado (denotada por el desplazamiento solvatocrómico) que favorece el cruzamiento de intersistemas ^{23,26}.

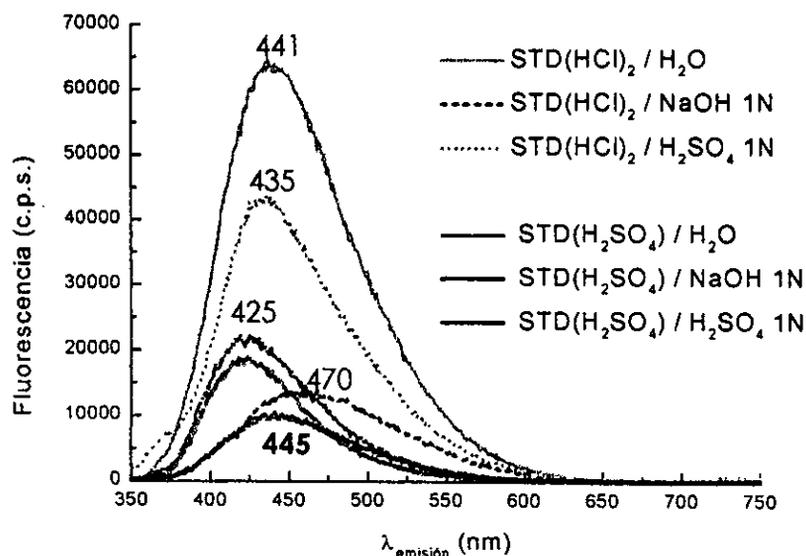


Figura 20. Fluorescencia de sales de STD 10m M en diferentes medios.

De tal manera, de acuerdo a este análisis espectrofotométrico en UV-vis y fluorescencia, de la estreptomina y estreptidina, en sólido y en disolución, se observa que los grupos guanidinos en ambas moléculas, presentan un efecto hipocrómico en sólido y un abatimiento de fluorescencia en disolución, cuando el ion sulfato es usado como contraión. Lo anterior indica que los grupos guanidinos de estas moléculas son sensibles a la interacción iónica en torno a ellos, implicando esto la posibilidad de aumentar o disminuir la respuesta espectroscópica al modificar su ambiente químico.

3.2. ESTUDIO TEÓRICO ACERCA DE LA ESTREPTOMICINA Y LA ESTREPTIDINA.

Debido a que los cálculos químico-teóricos permiten realizar análisis conformacionales y de distribución electrónica (apéndice II), son una herramienta importante de apoyo para poder explicar algunos fenómenos que se observan experimentalmente.

Por consiguiente, se empleó el método de mecánica molecular MM2²⁷ (contenido en el programa Chem 3D Pro²⁸) para la obtención de la geometría inicial y el método semiempírico PM3²⁹ (del programa Spartan³⁰) para obtener la optimización de las moléculas y los datos teóricos correspondientes, con el propósito de conocer la estereoquímica de la STP y la STD, y su comportamiento en disolución, analizando en particular las características de los grupos guanidinos.

Por los valores extraídos del método PM3 se tiene que la STP con aldehído es menos estable que la STP con -CH(OH)_2 , esto se deduce ya que la adición de una molécula de agua ($\Delta H_f = -53.42 \text{ Kcal/mol}$, $\mu_e = 1.73 \text{ Debye}$) por sí misma aumenta la estabilidad de la molécula de STP, es decir, si sumamos el ΔH_f del agua y el ΔH_f de la STP con el aldehído, obtenemos aproximadamente el valor de -512 kcal/mol correspondiente a la STP con -CH(OH)_2 . Por otro lado, si se quiere conocer cuál es la más estable en medio acuoso es necesario considerarlas en un medio tal. El método semiempírico PM3 de Spartan, nos permite simular a la STP rodeada de moléculas de agua. De los valores se puede ver que en medio acuoso la STP con $\text{R} = \text{-CH(OH)}_2$ ($\Delta H_f = -707.816 \text{ Kcal/mol}$) es mucho más estable que la STP con $\text{R} = \text{-CHO}$ ($\Delta H_f = -584.16 \text{ Kcal/mol}$), ya que se incrementan los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y el grupo aldehído. Los valores considerados en este análisis se muestran en la figura 21.

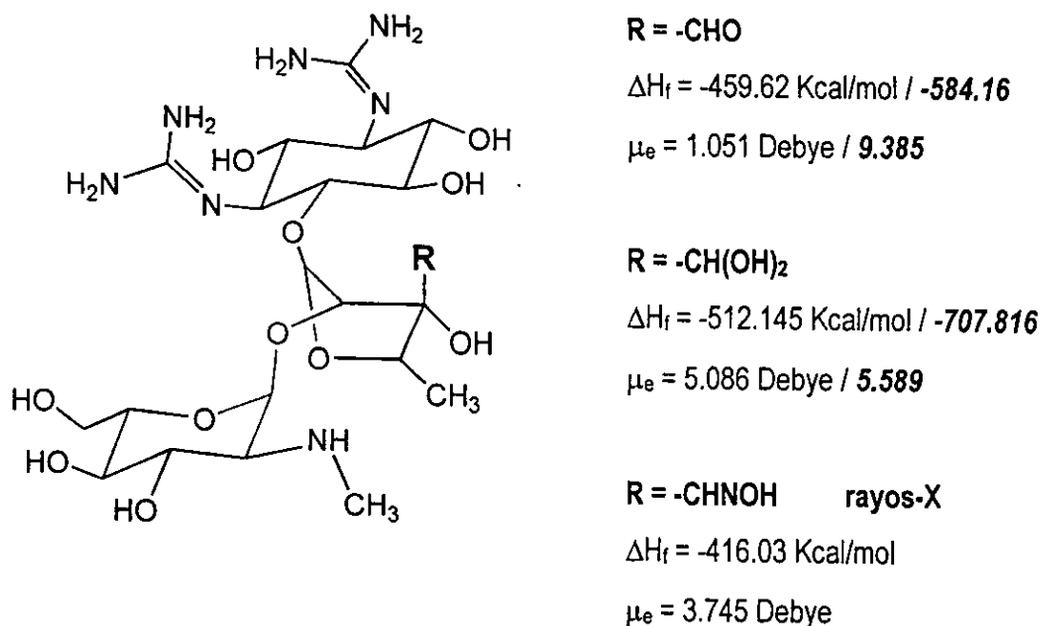


Figura 16. Valores teóricos por PM3 para STP (aislado/en agua).

Por otro lado, se analizó la estructura de la estreptomina vertida por mecánica molecular y por el método semiempírico PM3 (fig. 22). La conformación más estable por ambos métodos muestra que la molécula se "enrolla" manteniendo un grupo guanidino hacia adentro (interno) y el otro hacia afuera (externo, el opuesto al

enlace glucosídico, con el C7). La conformación de la estructura teórica (aislada y en medio acuoso) es muy semejante a la de la estructura obtenida por Neidle *et. al.* ³¹ por rayos-X (con R=CHNOH), esto nos indica que independientemente de las interacciones intermoleculares en estado sólido, la conformación en disolución se mantiene por las interacciones intramoleculares por puente de hidrógeno de la propia STP. El valor de $\mu_e=9.385$ (para la STP con el grupo aldehído) es debido a que, en este caso, el grupo aldehído es el sitio nucleofílico de la STP, que al solvatare favorece la polarización en torno a él.

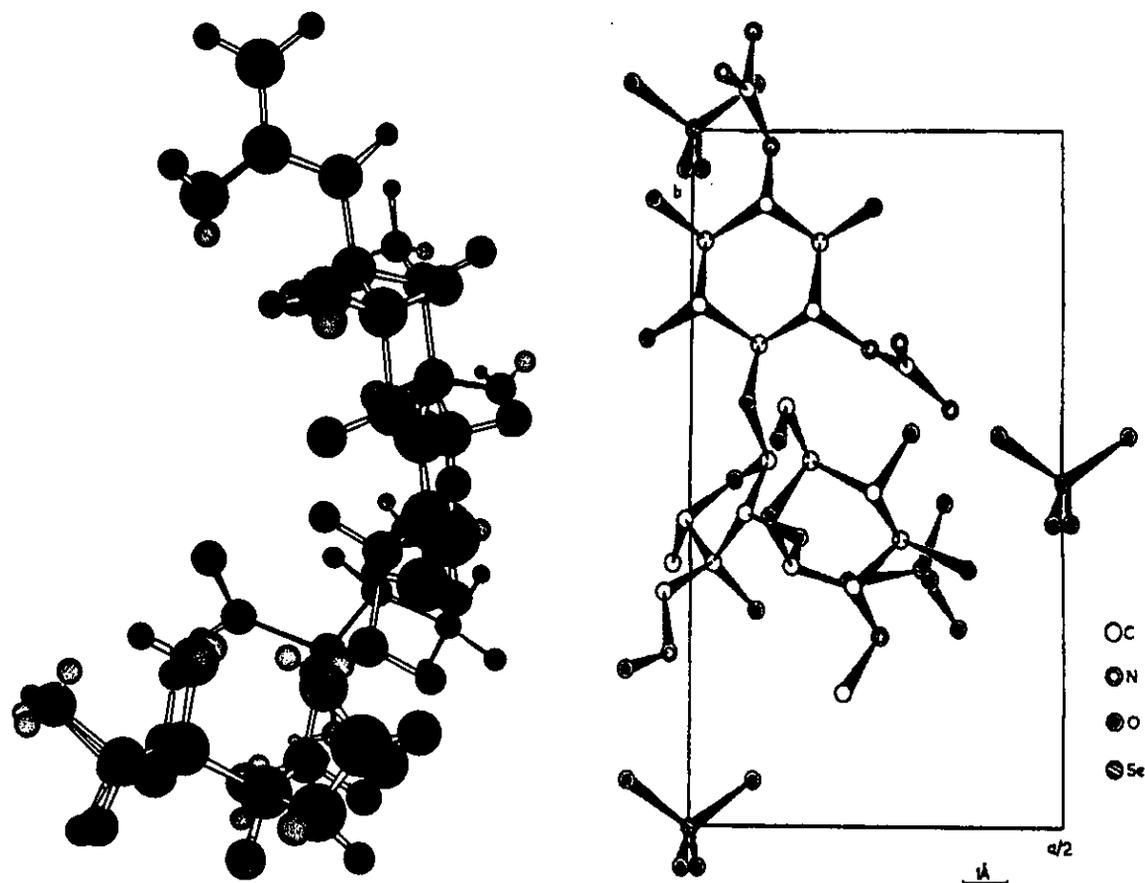


Figura 22. Estructura calculada por mecánica molecular de la STP y estructura por difracción de rayos-X del selenato de estreptomocina oxima, $(C_{21}H_{40}N_8O_{12})_2(H_2SeO_4)_3(H_2O)_8$ ³¹.

Así mismo, el método PM3 nos permite evaluar los valores de energía de los orbitales frontera, los cuales (como se menciona en el apéndice II) se pueden considerar como los sitios nucleofílico (HOMO) y electrófilico (LUMO) de la molécula. En la figura 23 se presentan las gráficas de HOMO y LUMO para la STP con el grupo aldehído. Las contribuciones atómicas más significativas al HOMO están dadas por el grupo guanidino externo, mientras que las contribuciones atómicas más significativas al LUMO están dadas por el grupo aldehído. Lo anterior plantea que el grupo guanidino externo es electrónicamente diferente al interno dadas las características de su

entorno químico, como se observa por RMN de ^{13}C . Por otra parte, el grupo aldehído es el centro electrofílico de la molécula, por lo cual es de esperarse que la adición de una molécula de agua sea factible en este sitio.

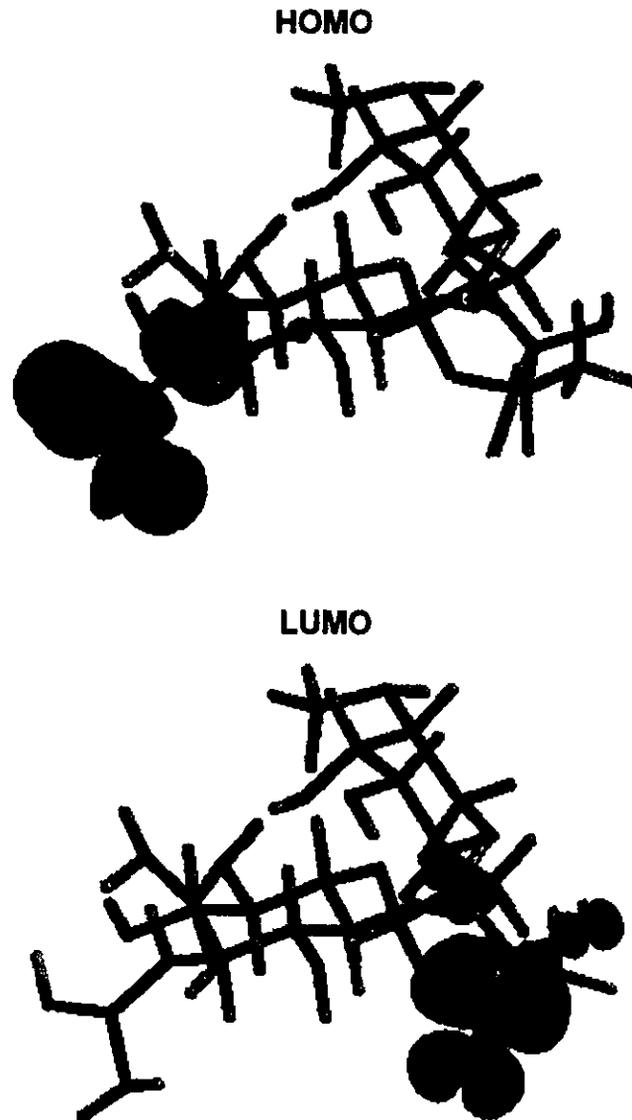


Figura 23. Estructura y representación gráfica de los orbitales frontera de la estreptomicina como molécula aislada.

Cuando el grupo aldehído de la estreptosa es sustituido por el grupo $-\text{CH}(\text{OH})_2$ en la STP, las principales contribuciones al HOMO y al LUMO recaen sobre el grupo guanidino externo, es decir, se convierte en el sitio más reactivo de la molécula. Otro aspecto significativo es que las contribuciones atómicas a los orbitales moleculares más internos (HOMO-1 y HOMO-2) y más externos (LUMO+1 y LUMO+2) siguen localizadas en el grupo guanidino externo. Sin embargo, el LUMO+3 se ubica sobre los enlace glucosídicos lo cual explica por qué se requieren condiciones tan drásticas para romperlos.

Con respecto a la STD, se realizó un estudio de sus cuatro tautómeros. De los datos se deduce que el más estable es el que tiene el doble enlace deslocalizado entre los tres nitrógenos del grupo guanidino (fig. 24). Por otro lado, se tiene que la estabilidad de las especies diprotonadas es la misma, independientemente del tautómero manejado (fig. 25).

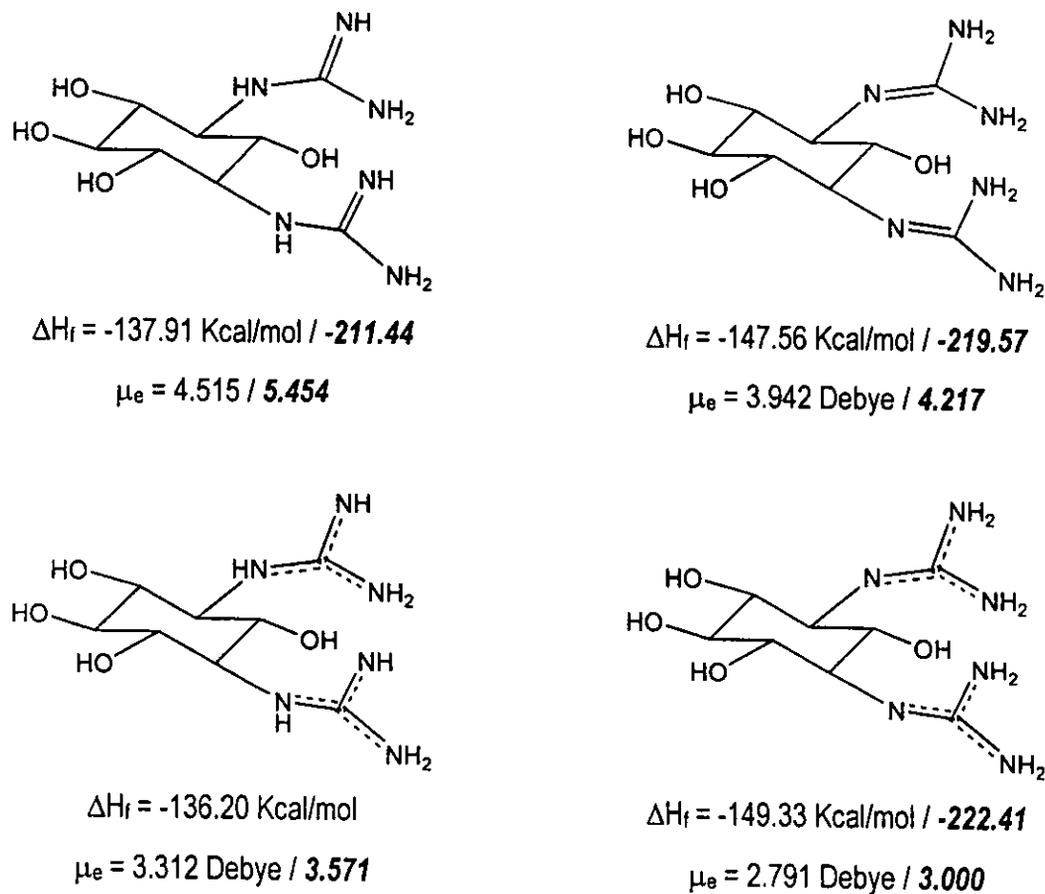
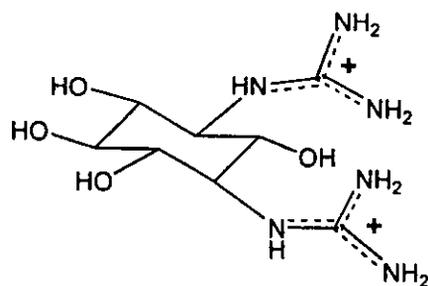


Figura 24. Resultados de cálculos teóricos en PM3 para los tautómeros de STD (aislado / agua).



$$\Delta H_f = 188.94 \text{ Kcal/mol}, \mu_e = 7.573 \text{ Debye}$$

Figura 25. Resultados de cálculos teóricos en PM3 para STD diprotonada.

