

00582
8
2E



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD QUIMICA DE LAS
"QUINOLONAS" CON METALES DIVALENTES Y
BIOMOLECULAS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA FARMACEUTICA)**
P R E S E N T A :
M. en C. TERESA HERNANDEZ QUIROZ



MEXICO, D F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

271019



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:	Roberto Arreguín Espinosa
Primer Vocal:	Dra. Rachel Mata Essayag
Segundo Vocal:	Dr. Edgardo Escamilla Marván
Tercer Vocal:	Dra. Noráh Barba Behrens
Secretario:	Dra. Adela Rodríguez Romero
Primer Suplente	Dr. Raymundo Cruz Almanza
Segundo Suplente	Dr. Rogelio Pereda Miranda

Sustentante

M. en C. Teresa Hernández Quiroz

Asesor

Dr. Manuel Soriano García

Sitios de realización de la Tesis

El presente trabajo de tesis se desarrollo en :

Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM.

Laboratorio de Rayos X del Instituto de Química de la UNAM.

Departamento de Microbiología de la Facultad de Química de la UNAM.

Departamento de Microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios de doctorado (No. de registro 46575).

A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama, a la QFB Beatriz Luna Millán y a la M. en C. Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Química de la UNAM, por su valiosa asesoría, apoyo en reactivos y todas las facilidades brindadas para la realización de todas las pruebas microbiológicas.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, Investigador del Departamento de Microscopía de la Facultad de Ciencias, por su asesoría, reactivos, equipo y las facilidades brindadas para la observación de las células al microscopio electrónico.

Al Dr. Barbarín Arreguín, por su apoyo en reactivos y equipo para la realización de las pruebas bioquímicas, y sobre todo por su apoyo moral.

Al M. en C. Simón Hernández Ortega, por la captura de datos y solución de las estructuras, por su gran ayuda y amistad.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa y a la M. en C. Alejandra Hernández Santoyo, por su asesoría y valiosos comentarios en la realización de las pruebas bioquímicas. En particular por su gran apoyo moral y amistad.

Agradezco a los miembros del jurado designado para la revisión de la presente disertación por su diligente colaboración durante el proceso de revisión.

En particular agradezco a la Dra. Rachel Mata de Espíndola y al Dr. Rogelio Pereda por sus valiosos comentarios que permitieron mejorar notablemente la versión final de la tesis.

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. ANTECEDENTES	5
1.1 QUINOLONAS	5
1.1.1 Mecanismo de acción	8
1.1.2 Toxicidad	15
1.1.3 Estudios de la reactividad química de las quinolonas con metales	15
1.2 IMPORTANCIA DE LA PARED CELULAR BACTERIANA	17
1.3 CARBONIPEPTIDASA A. FOSFATASA ALCALINA Y HEMOGLOBINA	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GENERAL:	24
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:.....	24
4. METAS.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 CRISTALIZACIÓN	26
a) <i>Cristalización de las quinolonas como ácidos carboxílicos</i>	26
b) <i>Co-cristalización de quinolona-nucleósido y quinolona-nucleótido</i>	27
c) <i>Preparación y cristalización de los complejos quinolona-metal</i>	28
5.2 DETERMINACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X	30
5.3 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.....	30
a) <i>Activación de la cepa y estandarización del inoculo</i>	31
b) <i>Desarrollo de biomasa en fase estacionaria (biomasa estándar)</i>	31
c) <i>Determinación de la concentración bactericida (CB) de las quinolonas</i>	32
d) <i>Sensibilización de la biomasa con quinolonas</i>	33
e) <i>Ruptura bacteriana</i>	34
5.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	35
a) <i>Aislamiento y cuantificación de Proteínas</i>	36
b) <i>Aislamiento y cuantificación de DNA</i>	38
c) <i>Pruebas de actividad e inhibición enzimática</i>	40
5.5 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA EL ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL	43
6. RESULTADOS.....	45
6.1 CRISTALIZACIÓN DE LAS QUINOLONAS COMO ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	45
6.2 DETERMINACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE LAS QUINOLONAS COMO ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	46
6.3 COCRISTALIZACIÓN DE QUINOLONA-NUCLÉOSIDO Y QUINOLONA-NUCLÉOTIDO	52
6.4 COMPLEJOS QUINOLONA-METAL	53
6.5 DETERMINACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN EL ESTADO SÓLIDO CRISTALINO DE LOS COMPLEJOS QUINOLONA-METAL	55
a) <i>Nalidixato de calcio</i> :	55
b) <i>Norfloxacinato de manganeso</i>	60
6.6 DETERMINACIÓN DE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS CON BACTERIAS Y BIOMOLÉCULAS	62
a) <i>Sensibilidad de las bacterias a las quinolonas</i>	62
b) <i>Comprobación de las lesiones de la pared celular mediante microscopía electrónica</i>	65

<i>c) Comprobación de la sensibilización de la pared celular mediante la cuantificación de proteínas y DNA</i>	69
<i>d) Determinación de la capacidad inhibitoria de las quinolonas sobre la actividad de proteínas dependientes de metales y diferentes a las topoisomerasas</i>	72
7. DISCUSIÓN	75
8. CONCLUSIONES	85
9. PERSPECTIVAS GENERALES DE ESTUDIO	87
10. APÉNDICE	88
11. BIBLIOGRAFÍA	101

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los antimicrobianos por su estructura química (García-Rodríguez, 1987).....	6
Tabla 2. Características farmacocinéticas generales de las quinolonas.....	8
Tabla 3. Efectos secundarios de las quinolonas.....	15
Tabla 4. Concentraciones aplicadas para determinar la concentración bactericida de cada quinolona sobre la biomasa estándar.....	33
Tabla 5. Concentración bactericida (CB) de las quinolonas.....	34
Tabla 6. Solubilidades de las seis quinolonas a 25 °C. en mg/ml.....	45
Tabla 7. Características físicas de cuatro cristales de quinolonas.....	46
Tabla 8. Ángulos dihedros (°) calculados entre los diferentes planos de las moléculas de la rosoxacina.....	49
Tabla 9. Algunos ángulos de torsión (°) de la rosoxacina.....	49
Tabla 10. Ángulos dihedros (°) calculado entre los diferentes planos de la molécula del ácido piromídico.....	51
Tabla 11. Condiciones en las que se obtuvieron cristales por medio de gota colgante.....	53
Tabla 12. Ángulos dihedros (°) calculado entre los diferentes planos de la molécula de (NAL) ₂ Ca ²⁺	58
Tabla 13. Algunos ángulos de torsión (°) del (NAL) ₂ Ca ²⁺	58
Tabla 14. Concentración bactericida de las quinolonas sobre <i>E. coli</i> 10536.....	62
Tabla 15. Efecto de las quinolonas y del EDTA sobre la viabilidad de la biomasa.....	63
Tabla 16. Proteínas aisladas de biomasa de <i>E. coli</i> 10536 tratadas con quinolonas.....	69
Tabla 17. Concentraciones aplicadas de los antibióticos a la biomasa de <i>E. coli</i> 10536.....	70
Tabla 18. DNA aislado de la biomasa de <i>E. coli</i> 10536 tratadas con quinolonas.....	71
Tabla 19. Concentraciones aplicadas de los antibióticos a la biomasa de <i>E. coli</i> 10536.....	72
Tabla 20. Efecto inhibidor de las quinolonas sobre la actividad enzimática de la Carboxipeptidasa A ¹	73
Tabla 21. Efecto inhibidor de las quinolonas sobre la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina ¹	73
Tabla 22. Efecto inhibidor de las quinolonas sobre la actividad peroxidasa de la hemoglobina.....	74
Tabla 23. Comparación de la MIC con la CB sobre inóculos diferentes (µg/ml).....	78
Tabla 1A. Datos de los cristales y experimentales de los ácidos carboxílicos de quinolona (ROS, PIR) resueltas en este trabajo y las descritas en la literatura (NAL, NOR) ^{1,2}	88
Tabla 2A. Coordenadas atómicas (x10 ⁴) y factores de temperatura isotrópico equivalente (x10 ³)(Å ²) ^a de la rosoxacina.....	89
Tabla 3A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace de rosoxacina.....	90
Tabla 4A. Puentes de hidrógeno e interacciones intermoleculares C-H...O menores de 3.4 Å en la rosoxacina.....	91
Tabla 5A. Coordenadas atómicas y factores de temperatura isotrópico equivalente (x10 ³)(Å ²) ^a del ácido piromídico.....	92
Tabla 6A. Puentes de hidrógeno e interacciones intermoleculares C-H...O y C-H...N menores de 3.4 Å en el ácido piromídico.....	93
Tabla 7A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace del ácido piromídico.....	93
Tabla 8A. Datos del cristal y experimentales del complejo (NAL) ₂ Ca ²⁺	94
Tabla 9A. Coordenadas atómicas (x 10 ⁴) y factores de temperatura isotrópico equivalente (x10 ³)(Å ²) ^a del nalidixato de calcio.....	95
Tabla 10A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace del nalidixato de calcio.....	96
Tabla 11A. Puentes de hidrógeno y principales interacciones intramoleculares C-H...O y C-H...N menores de 3.4 Å del (NAL) ₂ Ca ²⁺	97
Tabla 11B. Puentes de hidrógeno y principales interacciones intermoleculares C-H...O y C-H...N menores de 3.4 Å del (NAL) ₂ Ca ²⁺	97
Tabla 12A. Datos del cristal y experimentales del complejo (NOR) ₂ Mn ²⁺	98
Tabla 13A. Coordenadas atómicas y factores de temperatura isotrópico equivalente (x10 ³)(Å ²) ^a para (NORF) ₂ Mn ²⁺	99
Tabla 14A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace para (NORF) ₂ Mn ²⁺	100