Al comparar las distancias intermoleculares de los guanidinos calculadas por PM3 y las verdidas por difracción de rayos-X (fig 26, apéndice I), encontramos que difieren de manera significativa debido a que en sólido, por el empaquetamiento, la STD presenta interacciones por puente de hidrógeno.

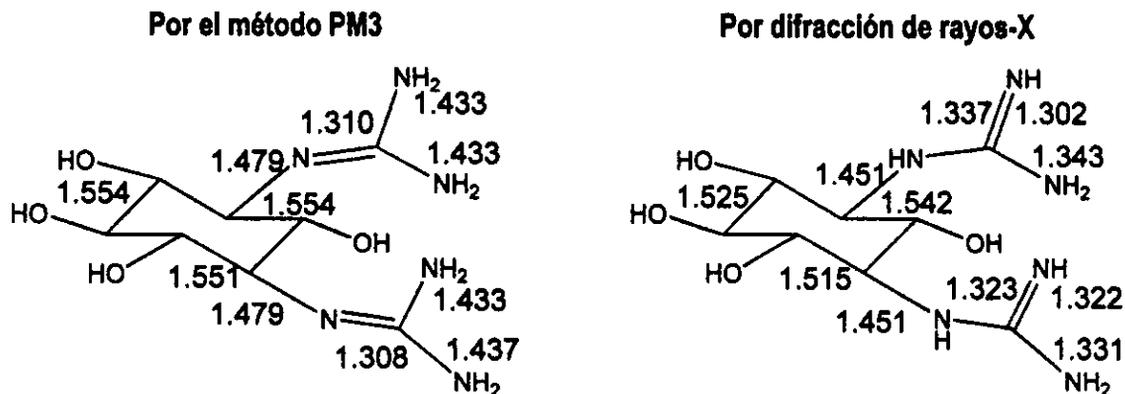


Figura 26. Distancias interatómicas de la STD

El hecho de que los dos guanidinos no sean equivalentes en sólido, fundamentalmente se debe a los puentes de hidrógeno que el ion sulfato tiene con las moléculas de STD a su alrededor. Debido a que las contribuciones atómicas al HOMO y al LUMO (fig. 27) ocurren sobre guanidinos diferentes, se puede suponer que ésta debe ser una razón adicional para que los dos guanidinos no sean electrónicamente iguales, puesto que los sitios nucleofílico y electrofílico se sitúan en lados contrarios de la molécula.

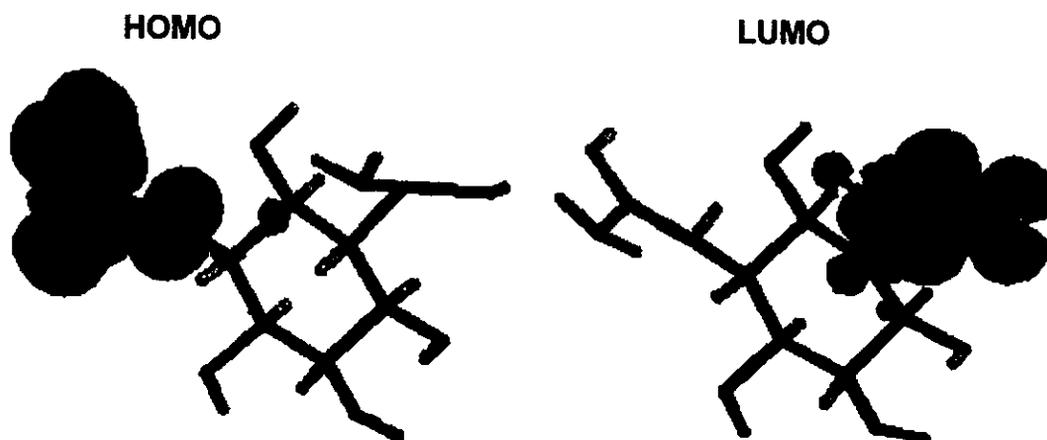


Figura 27. Estructura y representación gráfica de los orbitales frontera de la estreptidina como molécula de aislada.

Conforme a los planteamientos espectroscópicos y estructurales establecidos en torno a la STP, la estructura sugerida para el sulfato de estreptomina, $(STP)_2(H_2SO_4)_3$, se presenta en la figura 28. La localización de los

grupos sulfato es por analogía con las estructuras de rayos-X del $\text{STD}(\text{H}_2\text{SO}_4)$ y del $(\text{STP})_2(\text{H}_2\text{SeO}_4)_3(\text{H}_2\text{O})_8$. La conformación de la estreptomicina debe mantenerse tanto en sólido como en disolución, puesto que la estereoquímica dada por rayos-X y por los cálculos teóricos es equivalente.

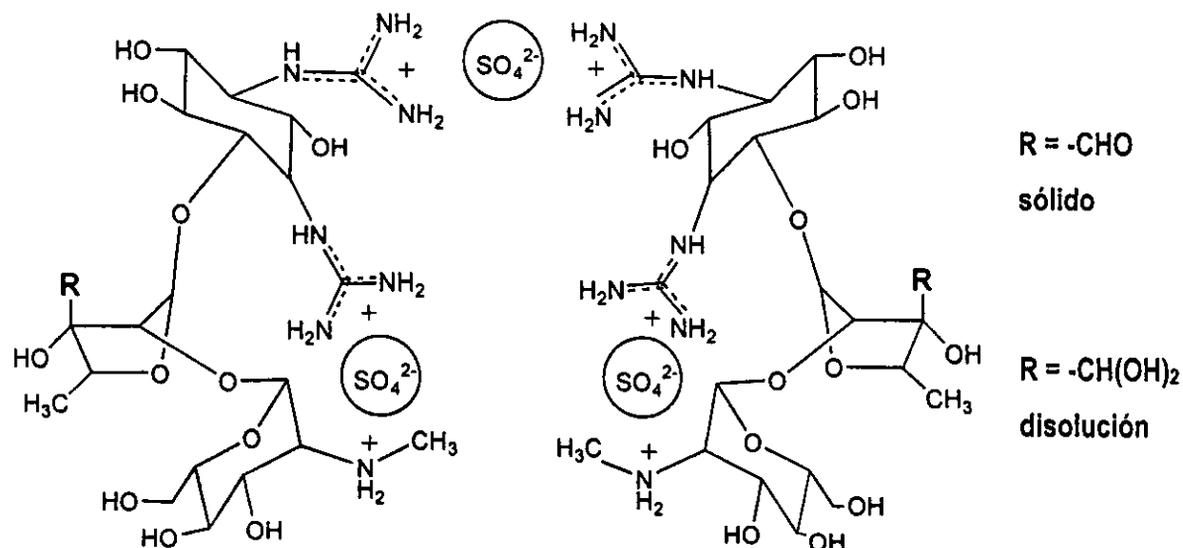


Figura 28. Arreglo intermolecular propuesto para el $(\text{STP})_2(\text{H}_2\text{SO}_4)_3$

3.3. ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA UV, RMN Y CG DE LA REACCION DE HIDROLISIS DE ESTREPTOMICINA.

En los experimentos fluorimétricos informados en la literatura se emplean medios alcalinos (con NaOH) al momento de hacer las mediciones¹⁷. Por consiguiente, otra serie de experimentos consistieron en realizar seguimientos espectrales en UV-vis de la STP en medio acuoso alcalino, con el fin de investigar la estabilidad y los posibles productos de hidrólisis de la STP (fig. 29).

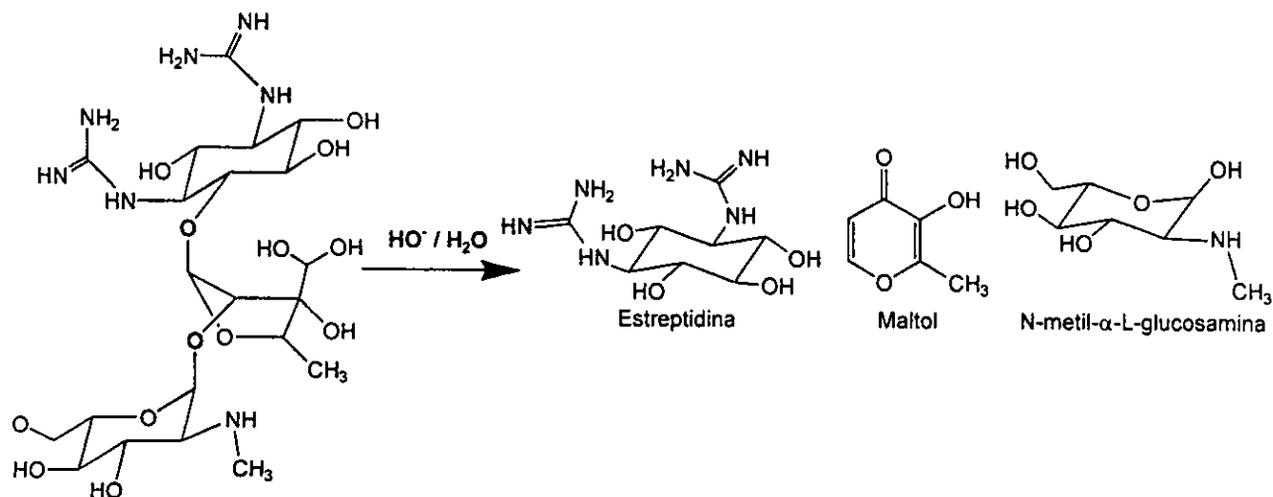


Figura 29. Productos de la hidrólisis básica de la STP.

Inicialmente, se realizó el análisis por UV-vis de la STP en medio básico. En esta parte, se pudo establecer que la absorción de la STP en este medio se debe al maltol, pudiéndose llevar a cabo la determinación de la STP en concentraciones de μM , por la formación de maltol (fig.30). Para descartar la participación de una oxidación en la hidrólisis, se trabajó también en atmósfera inerte, observándose los mismos resultados.

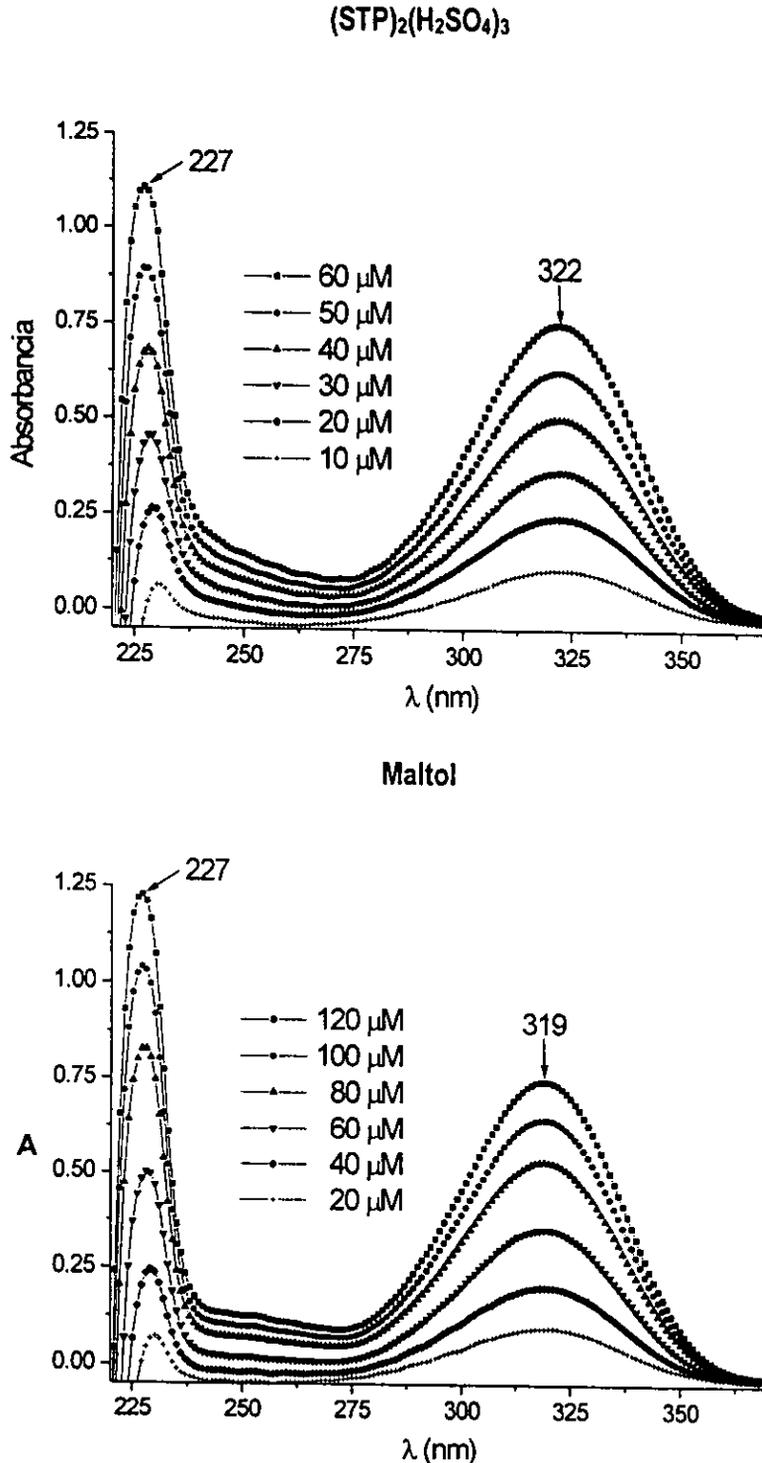


Figura 30. Espectros de UV-vis para STP y maltol en NaOH 1N a 25°C por 48 hrs.

Para la hidrólisis de la STP en medio ácido son necesarias condiciones drásticas. De acuerdo a la literatura es necesario mantenerla a calentamiento prolongado (48 hrs.) en medio muy ácido (H_2SO_4 1N)¹⁷. Con la ruptura de uno de los enlaces glucosídicos se obtiene la STD, la cual debido al pH ácido se disuelve, por consiguiente, el espectro resultante es semejante al que se obtiene de las sales de STD.

Con el objeto de establecer si en las bandas de absorción que se observan en el espectro de UV-vis, puede haber una contribución de los productos de hidrólisis básica, se llevaron a cabo una serie de experimentos que consistieron en hacer combinaciones entre éstos (fig. 31). Se empleó medio básico, para simular las condiciones de hidrólisis y poder favorecer las reacciones. Como se puede ver, las señales de maltol no se ven afectadas, lo cual indica que el sistema cromóforo no reacciona con la STD y la glucosamina. Sin embargo, las bandas del maltol podrían estar enmascarando las posibles bandas resultantes de la reacción de los otros productos. Por consiguiente, se manejaron aparte la STD y la glucosamina (fig. 32). La mezcla de reacción se torna amarilla con desprendimiento de NH_3 , y muestra la aparición de una banda a 225nm, el cambio en el espectro puede deberse a la hidrólisis del grupo guanidino a estreptamina o estreptourea (fig. 33), la cual se ve favorecida en presencia del azúcar reductor (glucosamina en medio básico)^{32, 33}.