Abreviaturas

NAL	ácido nalidíxico
PIR	ácido piromídico
ROS	rosoxacina
NOR	norfloxacina
CIP	ciprofloxacina
OFLO	ofloxacina
ENO	enoxacina
LOM	lomefloxacina
OXO	ácido oxolínico
CNX	cinoxacina
PIP	ácido pipemídico
PEF	pefloxacina
FLE	fleroxacina
AMI	amifloxacina
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	resonancia magnética de carbono 13
RMN ³¹ P	resonancia magnética de fósforo 31
FT-IR	infrarojo-transformada de Fourier
UV-VIS	ultravioleta-visible
EPR	resonancia paramagnética del electrón
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
PEG 6K	polietilen glicol 6000
M ²⁺	metal divalente
M ³⁺	metal trivalente
CTAB	bromuro del cetil trimetil amonio
TS	tripticosa soya
CB	concentración bactericida
UK	unidades Kleet
%I	por ciento de inhibición
rpm	revoluciones por minuto
RNasa	ribonucleasa A
DNA	ácido desoxiribonucleico
TGTG	timina-guanosina-timina-guanosina
HLEPA	hipuril-L-fenilalanina
CFU/ml	unidades formadoras de colonias/ml

Resumen

En la presente investigación, se realizó un estudio estructural y de la reactividad química de un grupo de seis quinolonas: el ácido nalidíxico (NAL), el ácido piromídico (PIR), la rosoxacina (ROS), la norfloxacin (NOR), la ciprofloxacina (CIP) y la ofloxacina (OFLO) frente a cationes divalentes, nucleósidos, nucleótidos, biomoléculas y células de *E. coli*. Para demostrar la capacidad quelante de las quinolonas, se emplearon diferentes técnicas, tales como la cristalización, difracción de rayos X, estudios microbiológicos, bioquímicos y de microscopía electrónica.

Se describen dos estructuras cristalinas de este tipo de antibióticos, ROS y PIR. Sus longitudes de enlace, ángulos de enlace, la conformación de sus sustituyentes etilo y carboxílico y del núcleo principal, no difieren de las quinolonas descritas en la literatura.

Se observó, que el comportamiento ácido-base de estas moléculas impidió su co-cristalización con nucleósidos y nucleótidos en un medio acuoso, pero favoreció la formación de complejos metálicos con cationes tales como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} . La reacción de complejación fue rápida y sencilla y no requirió de técnicas, ni de reactivos complejos.

Se aporta información estructural novedosa de dos complejos quinolona-metal, por medio de la elucidación de las estructuras cristalinas de los complejos de nalidixato de calcio y norfloxacinato de manganeso. Con los datos de difracción de rayos X, se da a conocer la estequiometría de reacción con estos dos metales, la geometría de unión y la estereoquímica de los sustituyentes, así como del núcleo base. Comprobándose además, la falta de participación de los átomos de nitrógeno de estas moléculas en la quelación de estos cationes.

Considerando que las quinolonas son reactivas hacia los cationes divalentes, se investigó su reactividad química sobre los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} que estabilizan la pared celular de la *E. coli*, que es un componente funcional y estructural de vital importancia para las bacterias. Por

medio del microscopio electrónico diferencial se observó que las quinolonas produjeron rupturas sobre la pared celular en diferente grado, algunas fueron comparables y otras de mayor intensidad a las producidas por el conocido agente quelante EDTA. Las lesiones se atribuyeron a la capacidad quelante de estos compuestos hacia los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} que estabilizan los lipopolisacáridos de esta importante estructura celular. Proposición que se basa en la información estructural de los primeros complejos quinolona- Ca^{2+} y quinolona- Mn^{2+} y en su capacidad inhibitoria sobre la actividad enzimática de dos metaloenzimas (carboxipeptidasa A y fosfatasa alcalina) que se describen en este trabajo, así como, en los estudios de complejos quinolona-metal descritos en la literatura. Las diferencias en la actividad bactericida de las quinolonas se debieron principalmente a sus propiedades fisicoquímicas que derivan de sus estructuras químicas. La influencia de la estructura de las quinolonas se apreció en las cantidades aisladas de dos importantes biomoléculas de las células de *E. coli*. tratadas con ellas, las proteínas y el DNA.

En la realización de los estudios *in vitro* fue necesario establecer las condiciones de cultivo para desarrollar biomasas en fase estacionaria, determinar la concentración bactericida (CB) de las quinolonas y del EDTA, tratar a las células con las CB de cada antibiótico y determinar la viabilidad de los cultivos antes y después de cada tratamiento.

Con la viabilidad de los cultivos tratados se obtuvieron curvas de los cursos temporales a las diferentes concentraciones aplicadas de cada tratamiento. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y la prueba de Dunnett's. Los resultados comprobaron que la actividad bactericida del EDTA y de las quinolonas se debió al compuesto de prueba y no a las condiciones experimentales, además, permitieron realizar una comparación de las seis quinolonas entre sí y con el EDTA. Observando que la actividad bactericida fue dependiente de la concentración.

Abstract

This work presents the structural and chemical reactivity studies of six quinolones (nalidixic acid, piromidic acid, rosoxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin) with divalent cations, nucleosides, nucleotides, biomolecules and *Escherichia coli* cells. To determine the chelant effect were employed crystallization, ray X diffraction, microbiological, biochemical and electronic microscopic methods.

Here I report the crystal structure of two quinolones, rosoxacin and piromidic acid. Their bond lengths, bond angles, conformation of ethyl and carboxylic groups and the conformation of principal nucleus do not show significant differences with other quinolones reported in the literature.

The acid-base reactivity of these antibiotics does not allow co-crystallized with nucleosides and nucleotides in aqueous medium, but this reactivity favours the complexation with cations such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} . The chemical reaction was easy, fast and do not required any sophisticated techniques or reagents.

The crystal structures of the complexes of calcium and manganese of nalidixic acid and norfloxacin contribute with new structural information in this research field. The structural data provides valuable information about the stoichiometry of the reaction with calcium and manganese ions, the mode of binding and geometry, the stereochemistry of the ligands for each one of the complexes.

Bearing in mind that quinolones are reactive to divalent cations, it was considered of interest to study the chemical reactivity of the compounds on the cell wall of gram-negative bacteria. The cell wall structure is vital and important by the cell. As we know, the cell wall is stabilized by divalent cations such as calcium and magnesium and vital importance to the microorganism. The quinolones are very reactive to metal ions, producing gaps on the cell wall

and similar effect are produced by EDTA. However some of quinolones cause severe damaged on the cell wall.

The viality data of the culture treated of *E. coli* allowed to determined the area under the curve (AUC), an analysis of variance of time course and Dunnett's tests that were used to compare several groups with a control. The results showed that bactericidal activity is due to themself and not by the experiment.

The sensitization of the bacterias into the stationary phase was different with each one of the quinolones, the data was correlated with the amount of isolated protein and DNA of the treated culture. The presence of some quinolones be increase the amount of these biomolecules in normal conditions.

The quinolones inhibited others enzymes which dependent on divalent cations and they are different from the topoisomerases (gyrase and topoisomerase IV) at low concentrations with respect to the EDTA concentration used.