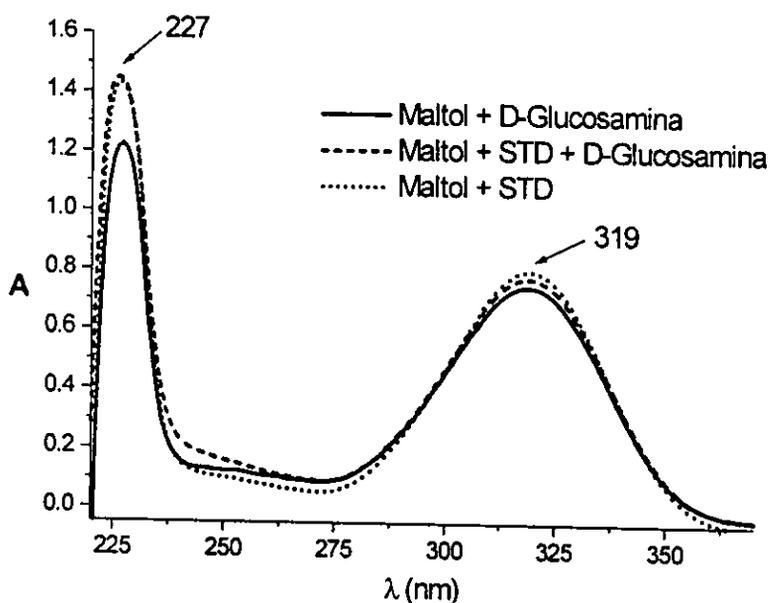


Figura 31. Combinaciones a $120\mu\text{M}$ en NaOH 1N a 25°C después de 48 hrs

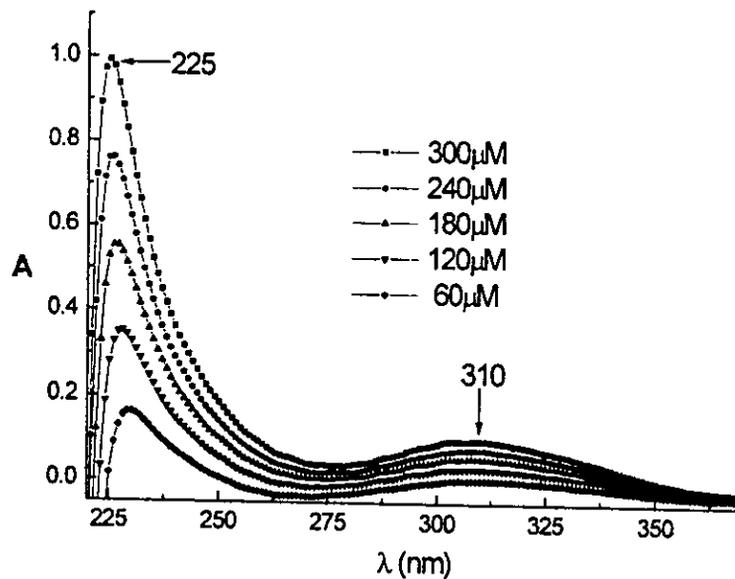


Figura 32. STD + D-Glucosamina en NaOH 1N a 25°C. después de 48 hrs

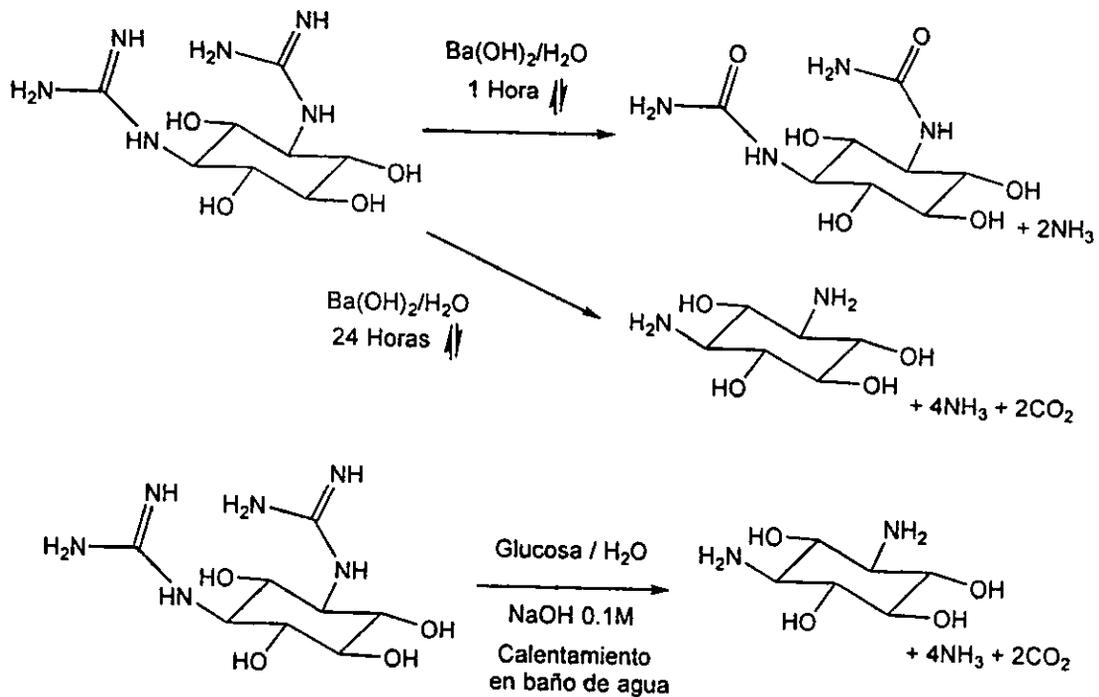


Figura 33. Hidrólisis de STD.

Para discernir si estas reacciones se están llevando a cabo se realizó un seguimiento de las reacciones de hidrólisis por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C con el fin de caracterizar la estructura de los productos de hidrólisis en disolución. Se detecta la obtención de la estreptidina por medio de la hidrólisis ácida y la

formación del maltol; así como la degradación de la estreptidina y la glucosamina en la hidrólisis básica. En el espectro de RMN de ^{13}C del sulfato de STP en medio ácido (H_2SO_4) (fig. 34), se detecta la ruptura del enlace glucosídico α 1 \rightarrow 4 por la aparición de dos señales, una a 74 ppm la cual corresponde a los carbonos C-4 y C-5 de la estreptidina "libre", y otra a 99 ppm, la cual corresponde al carbono 1' de la estreptosa. Trabajando en otras condiciones, con 1.3g de sulfato de STP en 10mL de agua (a reflujo por 10min), fue posible la separación de uno de los componentes de la STP, la N-metil glucosamina (fig. 35 y tabla 13).

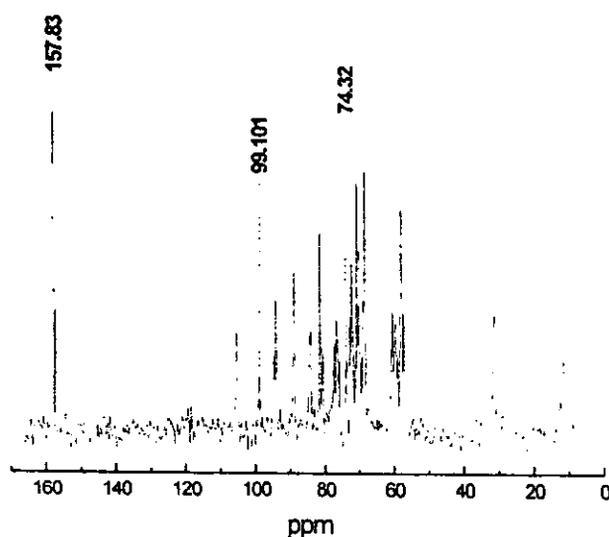


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C del sulfato de STP en medio ácido.

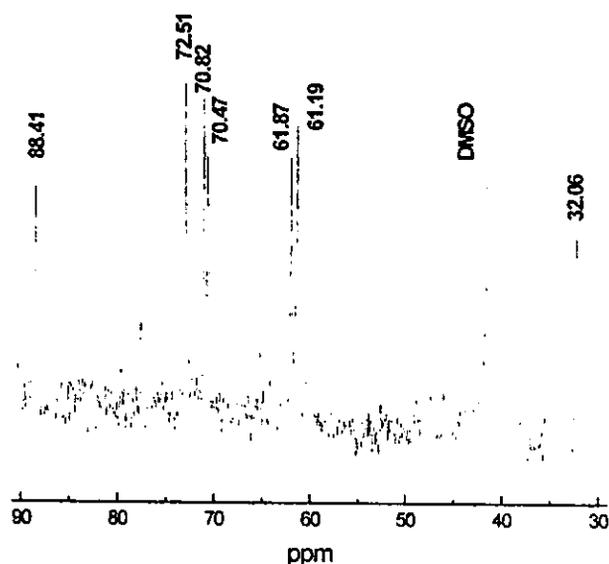


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C de la N-metil glucosamina.

Tabla 13. Estructura, asignación y desplazamientos de RMN de ^{13}C de N-metil glucosamina.

	$\delta(\text{ppm})$
	1'' 88.41
	2'' 61.87
	3'' 70.82
	4'' 70.47
	5'' 72.51
	6'' 61.19
7'' 32.06	

En relación a la hidrólisis de la STP en medio básico (NaOH 1N) se detecta desprendimiento de NH_3 , lo cual indica la posible formación de estreptourea. Se realizó el correspondiente estudio para la reacción de hidrólisis por RMN de ^{13}C (fig. 36). El espectro cambia considerablemente sobre todo a bajo campo, donde las señales de los grupos guanidinos se desplazan. De acuerdo al número de señales y su desplazamiento, uno de los productos es el maltol y otro de ellos es un derivado de la estreptidina (tabla 14). Este derivado es la estreptidina con un grupo guanidino oxidado a urea, como se puede ver por el desplazamiento a campo bajo del C-8 (a 170.98 ppm). Los desplazamientos de las señales del maltol pueden cambiar al variar el pH y el disolvente (tabla 15), ya que se afecta el sistema constituido por la doble ligadura conjugada al carbonilo. El grupo de señales poco intensas de 33 a 101 ppm, a 162 ppm y a 181 ppm deben corresponder a las formas anoméricas α y β de un derivado de la N-metil glucosamina.

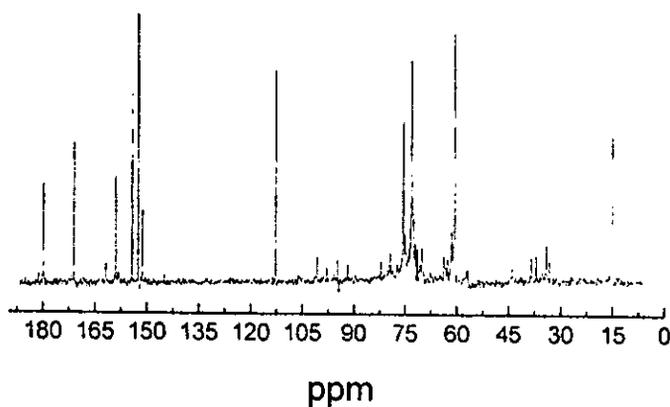


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C del sulfato de STP en medio básico.

Tabla 14. Estructura, asignación y desplazamientos en RMN de ^{13}C para la hidrólisis de STP.

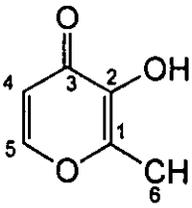
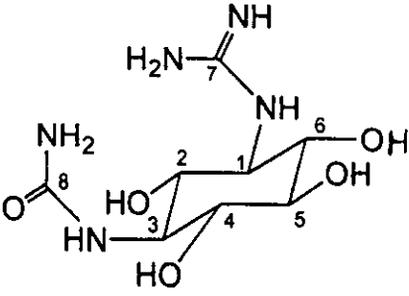
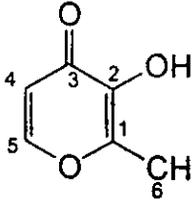
	$\delta(\text{ppm})$			$\delta(\text{ppm})$	
	1	152.43		1, 3	60.37
	2	151.16		2	72.71
	3	179.80		5	73.00
	4	112.56		4, 6	75.49
	5	154.13		7	158.98
	6	14.67	8	170.98	

Tabla 15. Desplazamientos en RMN de ^{13}C para maltol en diferentes disolventes.

δ (ppm)	DMSO-d6	CDCl_3	D_2O	$\text{NaOH 0.1 N/D}_2\text{O}$			
	1	148.9	1	155.7	1	154.9	
	2	142.6	2	141.7	2	144.2	
	3	172.1	3	173.2	3	176.3	
	4	113.2	4	113.3	4	113.1	
	5	154.3	5	154.2	5	154.3	
	6	13.8	6	14.3	6	13.7	6

Por otro lado, para poder separar los distintos compuestos que se forman en la hidrólisis básica, se empleó cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas. Se empleó una técnica de trimetilsililación de aminoazúcares ^{34, 35} (fig. 1). Posteriormente se analiza por GC y EM (fig. 37). De acuerdo al cromatograma, se contempla la formación de varios productos.

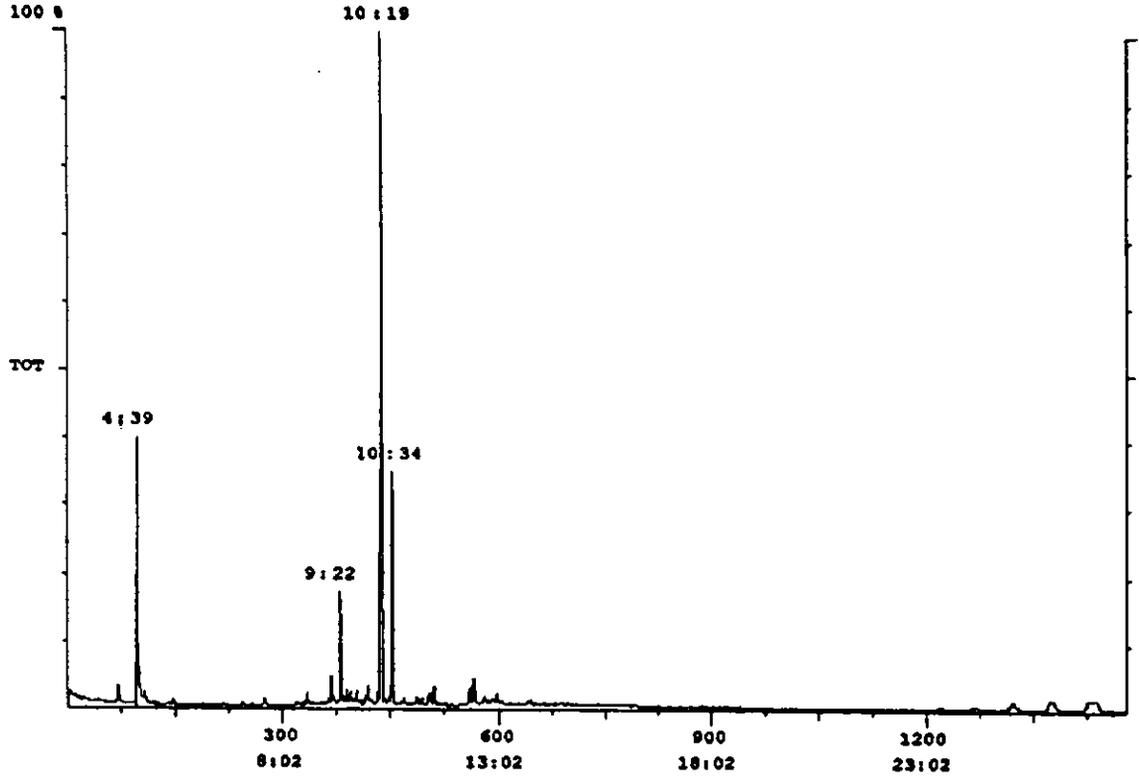
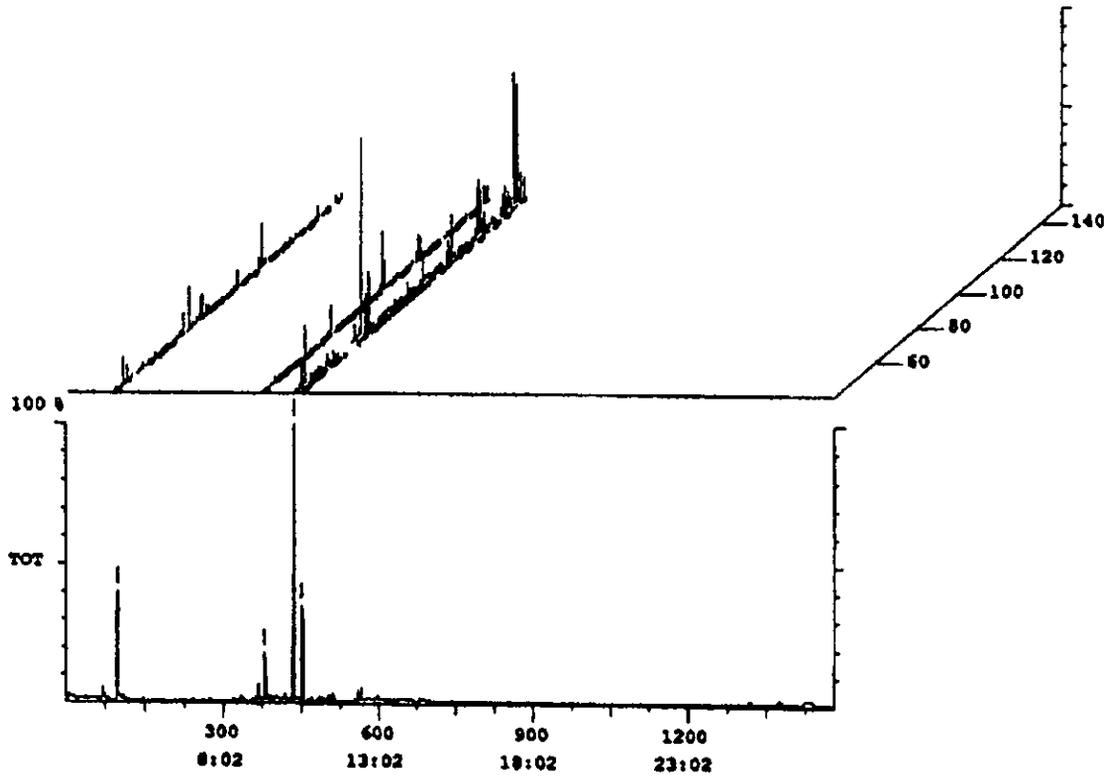


Figura 37. Cromatogramas de $(STP)_2(H_2SO_4)_3$ hidrolizada en medio básico.