1. Antecedentes

1.1 Quinolonas

Las quinolonas son antimicrobianos sintéticos que se originaron a partir del ácido 1-metil-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolino carboxílico (**Figura 1a**), obtenido en 1949 por oxidación de los alcaloides melicopina, melicopidina y melicopicina con ácido nítrico concentrado (Price, 1949). Su actividad antibacteriana fue descubierta por Barton *et al.*, (1961) y en 1962 Lesher *et al.*, obtuvieron la primera quinolona que se empleara en la terapia de infecciones del tracto urinario producidas por bacterias gram-negativas, el ácido nalidíxico (NAL). Este antibiótico se obtuvo como un subproducto de reacción a partir de un destilado de la síntesis de cloroquina en los laboratorios del Sterling-Winthrop Research Institute en los Estados Unidos (**Figura 1b**).

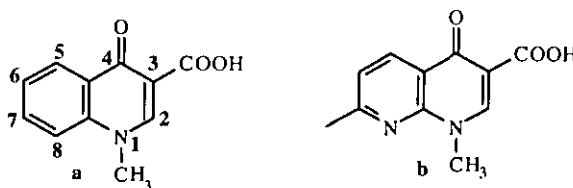


Figura 1. Primer núcleo de quinolona sintetizado (a) y el ácido nalidíxico (b)

En la literatura, se considera al ácido nalidíxico como el precursor de las quinolonas. Sin embargo, su empleo médico se ha disminuido debido a su perfil farmacocinético desfavorable, a su espectro de acción reducido y a la inducción de cristaluria (Swanson *et al.*, 1983, Thorsteinsson *et al.*, 1986). Para incrementar su actividad bactericida y disminuir o eliminar sus efectos secundarios, diversos grupos de investigación han realizado modificaciones estructurales sobre el núcleo de las quinolonas generando nuevos análogos como por ejemplo el ác. piromídico, rosoxacina, ác. oxolínico, cinoxacina, ác. pipemídico, norfloxacina,

enoxacina, ciprofloxacina, pefloxacina, lomefloxacina, fleroxacina, amifloxacina y ofloxacina entre otras.

Todos los análogos del ácido nalidíxico descritos hasta el momento son sintéticos y no se relacionan química o estructuralmente con los antimicrobianos tradicionales. Por tal motivo, se les considera como un grupo independiente dentro de la clasificación de los antibióticos, recibiendo el nombre genérico de QUINOLONAS (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de los antimicrobianos por su estructura química (García-Rodríguez, 1987).

Betalactámicos	Rifamicinas
Aminoglucósidos	Fosfomicinas
Tetraciclinas	Quinolonas
Polipéptidos	Polimixinas
Sulfamidas	Nitroimidazólicos
Cloranfenicol y derivados	Poliénicos
Macrólidos	Imidazólicos
Lincomicinas	Pirimidinas

En la literatura, se encuentran descritos diversos estudios estructurales, bioquímicos, microbiológicos y farmacológicos, cuyos resultados concluyen que los requerimientos estructurales necesarios para la actividad antimicrobiana de las quinolonas son un grupo COOH en la posición 3, un grupo C=O en la posición 4, un átomo de flúor en la posición 6, un heterociclo no aromático en la posición 7 (piperazinilo o pirrolidino) y un grupo alquilo no voluminoso en la posición 1 (un etilo o un ciclopropilo). Las quinolonas que presentan un átomo de flúor se les denomina en forma genérica como fluoroquinolonas.

Hasta el momento, se desconoce el sitio receptor exacto de estos antimicrobianos y por lo tanto, su forma de unión antibiótico-receptor para producir su efecto bactericida.

Es importante hacer notar que todas las quinolonas conservan el grupo carboxílico en la posición 3 y el grupo ceto de la posición 4, la sustitución o eliminación de los mismos producen una disminución significativa de la actividad bactericida *in vitro* y de su capacidad

inhibitoria sobre la enzima girasa (Georgopapadakou *et al.*, 1985; Choung *et al.*, 1988; Hubschwerlen *et al.*, 1992).