En todos los espectros están presentes los iones a m/z 45 ($\text{CH}_3\text{O}^+=\text{CH}_2$), m/z 73 (Me_3Si^+) y m/z 147 ($\text{Me}_3\text{SiO}^+\text{SiMe}_2$), los cuales son característicos de los derivados trimetilsililados de carbohidratos ³⁴. En los dos primeros espectros de masas (fig. 38), se muestra la primer fracción del hidrolizado de $(\text{STP})_2(\text{H}_2\text{SO}_4)_3$ y el maltol que se uso como estándar (a las mismas condiciones). El pico metaestable a m/z 183 corresponde al derivado sililado del maltol (fig. 39), que es resultado de la pérdida de Me (M-15) del grupo trimetilsilicio (TMS). El ion M-15 esta siempre presente en los derivados trimetilsililados, y puede ser usado junto con los iones M-90 (pérdida de TMSiOH), M-(15+90), y M-(15+2x90) para determinaciones de masa molecular y confirmación del valor del ion M^+ , sin embargo, no provee de información estructural ³⁴.

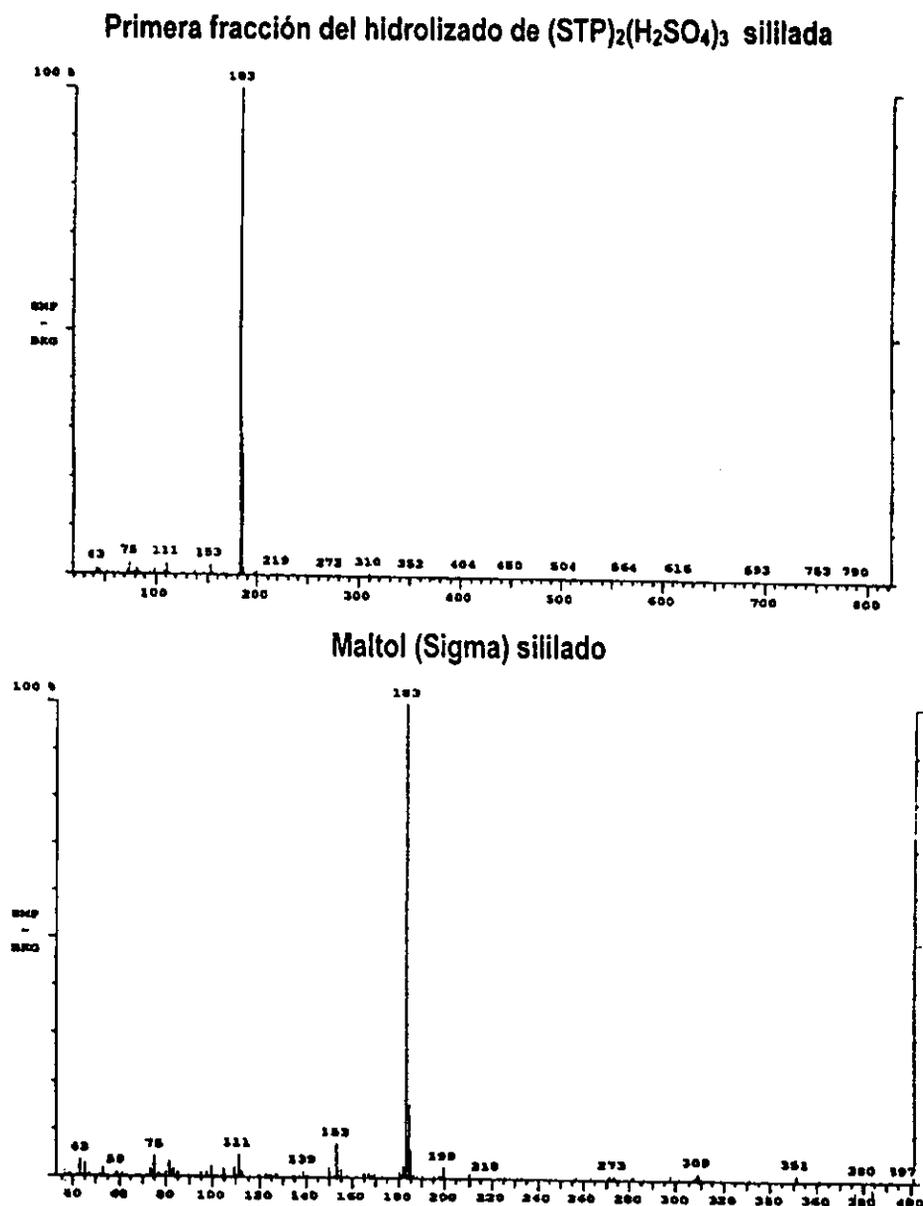


Figura 38. Espectros de masas asignados a maltol trimetilsililado.

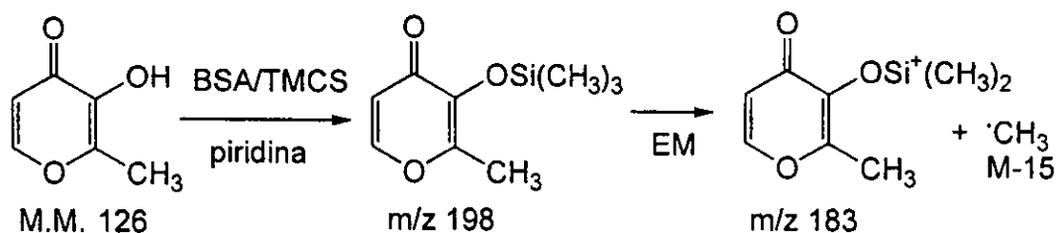


Figura 39. Formación del ion del pico base del maltol.

Para las siguientes fracciones se propone la formación de dos subproductos, un derivado inositolico (de la estreptidina) y otro furanósico (de la glucosamina) (figs. 40 y 41). El primer espectro (fig. 40) presenta un pico intenso a m/z 435, el cual es característico de derivados inositolicos trimetilsililados³⁶. Los espectros siguientes (fig. 41) muestran los picos característicos para derivados trimetilsililados de hexofuranosas, a m/z 204 (TMSO-CH=CH-OTMS), m/z 217 (o equivalente) (TMSO-CH=CH-CH=O+TMS) y m/z 319 (o equivalente) (TMSO-CH=CH-CH(TMSO)-CH+OTMS)^{37, 38}. Estos últimos espectros (fig. 41) son semejantes debido a que son formas anoméricas (α y β) de una misma furanosa³⁹.

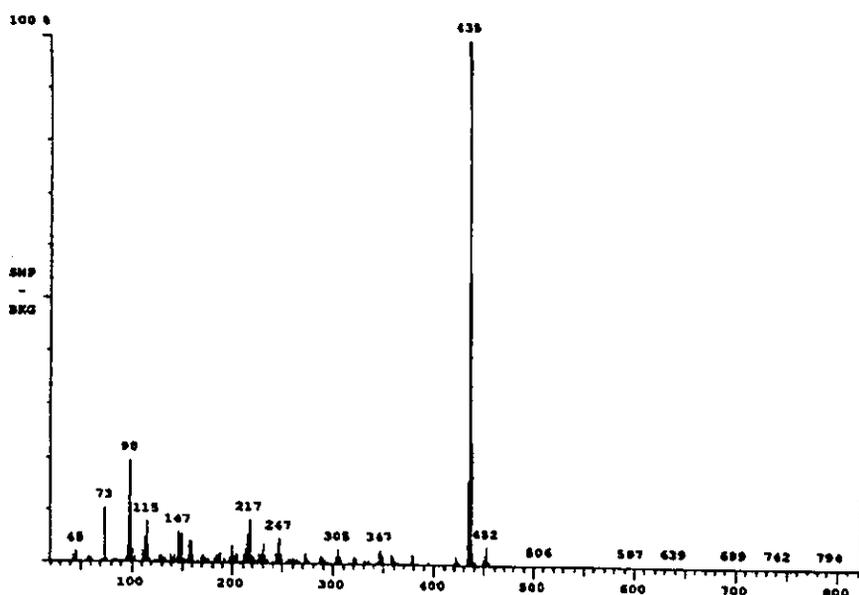


Figura 40. Derivado inositolico.

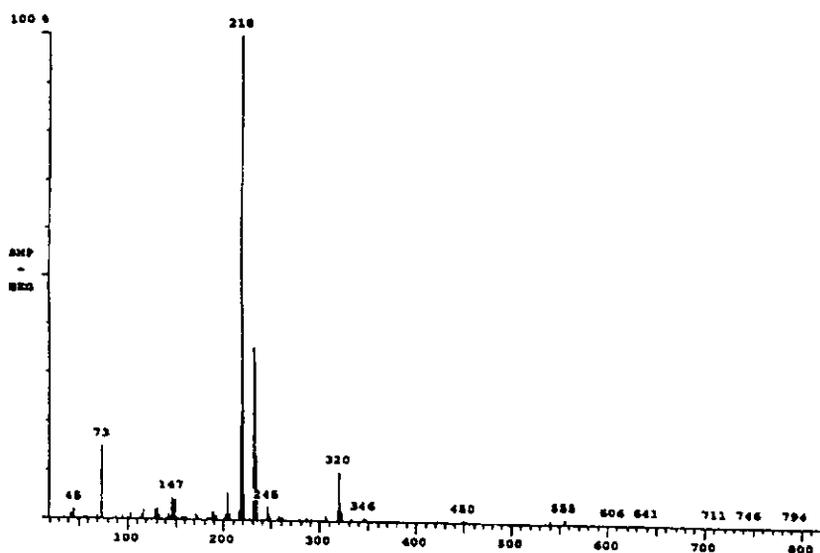
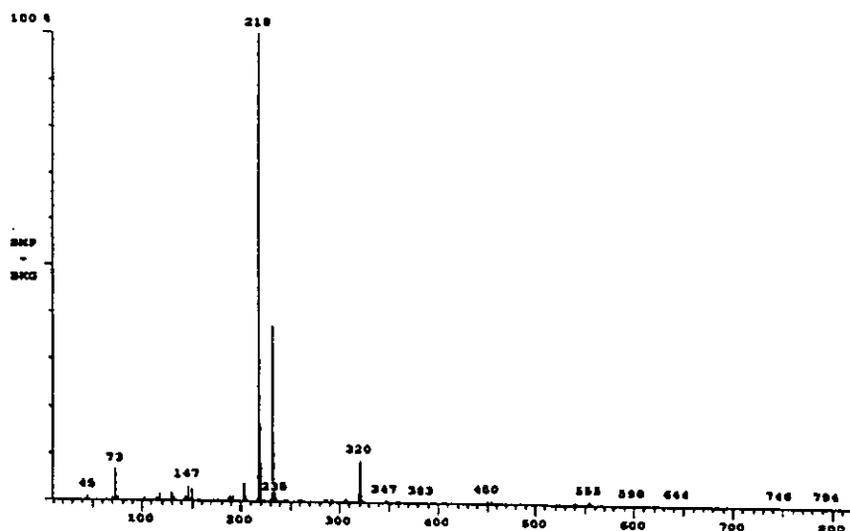


Figura 41. Derivado furanósico.

3.4. ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO DE LA ESTREPTOMICINA FRENTE A IONES METALICOS.

Para analizar la interacción de la STP con algún ion metálico de interés biológico, el antibiótico se hizo reaccionar con sales metálicas de Co(II), Ni(II), Cu(II) y Ca(II) en estequiometría 3:1 (M:L) en medio acuoso y metanólico, se mantuvieron a reflujo por 48 horas. El estudio espectrofotométrico en disolución con el sulfato de STP se realizó por UV-vis y fluorescencia, empleando sales cloruro de Co(II), Ni(II), Cu(II) y Ca(II) en medio acuoso y metanólico.

Cuando se emplea agua como disolvente, se favorece la hidrólisis ácida de la STP, dichas disoluciones presentaron fluorescencia como consecuencia de dicha reacción (fig. 42), ya que la STD se solubiliza gracias al

medio ácido. En metanol, la fluorescencia es mucho menor y en la mayoría de los casos nula, debido a que la STP sólo se suspende en MeOH.

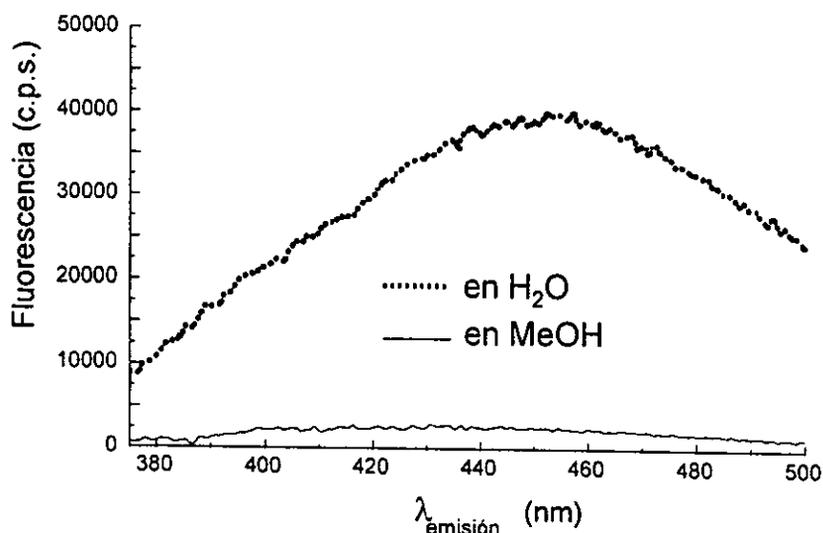


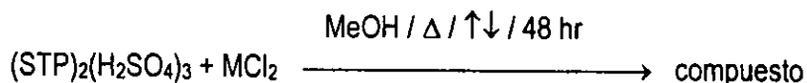
Figura 42. Espectros de fluorescencia de sulfato de STP (5 mM) con CuCl_2 (30 mM).

De la hidrólisis del sulfato de STP con CuCl_2 en medio acuoso, se logró la obtención de un monocristal el cual, por difracción de rayos-X, resultó ser el sulfato de estreptidina. Dicha obtención resulta ser una forma novedosa y más rápida para obtener sulfato de STD, pues el tiempo de reacción es menor (dos horas). A continuación se describen los compuestos que se obtienen de la interacción de la STP y STD con diferentes iones metálicos

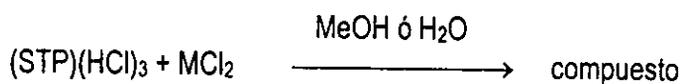
En medio metanólico la estreptomina no se hidrolizó en presencia de los iones metálicos. Se observó el desplazamiento del ión sulfato, lo cual se verificó por la ausencia de azufre en el análisis elemental y por la desaparición de las bandas características en IR medio del ion sulfato.

3. 4. 1. Caracterización de los compuestos metálicos obtenidos con estreptomina y estreptidina.

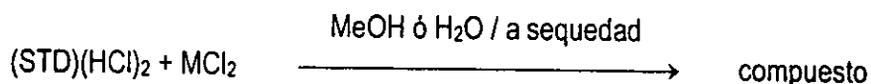
La síntesis de los compuestos con sulfato de STP se realizó como se describe en la parte experimental. La obtención de los compuestos con STD no resultó sencilla. Inicialmente, se trabajó el sulfato de STD en MeOH, en un sistema a reflujo, sin resultado alguno, aún cambiando el disolvente por agua y los tiempos de reacción hasta por 7 días. Posteriormente, se trató de hacer reaccionar con Na_2CO_3 , NaOH y sales carbonato de Cu(II) y Ni(II) (con el fin de eliminar los sulfohidratos de los grupos guanidinos, que impiden la coordinación) sin éxito alguno en ninguna de las condiciones antes mencionadas. Por último, se trabajó con el cloruro de STD, obteniéndose los compuestos correspondientes (tablas 16, 17 y 18).

Tabla 16. Análisis elementales de compuestos con $(STP)_2(H_2SO_4)_3$ 

Compuesto	Experimental / Calculado				Color
	%C	%H	%N	%S	
$(STP)(CoCl_4)(H_2O)_7$	25.70 / 27.77	5.54 / 5.88	9.67 / 10.79	0.0 / 0.0	azul rey
$(STP)(NiCl_2)(H_2O)_{14}$	26.28 / 26.18	7.52 / 7.01	9.33 / 10.18	0.0 / 0.0	verde claro
$(STP)(CuCl_2)(H_2O)_6$	29.88 / 30.61	6.33 / 6.24	11.38 / 11.90	0.0 / 0.0	amarillo verdoso
$(STP)(CaCl_2)(H_2O)_8$	30.55 / 30.15	6.94 / 6.63	11.88 / 11.72	0.0 / 0.0	crema claro

Tabla 17. Análisis elementales de compuestos con $(STP)(HCl)_3$ 

Compuesto	Experimental / Calculado			Color
	%C	%H	%N	
$(STP)(CoCl_4)(H_2O)_7$	30.86 / 27.77	6.47 / 5.88	11.34 / 10.79	azul rey
$(STP)(NiCl_2)(H_2O)_{14}$	26.84 / 26.18	7.20 / 7.01	9.53 / 10.18	verde claro
$(STP)(CuCl_2)(H_2O)_6$	30.30 / 30.61	6.30 / 6.24	10.99 / 11.90	amarillo verdoso
$(STP)(CaCl_2)(H_2O)_8$	30.52 / 30.45	6.95 / 6.63	11.78 / 11.72	crema claro

Tabla 18. Análisis elementales de compuestos con $(STD)(H_2SO_4)$ 

Compuesto	Experimental / Calculado			Color
	%C	%H	%N	
$(STD)(CoCl_4)(H_2O)_2$	20.88 / 19.32	5.58 / 4.46	16.82 / 16.91	verde oscuro
$(STD)(NiCl_2)(H_2O)_{16}$	14.04 / 14.16	6.20 / 7.43	11.18 / 12.39	amarillo naranja
$(STD)(CuCl_2)(H_2O)_6$	19.29 / 19.08	4.60 / 6.01	15.95 / 16.70	amarillo naranja
$(STD)(CaCl_2)(H_2O)_{11}$	16.42 / 16.84	5.92 / 7.07	13.06 / 14.74	crema claro

Para corroborar el número de moléculas de agua de hidratación en los compuestos sintetizados, se realizaron los correspondientes análisis termogravimétricos (fig. 43).

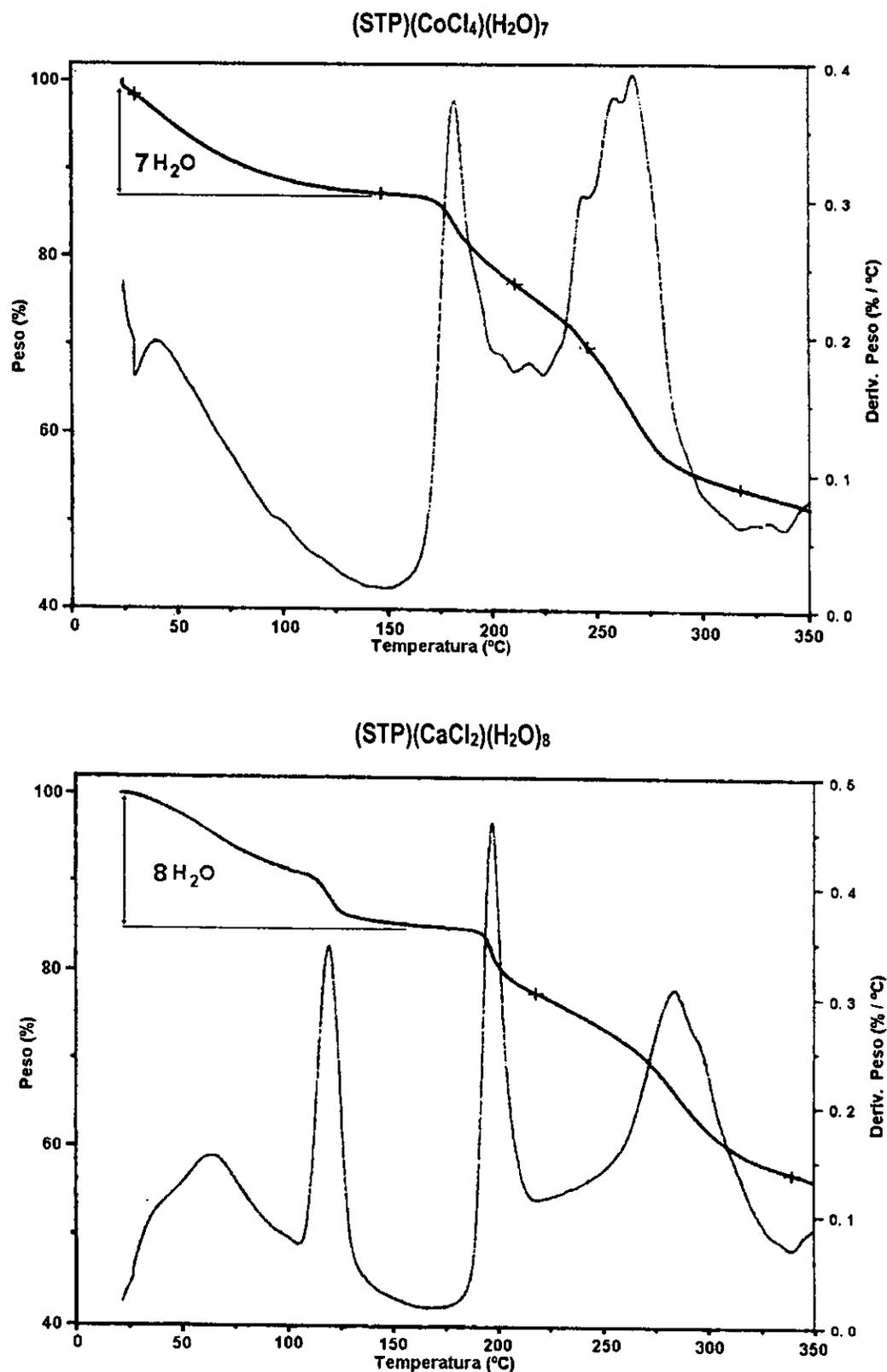


Figura 43. Análisis termogravimétricos.

La técnica base para caracterizar los compuestos fue la reflectancia difusa (UV-Vis en sólido), la cual nos permite determinar el ambiente electrónico del ion metálico. En la tabla 19 se describen transiciones electrónicas e intervalos en el UV-vis⁴⁰, correspondientes para las diferentes geometrías entorno al ion metálico de los compuestos sintetizados.

Tabla 19. Espectroscopía electrónica en la región de UV-Vis-IR.

Ion metálico	Geometría	Transición	λ (nm)	ν (cm ⁻¹)
Co ²⁺	tetraédrico	${}^4T_1(F) \leftarrow {}^4A_2(\nu_2)$	1110-2000	9000-5000
		${}^4T_1(P) \leftarrow {}^4A_2(\nu_3)$	540-740	18500-13500
Ni ²⁺	octaédrico	${}^3T_{2g} \leftarrow {}^3A_{2g}(\nu_1)$	770-1420	13000-7000
		${}^3T_{1g} \leftarrow {}^3A_{2g}(\nu_2)$	500-910	20000-11000
		${}^3T_{1g}(P) \leftarrow {}^3A_{2g}(\nu_3)$	370-530	27000-19000
Cu ²⁺	octaédrico	${}^2T_{2g} \leftarrow {}^2E_g$	625-910	16000-11000

Los espectros de reflectancia difusa de los compuestos con cobalto son típicos de complejos tetraédricos. Estos compuestos presentan una banda de absorción ancha centrada en 15000 cm⁻¹ y otra de menor intensidad en 6550 cm⁻¹ que por sus características (posición y forma), son asignables a las transiciones electrónicas ${}^4T_1(P) \leftarrow {}^4A_2(\nu_3)$ y ${}^4T_1(F) \leftarrow {}^4A_2(\nu_2)$ respectivamente, las cuales son propias de compuestos de cobalto(II) con geometría tetraédrica (fig. 44).

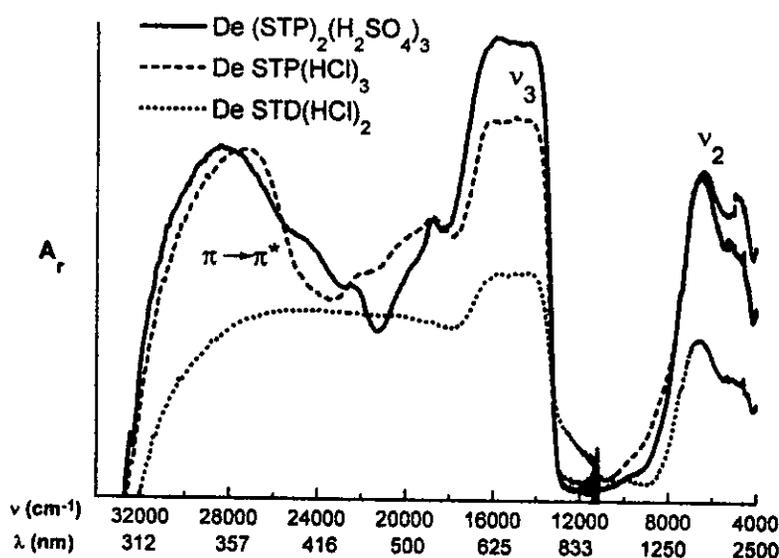


Figura 44. Espectros de reflectancia difusa de compuestos con CoCl₂.

En la figura 45 se muestra la comparación de espectros con el propósito de mostrar gráficamente que la señal en el UV es debida a la absorción característica $\pi \rightarrow \pi^*$ del grupo guanidino (27500 cm^{-1}) y las bandas en el visible son correspondientes a las transiciones electrónicas ${}^4T_1(F) \leftarrow {}^4A_2$ ($\nu_2=15000 \text{ cm}^{-1}$) y ${}^4T_1(P) \leftarrow {}^4A_2$ ($\nu_3=6550 \text{ cm}^{-1}$) del ion $[\text{CoCl}_4]^{2-}$.

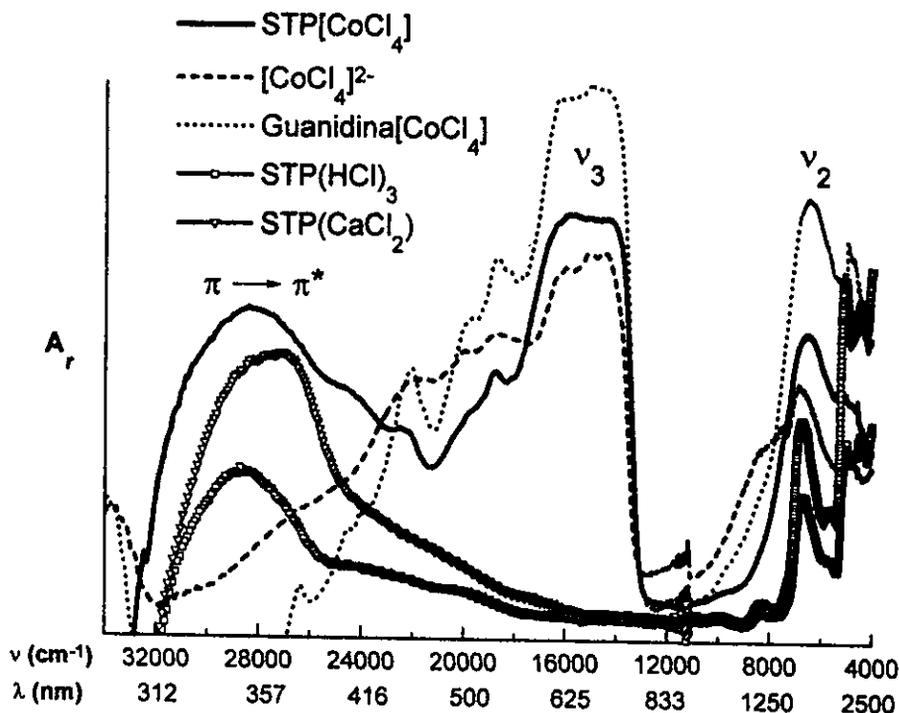


Figura 45. Comparación de espectros con respecto al $\text{STP}[\text{CoCl}_4]$.

Dado que los espectros electrónicos de los compuestos obtenidos con níquel resultaron ser similares, éstos se discuten conjuntamente (fig. 46). Se pudo observar que el ion metálico presenta una geometría octaédrica dada la posición de las bandas (tabla 19). La región de 33000 a 19000 cm^{-1} , para los tres compuestos, muestra una banda con un hombro en el intervalo de 2800 a 2600 cm^{-1} debida a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los guanidinos. El desplazamiento de las señales indica que el entorno electrónico no es el mismo, pero es muy semejante en cuanto a la geometría octaédrica.

Los espectros de los compuestos de cobre presentan dos bandas en el UV-Vis (fig. 47), una debida a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los guanidinos y otra asignable a la transición ${}^2T_{2g} \leftarrow {}^2E_g$ para un compuesto de $\text{Cu}(\text{II})$ hexacoordinado con una geometría octaédrica distorsionada (tabla 19).

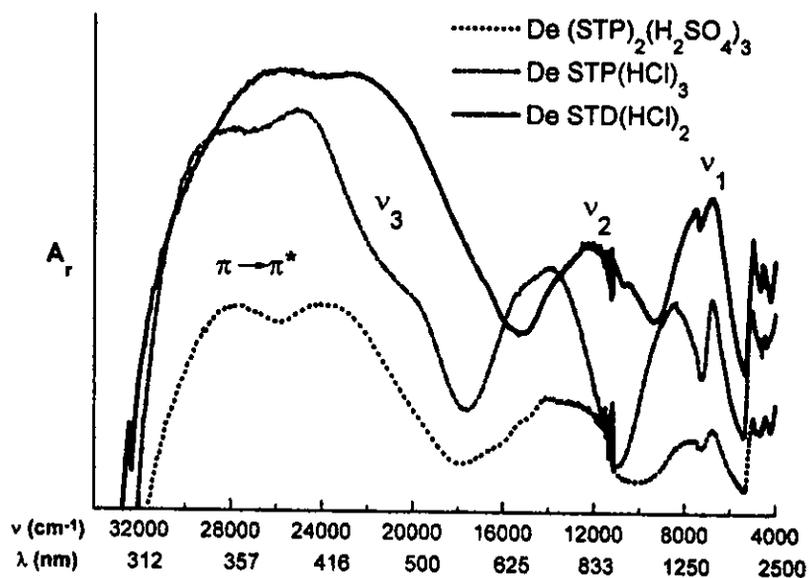


Figura 46. Espectros de reflectancia difusa de compuestos con NiCl_2 .

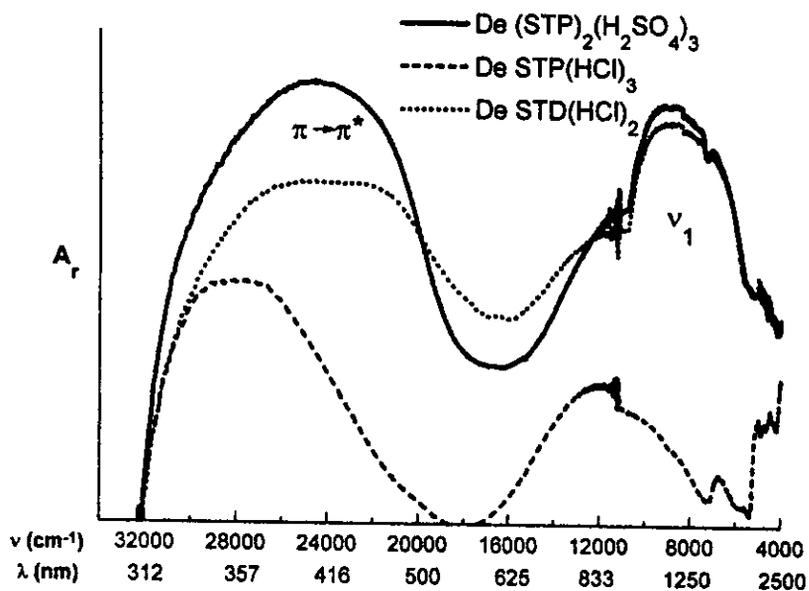


Figura 47. Espectros de reflectancia difusa de compuestos con CuCl_2 .

En la figura 48, se muestra una comparación entre los compuestos de STD, en los que se denota la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los guanidinos y las transiciones d-d, independientes entre sí. Estos compuestos presentan un comportamiento espectral similar a los correspondientes compuestos con STP.

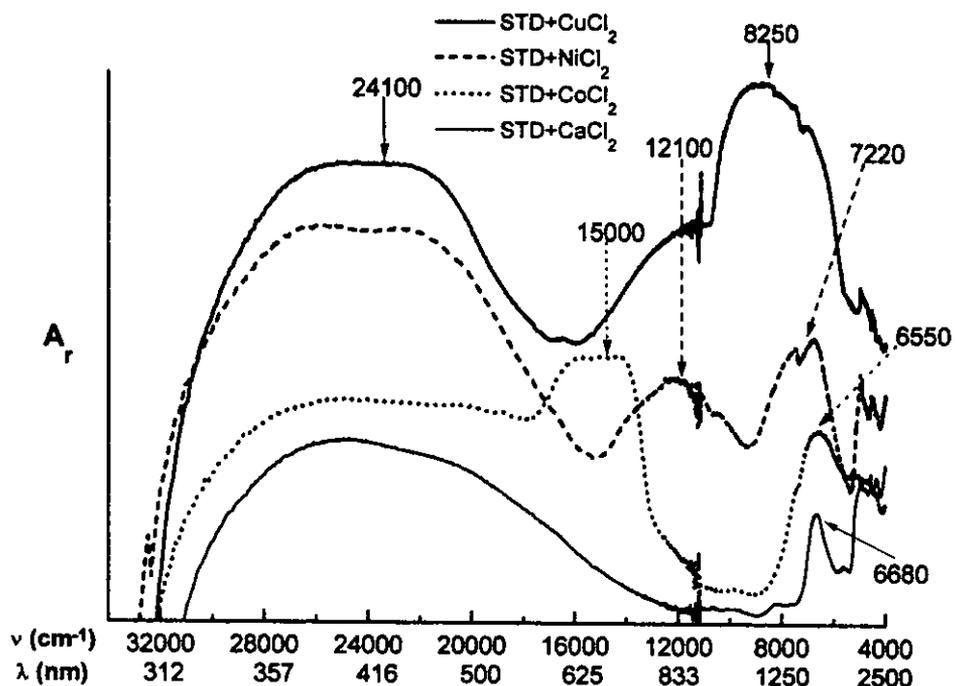


Figura 48. Espectros de reflectancia difusa de compuestos con STD.

Los espectros de UV-Vis en disolución acuosa de todos estos compuestos, corresponden a los espectros reportados para las sales metálicas empleadas en medio acuoso ⁴⁰.

Los compuestos obtenidos con STP y STD son altamente higroscópicos, sin embargo, los compuestos con Co(II) son poco higroscópicos, lo cual permitió medir sus momentos magnéticos (tabla 20). El valor informado para en ion tetraédrico $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ es de 4.59 MB. Por precipitación de AgCl se cuantificó la presencia de los cuatro cloruros para el compuesto* a partir de la sal sulfato.

Tabla 20. Momentos magnéticos de compuestos con CoCl_2 .

Compuesto	$\mu(\text{MB})$
$(\text{STP})_2(\text{H}_2\text{SO}_4)_3$	0.00
$(\text{STP})[\text{CoCl}_4]^*$	4.61
$(\text{STP})(\text{HCl})_3$	0.00
$(\text{STP})[\text{CoCl}_4]$	4.61
$(\text{STD})(\text{HCl})_2$	0.00
$(\text{STD})[\text{CoCl}_4]$	4.61

Los espectros de infrarrojo medio de los compuestos obtenidos presentan los desplazamientos y las bandas correspondientes al cloruro de STP. Por consiguiente, fue necesario analizarlos por IR lejano para observar el tipo de interacción entre el ion metálico con la STP o los iones cloruro. Los espectros de IR lejano de los

CONCLUSIONES

- La estreptomycinina presenta una conformación helicoidal que se estabiliza por puentes de hidrógeno intramoleculares, mostrando un grupo guanidino externo. La conformación de la estreptomycinina se mantiene independientemente si se encuentra en estado sólido, en disolución o aislada.
- Por medio de las diferentes técnicas espectroscópicas se pudo observar que los grupos guanidinos de la estreptomycinina y de la estreptidina, no son electrónicamente equivalentes. Esto se corroboró por medio de la estructura por difracción de rayos-X del sulfato de estreptidina y adicionalmente por los cálculos teóricos correspondientes.
- Los grupos guanidinos son los responsables de que la estreptomycinina y la estreptidina a concentraciones milimolares y micromolares, presenten fluorescencia, la cual se incrementa en las sales clorhidrato. La fluorescencia observada depende de la naturaleza del grupo electroattractor que se emplee como contraión.
- Se pudo determinar que el maltol es un producto de la hidrólisis básica y que la estreptidina y la glucosa reaccionan para dar un derivado inositolico y otro furanósico, respectivamente. En la hidrólisis ácida del sulfato de estreptomycinina se obtiene el sulfato de estreptidina.
- El ion sulfato puede ser desplazado por los iones metálicos de transición y el ion calcio en medio metanólico, ocupando los mismos sitios de interacción, o pueden hidrolizar a la estreptomycinina en medio acuoso. Este es un resultado importante desde el punto de vista biológico, ya que esta podría ser una forma de activación para que el antibiótico ejerza su acción.

PERSPECTIVAS.

Los resultados de este estudio sobre las diferentes sales de estreptomina y de sus componentes, puede proveer las bases para el entendimiento de su comportamiento químico-biológico, ya que hasta el momento no se ha podido determinar si la acción de la estreptomina, a nivel tisular, se debe al compuesto completo o a sus derivados de hidrólisis.

Las propiedades fluorescentes observadas sugieren que la responsable de la citofluorescencia podría ser la estreptidina aislada y no la estreptomina, lo cual se encuentra apoyado por un reciente estudio de la unión de estreptidina a un receptor biológico de tipo catiónico en el oído ⁴².

Desde el punto de vista biológico, las observaciones en torno a los grupos guanidinos, son de gran importancia, puesto que por un lado comprueban que la unión a un sitio catiónico membranar, se efectúa a través del grupo guanidino ⁴², y por otro lado, la gran estabilidad que presenta *in vivo* la estreptomina, ya que los enlaces glucosídicos solo pueden romperse por una glucosidasa de alta especificidad como se ha encontrado recientemente en la investigación que se está realizando *in vitro* e *in vivo*, para contribuir a esclarecer la acción de la estreptomina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Goodman, L.S. & Gilman, A., *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Vol II, 9th edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana, México (1996).
- 2.- i) Lemieux, R.U. & Wolfrom, M.L., *The chemistry of streptomycin*, *Advanced Carbohydrate Chemistry*, **3**, 337 (1948).
 ii) Schlessinger, D. & Medoff, G., *Streptomycin, dihydrostreptomycin, and the gentamicins*, *Antibiotics*, **3**, 535-550 (1975).
- 3.- Chonan, Z.H. & Ansari, M.H., *Effects of metal ions on the antimicrobial activity of aminoglycoside class of antibiotics*, *Pakistan Journal of the Pharmacology*, **6**(1-2), 21-26 (1989).
- 4.- Foye, W.O.; Lange, W.E.; Swintosky, J.V.; Chamberlain, R.E., & Guarini, J.R., *Metal chelates of streptomycin*, *Journal of the American Pharmaceutical Association*, **44**, 261-263 (1955).
- 5.- i) Agrawal, J.K. & Vijayavargiya, R., *Acid dissociation constant of streptomycin perchlorate and the stability constant of its complex with copper (II)*, *Journal of the Indian Chemical Society*, **52**, 190-192 (1975).
 ii) Agrawal, J.K., & Vijayavargiya, R., *Composition and stability of streptomycin complexes with nickel(II) and cobalt(II)*, *Journal of the Indian Chemical Society*, **52**, 576-578 (1975).
- 6.- Barba-Behrens, N., Bautista, J.L., Ruiz M.E., Joseph-Nathan, P., Flores-Parra, A., & Contreras, R., *Coordination compounds derived from the interaction of streptomycin and cobalt, nickel, copper, and calcium salts characterized by ¹³C NMR and spectroscopic studies. Structure and bonding properties of the streptidine fraction*, *Journal of the Inorganic Biochemistry*, **40**, 201-215 (1990).
- 7.- i) El-Ries, M.A., Abu-El-Wafa, S.M., Aly, F.A., El-Beairy, M.A., *Structural elucidation of copper(II)-streptomycin complex. Indirect estimation of streptomycin by atomic absorption spectroscopy*, *Analytical Letters*, **18**, 1905-1913 (1985).
 ii) El-Ries, M.A., Abu-El-Wafa, S.M., Aly, F.A., El-Beairy, M.A., *Structural elucidation of copper(II)-streptomycin complex. Indirect estimation of streptomycin by atomic absorption spectroscopy*, *Egyptian Journal of the Pharmaceutic Science*, **26**, 1-6 (1986).
- 8.- i) Novikova, L.S. et al., *Khim-Farm. Zh.*, **11**, 100 (1977).
 ii) Berezhinskaia, V.V., Dolgova, G.V. & Firsov, A.A., *Nerve-blocking properties of antibiotics*, *Antibiotiki (Moscow)*, **22**(9), 821-824 (1977).
 iii) Novikova, L.S., & Chernov, N.E., *Study of the kinetics of freeze drying of ristomycin and streptomycin-calcium chloride complex solutions*, *Khim-Farm. Zh.*, **15**, 89-90 (1981).
 iv) Ziia, A.V., Sokolova, G.B. & Lebedeva, M.N., *Acute toxic action of combinations of antibiotics with isoniazid*, *Antibiotiki (Moscow)*, **27**(7), 535-539 (1982).
- 9.- Peck, L., Brink, N.G., Kuehl, F.A.Jr., Flynn, E.H., Walti, A. & Folkers, K., *Streptomyces antibiotics. II. Crystalline streptomycin trihydrochloride-calcium chloride double salt*, *Journal of the American Chemical Society*, **67**, 1866-1867 (1945).
- 10.- Dámaso-López, D., *Antibacterianos*, Ed. Marketing Pharm, S.A., España, 297-329 (1990).
- 11.- Robinson, G.C., Bambon, K.G., *N. Engl. J. Med.*, **271**, 949 (1964).
- 12.- Wersäll, J., *Scand. J. Infect. Dis., Suppl.*, **23**, 104 (1980).
- 13.- Cone, L.A., *A survey of prospective, controlled clinical trials of gentamicin, tobramycin, amikacin, and netilmicin*, *Clinical Therapeutic.*, **5**(2), 155-162 (1982).

- 14.- The Index Merck, 12th edition, Merck & Co., Inc., U.S.A. (1996).
- 15.- Vademécum farmacéutico de medicamentos, 6^a edición, Rezza Editores, Colombia (1997).
- 16.- Diccionario de especialidades farmacéuticas. Ediciones P.L.M. S.A., 44^a edición, México (1998).
- 17.- Stenlake, J.B., Foundations of molecular pharmacology, Vol I, Medical and Pharmaceutical Chemistry. The Athlone Press, London, 675-686 (1979).
- 18.- Schatz, A., Bugie, E., & Waksman, S.A., **Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria**, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, **55**, 66-69 (1944).
- 19.- Polglase, W.J., **Contribution of the cation groups of dihydrostreptomycin to biological activity**, *Nature*, **206**(981), 298-299 (1965).
- 20.- i) Prestsh, E., Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos, 1^a edición, Ed. Alhambra, S.A. España (1980).
- ii) Silverstein, R.M., Spectrometric identificación of organic compounds, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A. (1974).
- 21.- Hull, W.E. & Kricheldorf, H.R.; **¹⁵N-NMR Spectrometry. The structure of streptomycin in solution**, *Liebigs Ann Chem.*, **1**, 158-164 (1980).
- 22.- Willard H.H., Merrit, L.L. & Dean, J.A., Métodos instrumentales de análisis, Cia. Ed. Continental, S.A. de C.V., México (1984).
- 23.- Braun, R.D., Introduction to instrumental analysis, McGraw-Hill Book Company, U.S.A, 153-156, 262-265, 324-325 (1987).
- 24.- Faure, F. & Blanquet, P., **Microdosage fluorométrique de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine par la réaction au -naphtoquinone-4-sulfonate de sodium en milieu alcalin**, *Clinica Chimica Acta*, **9**, 292-300 (1964).
- 25.- Bareggi, R., Narducci, P., Grill, V., Mallardi, F., Zweyer, M. & Fusaroli P., **Localization of and aminoglycoside (streptomycin) in the inner ear after its systemic administration**, *Histochemistry*, **84**, 237-240 (1986).
- 26.- Schulman, S.G., Fluorescence and fosforescence spectroscopy: physicochemical principles and practice. Pergamon press. Great Britain (1979).
- 27.- Allinger, N.L., **Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V₁ and V₂ torsional terms**, *Journal of the American Chemical Society*, **99**, 8127-8134 (1977).
- 28.- Chem 3D Pro 3.2, CambridgeSoft Corporation, Inc, 875 Massachusetts Ave., Cambridge, Massachusetts 02139 USA (1995)
- 29.- i) Dewar, M.J.S. & Thiel, W., **Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters**, *Journal of the American Chemical Society*, **99**, 4899-4906 (1977).
- ii) Dewar, M.J.S. & Thiel, W., **Ground states of molecules. 39. MNDO results for molecules containing hydrogen, carbon, nitrogen, and oxygen**, *Journal of the American Chemical Society*, **99**, 4907-4917 (1977).
- iii) Stewart, J.P., **Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method.**, *Journal of Computational Chemistry*, **10**, 209 (1989).
- 30.- Spartan 4.0, Wavefunction, Inc., 18401 Von Karman Ave., # 370 Irvine, CA 92715 USA, (1995).
- 31.- Neidle, S, Rogers, D. & Hursthouse, M.B., **The crystal and molecular structure of streptomycin oxime selenate**, *Tetrahedron letters*, **46**, 4725-4728 (1968).

- 32.- Peck, R.L., Hoffhine, C.E.Jr., Peel, E.W., Graber, R.P., Holly, F.W., Mazingo, R. & Folkers, K., **Streptomyces antibiotics. VII. The structure of streptidine**, *Journal of the American Chemical Society*, **68**, 776-781 (1946).
- 33.- Ballesteros, M., Martin, M.A., Del Castillo, B. & Ortega, M., **Fluorescent species produced by the interaction of streptomycin and glucose**, *Journal of the Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, **6** (2), 191-197 (1998)
- 34.- Kärkkäinen, J. & Vihko, R., **Characterisation of 2-amino-2-deoxy-D-glucose, 2-amino-2-deoxy-D-Galactose, and related compounds, as their trimethylsilyl derivatives by gas- liquid chromatography - mass spectrometry**, *Carbohydrate Research*, **10**, 113-120 (1969).
- 35.- Hurst, R.E., **The trimethylsilylation reactions of hexosamines, and gas-chromatographic separation of the derivatives**, *Carbohydrate Research*, **30**, 143-154 (1973).
- 36.- Mejanelle, P., Bleton, J., Goursaud, S., Tchaplá, A., **Identification of phenolic acids and inositols in balms and tissues from an Egyptian mummy**, *Journal of the Chromatography A*, **767**, 177-186 (1997).
- 37.- Bleton, J., Mejanelle, P., Sansoulet, J., Goursaud, S., Tchaplá, A., **Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums**, *Journal of the Chromatography A*, **720**, 27-49 (1996).
- 38.- De Jongh, D.C., Radford, T., Hribar, J.D., Hanessian, S., Bieber, M., Dawson, G. & Sweeley, C.C., **Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry**, *Journal of the American Chemical Society*, **91**, 1728-1740 (1969).
- 39.- Kärkkäinen, J., Lehtonen, A. & Nikkari, T., **Determination of glucosamine and galactosamine by gas chromatography**, *Journal of Chromatography*, **20**, 457-462 (1965).
- 40.- i) Lever, A.B.P., **Inorganic electronic spectroscopy**, 2nd edition, Elsevier, The Netherlands (1986).
ii) Cotton, F.A. & Wilkinson, G., **Advanced inorganic chemistry**, 5th edition, John Wiley & Sons, USA, (1988).
- 41.- i) Nakamoto, K., **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**, 4th edition, John Wiley & Sons, USA (1986).
ii) Ferraro, J.R., **Low-frequency vibrations of inorganic and coordination compounds**, Plenum Press, New York, USA (1971).
- 42.- i) Meza, G., Guerra, G., Granados, O., Barba-Behrens, N., Toxqui, A. & Hernández, C., **Estreptomycin: propiedades fisicoquímicas y toxicidad vestibular**, *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, **44** (1), 21-25 (1999).
ii) Meza, G., *et. al.*, **Presencia de la glucosidasa con posible acción hidrolítica sobre aminoglicósidos en la sangre y el vestíbulo de ratas pigmentadas**, *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, (en prensa) (1999).
iii) Guerra, G. & Meza, G., **Dissection of the site of streptomycin binding to biological membranes**, *Boletín de Educación Bioquímica*, **16** (No. especial), 98 (1997).

APENDICE I. Información cristalográfica del (STD)(H₂SO₄)(H₂O).

Tabla A1. Datos cristalográficos del sulfato de estreptidina.

Fórmula empírica	C ₈ H ₂₂ N ₆ O ₉ S
Masa Molecular	378.38 g/mol
Color	Amarillo claro
Temperatura de medición	293(2) K
Longitud de onda, λ (MoK α)	0.71073 Å
Grupo espacial	Trigonal, P3(2)
Dimensiones de la celda unitaria.	a = 9.1297(6) Å α = 90°. b = 9.1297(6) Å β = 90°. c = 16.2706(18) Å γ = 120°.
Volumen	1174.48(17) Å ³
Z, Densidad calculada	3, 1.605 mg/m ³
Coefficiente de absorción	0.268 mm ⁻¹
F(000)	600
Tamaño del cristal	0.3 x 0.3 x 0.5 mm
Intervalo θ para datos de colección	2.58 a 29.98 grados
Reflecciones colectadas / únicas	3078 / 2478 [R(int) = 0.0363]
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados sobre F ²
Datos / restricciones / parámetros	2478 / 1 / 220
Indices F finales [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0.0679, R _{w2} = 0.1820
Indice R (todos los datos)	R ₁ = 0.0874, R _{w2} = 0.1986

Tabla A2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

	x	y	z	U(eq)
S(1)	3614(2)	21335(2)	10422(1)	31(1)
O(1A)	3642(9)	21872(9)	11271(4)	67(2)
O(2A)	3738(14)	22683(9)	9882(5)	93(3)
O(3A)	4790(12)	20877(15)	10247(7)	114(4)
O(4A)	1950(10)	19870(8)	10253(4)	77(2)
O(1B)	6514(7)	15834(7)	9419(3)	47(1)
C(1)	3091(6)	21332(7)	6473(3)	25(1)
N(1)	2007(6)	20326(6)	7144(3)	35(1)
C(2)	2309(7)	22250(7)	6010(3)	27(1)
O(2)	2194(6)	23347(6)	6575(3)	37(1)
C(3)	3436(6)	23213(6)	5274(3)	24(1)
N(3)	2721(6)	24099(6)	4839(3)	30(1)
C(4)	3595(7)	21998(6)	4691(3)	26(1)
O(4)	4619(7)	22942(5)	4008(3)	41(1)
C(5)	4436(7)	21139(6)	5151(3)	27(1)
O(5)	4566(6)	19985(5)	4619(3)	38(1)
C(6)	3419(7)	20193(6)	5909(3)	27(1)
O(6)	4207(6)	19421(5)	6330(3)	38(1)
C(7)	2312(7)	20729(7)	7940(3)	29(1)
N(8)	1172(7)	19665(7)	8486(3)	37(1)
N(7)	3660(9)	22081(8)	8199(4)	56(2)
C(9)	3174(7)	25704(6)	4960(4)	30(1)
N(10)	4332(8)	26647(6)	5518(4)	42(1)
N(9)	2476(8)	26403(7)	4514(4)	47(1)

Table A3. Longitudes de enlace [Å], ángulos de enlace [°] y ángulos de torsión [°].

S(1)-O(3A)	1.362(8)	O(3A)-S(1)-O(1A)	114.6(6)	C(6)-C(1)-N(1)-C(7)	130.2(6)
S(1)-O(1A)	1.463(6)	O(3A)-S(1)-O(4A)	107.3(6)	C(2)-C(1)-N(1)-C(7)	-105.8(6)
S(1)-O(4A)	1.463(7)	O(1A)-S(1)-O(4A)	108.6(4)	N(1)-C(1)-C(2)-O(2)	62.4(6)
S(1)-O(2A)	1.470(8)	O(3A)-S(1)-O(2A)	112.9(7)	C(6)-C(1)-C(2)-O(2)	-175.4(4)
C(1)-N(1)	1.451(7)	O(1A)-S(1)-O(2A)	107.6(5)	N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-176.6(4)
C(1)-C(6)	1.526(8)	O(4A)-S(1)-O(2A)	105.2(5)	C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	-54.4(5)
C(1)-C(2)	1.542(8)	N(1)-C(1)-C(6)	109.0(5)	O(2)-C(2)-C(3)-N(3)	-61.3(6)
N(1)-C(7)	1.337(7)	N(1)-C(1)-C(2)	111.0(5)	C(1)-C(2)-C(3)-N(3)	-179.3(4)
C(2)-O(2)	1.402(6)	C(6)-C(1)-C(2)	112.2(4)	O(2)-C(2)-C(3)-C(4)	177.6(4)
C(2)-C(3)	1.537(7)	C(7)-N(1)-C(1)	124.9(5)	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	59.6(5)
C(3)-N(3)	1.451(7)	O(2)-C(2)-C(3)	111.7(4)	C(4)-C(3)-N(3)-C(9)	-142.9(6)
C(3)-C(4)	1.521(7)	O(2)-C(2)-C(1)	106.7(4)	C(2)-C(3)-N(3)-C(9)	95.5(6)
N(3)-C(9)	1.323(7)	C(3)-C(2)-C(1)	109.5(4)	N(3)-C(3)-C(4)-O(4)	57.4(6)
C(4)-O(4)	1.430(7)	N(3)-C(3)-C(4)	109.7(4)	C(2)-C(3)-C(4)-O(4)	178.7(4)
C(4)-C(5)	1.539(7)	N(3)-C(3)-C(2)	109.9(4)	N(3)-C(3)-C(4)-C(5)	177.2(4)
C(5)-O(5)	1.414(7)	C(4)-C(3)-C(2)	110.4(4)	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-61.5(5)
C(5)-C(6)	1.525(8)	C(9)-N(3)-C(3)	124.5(5)	O(4)-C(4)-C(5)-O(5)	-62.2(5)
C(6)-O(6)	1.411(7)	O(4)-C(4)-C(3)	108.4(4)	C(3)-C(4)-C(5)-O(5)	179.1(4)
C(7)-N(7)	1.302(8)	O(4)-C(4)-C(5)	110.1(5)	O(4)-C(4)-C(5)-C(6)	177.1(4)
C(7)-N(8)	1.343(8)	C(3)-C(4)-C(5)	108.8(4)	C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	58.4(6)
C(9)-N(9)	1.322(8)	O(5)-C(5)-C(6)	109.1(4)	O(5)-C(5)-C(6)-O(6)	59.7(6)
C(9)-N(10)	1.331(8)	O(5)-C(5)-C(4)	109.3(5)	C(4)-C(5)-C(6)-O(6)	-179.5(4)
		C(6)-C(5)-C(4)	111.4(4)	O(5)-C(5)-C(6)-C(1)	-174.8(4)
		O(6)-C(6)-C(5)	110.9(5)	C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	-54.0(6)
		O(6)-C(6)-C(1)	111.8(5)	N(1)-C(1)-C(6)-O(6)	-59.5(6)
		C(5)-C(6)-C(1)	111.8(4)	C(2)-C(1)-C(6)-O(6)	177.2(4)
		N(7)-C(7)-N(1)	122.8(6)	N(1)-C(1)-C(6)-C(5)	175.4(4)
		N(7)-C(7)-N(8)	119.6(6)	C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	52.1(6)
		N(1)-C(7)-N(8)	117.5(5)	C(1)-N(1)-C(7)-N(7)	-1.4(10)
		N(9)-C(9)-N(3)	119.6(6)	C(1)-N(1)-C(7)-N(8)	179.5(5)
		N(9)-C(9)-N(10)	118.7(5)	C(3)-N(3)-C(9)-N(9)	178.1(6)
		N(3)-C(9)-N(10)	121.7(5)	C(3)-N(3)-C(9)-N(10)	-1.4(9)

Tabla A4. Puentes de hidrógeno con $H...A < r(\text{Å}) + 2.000 \text{ Å}$ y ángulo $DHA > 110^\circ$.

D-H	d(D-H)	d(H..A)	<DHA	d(D..A)	A
O1B-H1B	0.832	1.968	166.42	2.783	O1A [-x+y-1, -x+2, z-1/3]
O1B-H1C	0.706	2.159	152.61	2.805	O2 [-y+3, x-y+4, z+1/3]
N1-H1	0.900	2.498	142.57	3.259	O4A [-x+y-2, -x+2, z-1/3]
N1-H1	0.900	2.614	163.24	3.485	O2A [-x+y-2, -x+2, z-1/3]
N1-H1	0.900	2.898	162.72	3.766	S1 [-x+y-2, -x+2, z-1/3]
O2-H2	0.826	2.062	149.36	2.805	O1B [-x+y-1, -x+3, z-1/3]
N3-H3	0.774	2.215	163.31	2.965	O4A [-y+2, x-y+4, z-2/3]
N3-H3	0.774	3.017	142.97	3.665	S1 [-y+2, x-y+4, z-2/3]
O4-H4	0.799	1.995	170.07	2.785	O1B [-y+2, x-y+3, z-2/3]
O5-H5	1.002	2.223	156.30	3.167	O2A [-y+3, x-y+4, z-2/3]
O5-H5	1.002	2.601	115.19	3.161	O1B [-y+2, x-y+3, z-2/3]
O5-H5	1.002	2.847	126.82	3.540	S1 [-y+3, x-y+4, z-2/3]
O6-H6	0.651	2.365	139.70	2.892	O4 [-y+3, x-y+4, z+1/3]
N8-H8A	0.819	2.129	174.18	2.945	O4A
N8-H8A	0.819	2.990	149.03	3.717	S1
N8-H8B	0.894	2.134	163.67	3.003	O1A [-x+y-2, -x+2, z-1/3]
N8-H8B	0.894	2.946	168.02	3.825	S1 [-x+y-2, -x+2, z-1/3]
N7-H7	1.018	2.358	160.38	3.334	O3A [-x+y-1, -x+3, z-1/3]
N10-H10A	0.887	2.036	167.49	2.908	O6 [x, y+1, z]
N10-H10B	0.776	2.629	171.24	3.398	O3A [-x+y-1, -x+3, z-1/3]
N9-H9	0.842	2.335	161.28	3.144	O3A [-y+2, x-y+4, z-2/3]
N9-H9	0.842	2.499	118.03	2.988	O2 [-x+y-2, -x+3, z-1/3]

D: átomo donador, A: átomo aceptor.

APENDICE II. METODOS QUIMICO-TEORICOS.

A.1. Análisis conformacional.

El análisis conformacional involucra la determinación de las características tridimensionales de una molécula. Existen fundamentalmente tres métodos para determinar la conformación de moléculas:

- i) La difracción de rayos-X, para el estado sólido; en donde la energía de empaquetamiento del cristal puede modificar la conformación.
- ii) Los cálculos mecano-cuánticos y empíricos, para sistemas aislados; en estado gaseoso.
- iii) La resonancia magnética nuclear, para el estado líquido o en solución; en el cual existen interacciones con el disolvente.

El análisis conformacional nos proporciona la estructura y estereoquímica de las moléculas, considerándose de importancia por el hecho de que muchas reacciones químicas y actividad farmacológica de ciertos compuestos dependen de la conformación.

Hoy en día, las aproximaciones teóricas más usadas en el estudio de aspectos tridimensionales de fármacos, son la mecánica molecular y la mecánica cuántica.

A.2. Mecánica molecular.

La mecánica molecular¹ considera a una molécula como un conjunto de átomos unidos por fuerzas elásticas, las cuales se describen mediante funciones clásicas de energía potencial, comprendiendo principalmente: alargamiento y flexión de longitudes de enlace y ángulos de valencia interacciones de no enlace y electrostáticas y torsión a través de enlaces; siendo muy usado en aquellos casos en los que solamente se requiere saber cuales conformaciones energéticamente preferidas.

Este método, conocido también como de campo de fuerza (*force field*), considera a la molécula desde el punto de vista clásico, es decir, se considera que los átomos están unidos por resortes mutuamente independientes.

A.3. Mecánica cuántica.

Los métodos de mecánica cuántica² se dividen en métodos a primeros principios (*ab initio*) y métodos semiempíricos. Los métodos *ab initio* tratan de resolver la ecuación de Schrödinger ($H\Psi=E\Psi$), empleando el operador Hamiltoniano completo (de energía potencial y cinética), siendo necesario indicar el orbital atómico empleado. Por otro lado, los métodos semiempíricos emplean aproximaciones para la obtención de valores de energía, haciendo uso tan solo de los orbitales atómicos de valencia, considerando que los orbitales atómicos internos no intervienen en la combinación. La gran diferencia entre estos dos métodos es el tiempo de computo, el cual es mucho mayor para los métodos *ab initio* que para los semiempíricos, siendo evidentemente más rápidos los semiempíricos (10 a 100 veces).

Actualmente existen gran cantidad de semiempíricos³, pero es difícil decidir cual es el mejor, pues eso depende del sistema a estudiar y la información que se quiera obtener.

Los cálculos de mecánica cuántica (tanto métodos ab initio como semiempíricos), no solo proporcionan las conformaciones preferidas, sino también la distribución de cargas, y propiedades fisicoquímicas tales como calor de formación, momento dipolar eléctrico, potencial de ionización y afinidad electrónica; que se pueden obtener a costa de un mayor consumo de recursos computacionales a partir de funciones de onda.

A.3.1 Calor de formación.

El calor de formación está definido como el cambio de entalpía para la reacción en la que un mol de un compuesto determinado se produce a partir de sus elementos en sus formas más estables. Los calores de formación estándar, ΔH_f° , se obtienen en algunos casos de manera directa por medición en un calorímetro pero, en la mayoría de las veces, se determina indirectamente usando calores de combustión junto con la ley de Lavoisier-Laplace y la de Hess.

Los compuestos para los cuales ΔH_f° es negativo son, en general, más estables con respecto a sus elementos, por que se libera energía en su formación. Por otra parte, un valor positivo de ΔH_f° indica que el compuesto solamente puede formarse a partir de sus elementos sólo cuando se le proporciona energía al sistema reaccionante; siendo estos compuestos menos estables que los elementos puros.

Por el método semiempírico empleado ⁴, el ΔH_f° de una molécula se obtiene restando a la energía total, $E_{\text{tot}}^{\text{mol}}$, las energías electrónicas de cada átomo, y adicionando los calores de formación experimentales de los átomos en la molécula, ΔH_f° :

$$\Delta H_f^{\text{mol}} = E_{\text{tot}}^{\text{mol}} - \sum_A E_{\text{el}}^A + \sum_A \Delta H_f^A$$

La energía total, $E_{\text{tot}}^{\text{mol}}$, de una molécula es la suma de la energía electrónica, E_{el} , y las repulsiones entre los cores de los átomos A y B, E_{AB}^{core} :

$$E_{\text{tot}}^{\text{mol}} = E_{\text{el}} + \sum_{A < B} \sum E_{AB}^{\text{core}}$$

A.3.2. Momento dipolar eléctrico.

La distribución de carga eléctrica en una molécula se encuentra estrechamente relacionada con un gran número de propiedades o fenómenos observables, tal como el momento dipolar eléctrico (μ_e) ⁵.

En general, las medidas de μ_e no se usan para obtener longitudes de enlace, ni para conocer con exactitud la separación de cargas. Sin embargo, el conocimiento de los momentos dipolares de un compuesto resulta muy útil para determinar la conformación molecular e informar acerca de la posición atómica relativa en el espacio, de una especie, es decir, de su geometría.

La expresión clásica² que se usa para el μ_e de un conjunto de cargas discretas es:

$$\mu_e = \sum_e q_e r_e$$

donde r_e , es el vector de posición a partir del origen hasta la carga e ; y q_e , la densidad electrónica total en cada átomo, que resulta de la suma de las contribuciones de cada orbital atómico a cada orbital molecular:

$$q_e = \sum_i n_i C_{ie}^2$$

siendo C_{ie} , el coeficiente del orbital atómico ϕ_i , ocupado por n_e electrones. C_{ie}^2 tiene el significado físico de ser la probabilidad de encontrar un electrón en la región del espacio asociada con el orbital atómico ϕ_i . La suma es tomada sobre todos los orbitales moleculares.

A.3.3. Potencial de ionización.

El potencial de ionización (PI) se define como la energía necesaria para eliminar un electrón de una molécula en fase gaseosa. ($R \rightarrow R^+ + e^-$, $\Delta H = PI$).

Por lo tanto, el primer potencial de ionización se refiere al electrón menos unido a la molécula. Desde el punto de vista teórico, los potenciales de ionización corresponden, de manera aproximada, a la energía del orbital molecular más alto ocupado (HOMO) del sistema. T. C. Koopmans⁶ probó que la energía necesaria para sustraer un electrón de un orbital, en un átomo o molécula con capa cerrada, tiene un valor aproximado al negativo de la energía de Hartree-Fock, ϵ_i , del orbital. Ya que esa cantidad es, en general, negativa; el PI (comúnmente llamado PI vertical) es un número positivo que puede aproximarse al PI observado. Por consiguiente, la energía de ionización molecular ó PI, puede estimarse tomando la $-\epsilon_i$ del HOMO. Cuando se quiere encontrar el PI, se hace el cálculo con una geometría fija, idéntica a la de la molécula en su estado neutro.

Al aplicar este teorema, suponemos que los orbitales del ion son idénticos a los del sistema de capa cerrada, esto es una aproximación; no obstante, el teorema de Koopmans se cumple en muchos casos con sorprendente precisión. Ahora bien, aunque no se entiende completamente la razón de esto, se afirma que el cambio de energía producido por la distorsión de los orbitales del ion, es compensado, por un cambio de energía de correlación⁷. Así, aunque es erróneo suponer invariante el comportamiento orbital en los estados basal y ionizado, tal suposición funciona bien.

Por otro lado, los PI calculados deben compararse con los valores experimentales obtenidos con la técnica denominada de impacto electrónico, la cual implica el bombardeo del compuesto en cuestión con electrones de diferente energía. En esta técnica, el tiempo es extremadamente corto, por lo que si la ionización ocurre durante este período, el ion permanece con la misma configuración geométrica que la molécula original⁸. A este tipo de ionización se le llama "vertical".

A.3.4. Orbitales moleculares Frontera.

La teoría de orbitales moleculares frontera (FMO) ha sido incorporada en los últimos años en la discusión de la reactividad química⁹. Los términos HOMO (*highest occupied molecular orbital*) y LUMO (*lowest occupied molecular orbital*) han sido utilizados para estos propósitos¹⁰.

Además de considerar al PI como la $-E_{\text{HOMO}}$ y a la afinidad electrónica como la $-E_{\text{LUMO}}$, las energías del HOMO y LUMO son índices útiles de interés químico y farmacológico, pues estos miden respectivamente la capacidad de donar o aceptar electrones por parte de la molécula. Un valor grande del HOMO indicaría una alta tendencia a donar electrones, así como uno pequeño de LUMO denotaría una menor resistencia a aceptar electrones.

Por consiguiente, los átomos cuyos coeficientes de los orbitales atómicos contribuyen más al HOMO, se sitúan como el centro nucleofílico de la estructura. En el caso del LUMO, los átomos que contribuyen más a éste, se consideran como el centro electrofílico del compuesto correspondiente.

Siguiendo con este criterio, los FMO son los que contienen la mayor información de un sistema¹¹. Sin embargo, los orbitales moleculares internos (HOMO-n) y los externos (LUMO+m) a los frontera, también deben contener información de la reactividad química de las moléculas y deben manifestarse de alguna manera cuando se lleva a cabo una reacción.

Este tipo de parámetros son importantes, puesto que en un instante dado la molécula de fármaco podría interactuar con el sitio receptor a través de enlaces iónicos, dipolo-ión o dipolo-dipolo, en los cuales la capacidad donadora ó aceptora de electrones resulta significativa¹². De tal manera, por ejemplo, se han encontrado relaciones lineales entre la potencia analgésica y la energía del HOMO¹³.

Bibliografía del apéndice .

- 1.- i) Allinger, N.L., Tribble, M.T., Miller, M.A. & Wertz, D.H., **Conformational analysis. LXIX. An improved force field for the calculations of the structures and energies of hydrocarbons**, *Journal of the American Chemical Society*, **93**, 1637-1648 (1971).
 ii) Boyd, D.B. & Lipkowitz, K.B., **Molecular Mechanics. The method and its underlying philosophy**, *Journal of Chemical Education*, **59**, 269-274 (1982).
- 2.- Levine, N.I., **Quantum Chemistry**, 4th edition, Prentice Hall, U.S.A. (1991), 397-402.
- 3.- Thiel, W., **Semiempirical methods: current status and perspectives**, *Tetrahedron*, **44**, 7393 (1988).
- 4.- Dewar, M.J.S. & Thiel, W., **Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters**, *Journal of the American Chemical Society*, **99**, 4899-4906 (1977).
- 5.- Nanda, D.N. & Jug, K., *Teor. Chim. Acta*, **57**, 95 (1980).
- 6.- Koopmans, T., *Physica*, **1**, 104 (1933).
- 7.- Fujita, T., Iwasa, J. & Hansh, C., **A new substituent constant, π , derived from partition coefficients**, *Journal of the American Chemical Society*, **86**, 5175 (1964).
- 8.- Bucourt, R., **Torsion angle concept in conformational analysis**, *Topics in stereochemistry*, **8**, 159-224 (1974).
- 9.- Mendizabal, F. & Contreras, R.R., *Int. J. Quantum Chem. Soc.*, **26**, 751 (1992).
- 10.- i) Rioseras-García, M.J. & Hernando-Huelmo, J.M., **Theoretical study by AM1 of the metacyclophanes anti-[2]metacyclo[2](1,3)naphthalenophane-1,11-diene, dihydropyrene and benzo[a]pyrene**, *Journal of Molecular Structure*, **262**, 147 (1992).
 ii) Alavosus, T.J. & Sweigart, D.A., **Comparative study of nucleophilic addition to free and metal-coordinated carbocations**, *Journal of the American Chemical Society*, **107**, 985-987 (1985).
- 11.- Fukui, K., Yonezawa, T. & Shingu, H., **A molecular-orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons**, *J. Chem. Phys.*, **20**, 722-725 (1952).
- 12.- Goldstein, A., Aronow, L. & Ralman, S.M., **Principles of Drug Action: The basis of pharmacology**, Wiley Int. Ed., (1974), Cap.1.
- 13.- Razzak, K.S. & Hamid, K.A., **Electronic study of receptor binding of analgesic aryl moiety II: Prodrine analogs**, *Journal of Pharmaceutic Science*, **69**, 796-799, (1980).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Anexo I. Constantes de disociación ácida, pKa.

De acuerdo al trabajo realizado por Agrawal *et. al.* ¹ (mencionado en la sección 1.5 de éste trabajo), se procedió a determinar los pKa's de las sales de estreptomina, encontrándose que para el sulfato y el cloruro de estreptomina el pKa es de 8 (igual al informado para perclorato de estreptomina). Empleando la misma metodología se procedió a la medición de los pKa's de las sales de estreptidina, sin embargo, no fue posible calcularlos de acuerdo al procedimiento informado dada la alta basicidad de los grupos guanidinos ², como comparación se muestran los siguientes valores:

Aminoglucósidos

Compuesto	pKa (25°C)
Estreptomina	8.0
Gentamicina	8.2
Kanamicina	7.2

Compuestos con grupos guanidinos

Compuesto	pKa (25°C)
Guanidina	13.6
N-metil guanidina	13.6
Arginina	12.5
Diguanidina	11.5

La estreptomina es estable entre pH 4 y 7, fuera de este intervalo se hidroliza por los enlaces glucosídicos, por consiguiente la diferencia entre el pKa de la estreptomina y el pKa de un grupo guanidino, permite decir que es factible la hidrólisis de la estreptomina antes que la desprotonación de los grupos guanidinos.

Bibliografía del anexo I .

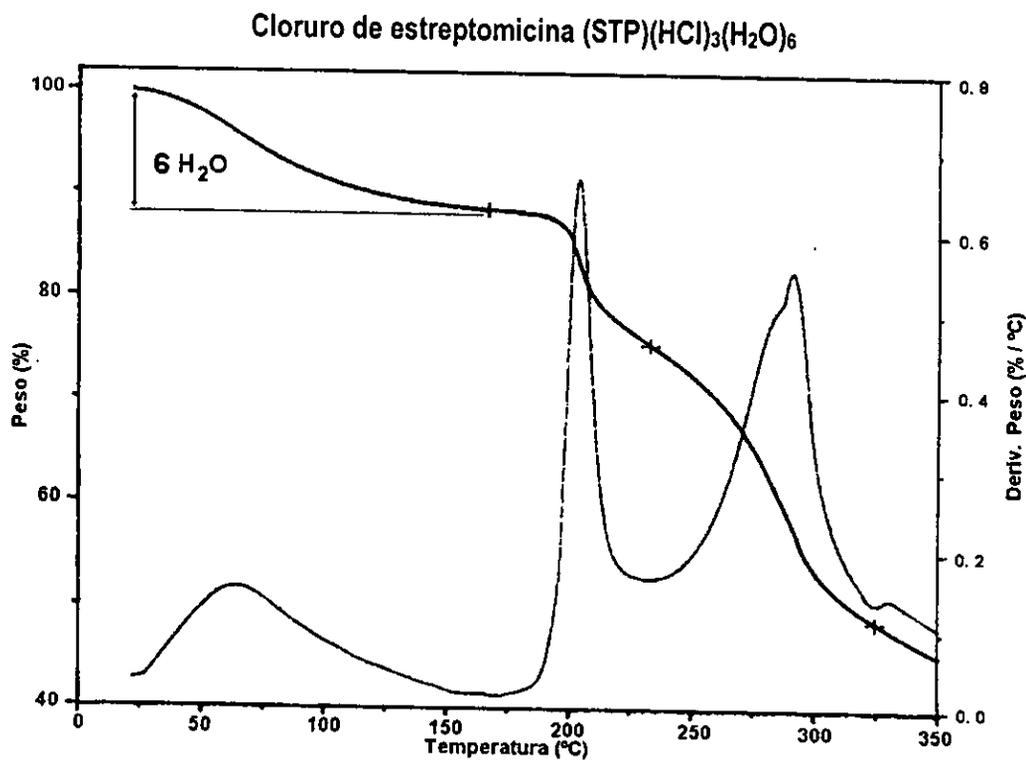
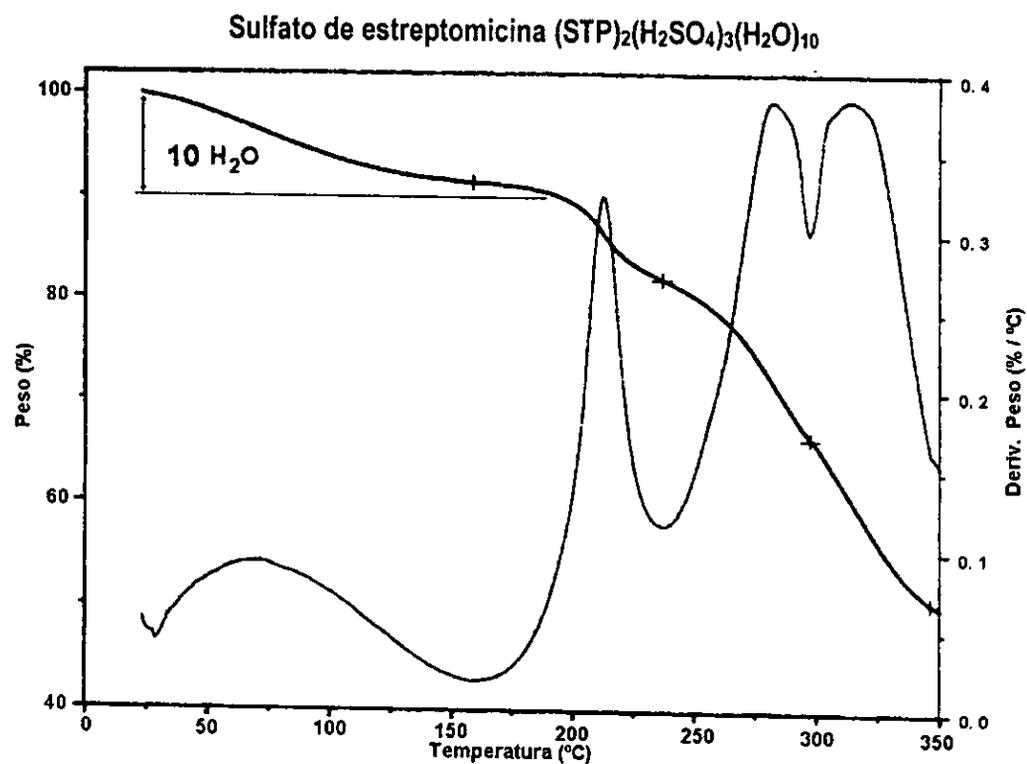
1.- i) Agrawal, J.K. & Vijayavargiya, R. **Acid dissociation constant of streptomycin perchlorate and the stability constant of its complex with copper (II)**, *Journal of the Indian Chemical Society*, **52**, 190-162 (1975).

ii) Agrawal, J.K. & Vijayavargiya, R. **Composition and stability of streptomycin complexes with nickel(II) and cobalt (II)**, *Journal of the Indian Chemical Society*, **52**, 576-578 (1975).

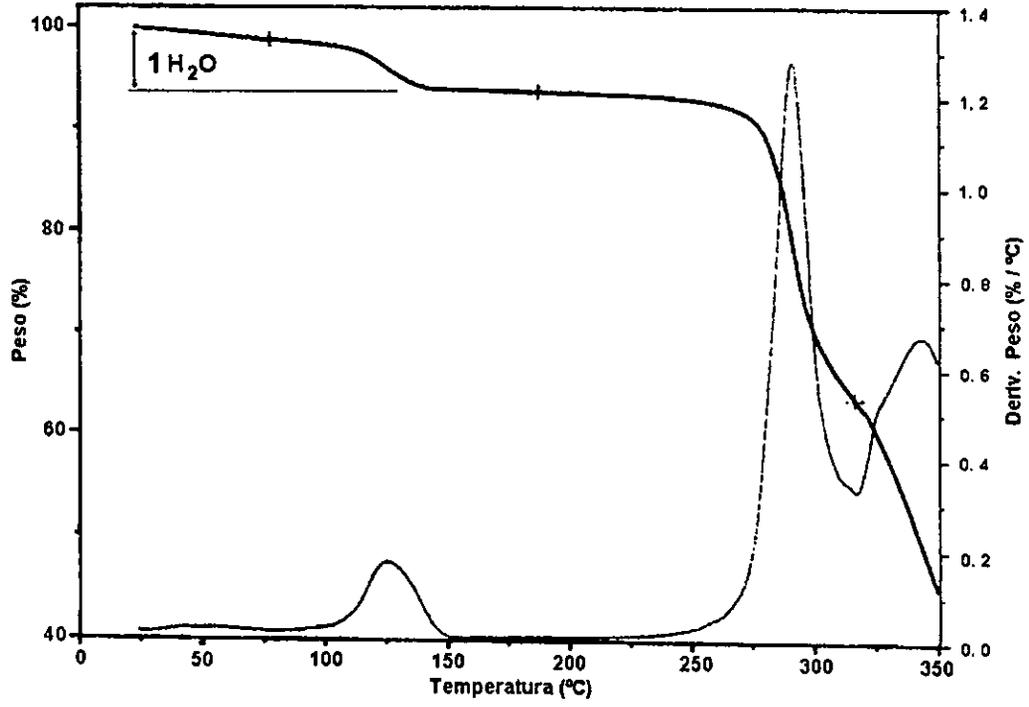
2.- i) Albert A. & Serjeant E.P, *The determination of ionization constants. A laboratory manual*. 3rd Edition, University Press, Great Britain (1984).

ii) Martell A.E. & Smith R.M., *Critical stability constants*, Vol.1 Amino acids & Vol. 3, Others organic ligands, Plenum Press, New York & London (1997).

Anexo II. Análisis termogravimétrico (TGA).



Sulfato de estreptidina (STD)(H₂SO₄)(H₂O)



DEDICATORIAS

A mis padres, Rosa Ma. Terán G. y Jacobo Toxqui T., por su apoyo y sacrificios, por ser un ejemplo de honestidad y responsabilidad, y por su cariño incondicional.

A mis hermanos, Alejandra Patricia, Jacobo, Elizabeth y Citlalli Nelli, por su cálida compañía y por compartir, no tan solo un espacio, sino todo una vida de gratos momentos.

A mis tías, tíos, primos y sobrinos, a esa gran familia que siempre llevaré en mis recuerdos.

A Sandra G.P.G. con mucho cariño, por todos los momentos buenos que hemos compartido, por su apoyo en los momentos difíciles durante la maestría, y por llenar de alegría mis pensamientos.

A la familia Padilla-García por recibirme como un miembro más de su familia y favorecerme con su aprecio.

A todos mis compañeros del laboratorio 211, y a aquellos "vecinos" de los laboratorios 210, 212, 213, 214, 215 y 216, por las atenciones que tuvieron para conmigo durante este tiempo en la D.E.Pg.

A Paty Fierro R. por la ayuda y tiempo dedicado a los estudiantes del laboratorio.

A mis compañeros y profesores de las escuelas a las que he asistido, pues forman parte esencial de mi persona.