Algunas quinolonas presentan de uno a tres átomos de nitrógeno, localizados en las posiciones 1 y 8 ó 1,6 y 8 originando núcleos de naftiridona **b** y de piridopirimidona **c**, respectivamente (**Figura 2**). Actualmente, se desconoce la influencia química de estos átomos de nitrógeno y por lo tanto, no se ha determinado cual de los anillos mejora la actividad bactericida, pero se ha observado que los sustituyentes químicos en estos núcleos influyen directamente sobre su perfil farmacocinético, en su espectro de acción y potencia. La presencia de dos o tres nitrógenos en el núcleo base no ha impedido que a estos antibióticos se les llame en forma genérica también con el nombre de quinolonas.

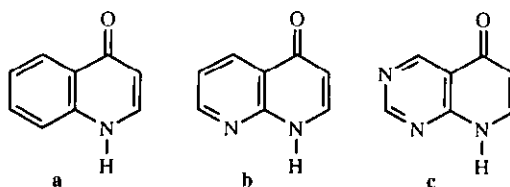


Figura 2. Núcleos observados en los antibióticos tipo quinolona

En un principio, las quinolonas se emplearon exclusivamente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, actualmente se aplican en la terapia de diferentes infecciones tales como: prostatitis bacteriana, gastroenteritis, osteomielitis, neumonías e infecciones producidas por enterobacteriaceas y estafilococos, debido a su eficacia como antibióticos y a su administración por vía oral en dosis únicas (Hooper *et al.*, 1985). Sus características farmacocinéticas (**Tabla 2**) y sus propiedades bactericidas han incrementado el interés de diferentes grupos de investigación de universidades y de la industria farmacéutica para continuar investigándolas. Además, se comercializan en Europa, Japón, Estados Unidos y México.

Tabla 2. Características farmacocinéticas generales de las quinolonas

Vía de administración:	Oral, intramuscular
Absorción:	Primera porción del Intestino delgado
Concentraciones séricas:	Variables
Dosis:	200 a 500 mg diarios/cada 12 h.
t_{1/2} :	3 a 12 horas
Vía de eliminación:	Vía renal
Difusión	Barrera hematoencefálica, meninges, Próstata, hueso, articulaciones, tejidos, Células y humores orgánicos (Easmon, 1988, Kitzes-Cohen, 1987).

t_{1/2}= vida media

1.1.1 Mecanismo de acción

El mecanismo por el cual las quinolonas detienen un proceso infeccioso o como ejercen su efecto bactericida en los seres humanos infectados se desconoce aún y con base en los resultados de diversos experimentos bioquímicos con quinolonas algunos investigadores han propuesto dos posibles sitios receptores: la enzima girasa y el DNA (Gellert *et al.*, 1976), que se han utilizado para desarrollar cuatro modelos para explicar el proceso de la acción bactericida de estos compuestos. Los modelos describen únicamente la etapa de interacción fármaco-receptor que implican cuatro modelos:

Modelo 1: inhibición de la enzima girasa

Este modelo implica la formación de un complejo ternario entre la enzima girasa, la quinolona y el DNA (Shen *et al.*, 1989).

La enzima girasa es una topoisomerasa II del DNA descubierta y aislada por Gellert *et al.* (1976). Es una proteína de peso molecular de 380,000 Da formada de cuatro subunidades: 2 monómeros alfa y 2 monómeros beta (Gellert M., 1981). Es responsable de la forma del DNA debido a que controla sus actividades relajantes y de superenrollamiento sin compactarlo.

Los primeros estudios de inhibición con esta enzima los realizaron con moléculas pequeñas tales como el ácido nalidíxico y cumarinas, resultando el NAL un excelente inhibidor de ella y de la síntesis del DNA. Los resultados les llevaron a proponer a la enzima girasa como el “blanco” o sitio de acción de las quinolonas (Snyder y Drlica, 1979). Para explicar el proceso de inhibición de la síntesis del DNA Shen *et al.* (1989) propusieron un modelo que se basa en el mecanismo propuesto del superenrollamiento del DNA, que consiste de cuatro etapas (Brown *et al.*, 1979; Cozzarelli *et al.*, 1980; Gellert *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 1985). Sugiriendo que las quinolonas se intercalan en la abertura inducida en el DNA por la enzima (segunda etapa), uniéndose por medio de puentes de hidrógeno evitando así, que continúen las siguientes etapas del superenrollamiento y se libere la enzima. Esta proposición se representa por medio del modelo ilustrado en la **Figura 3**.

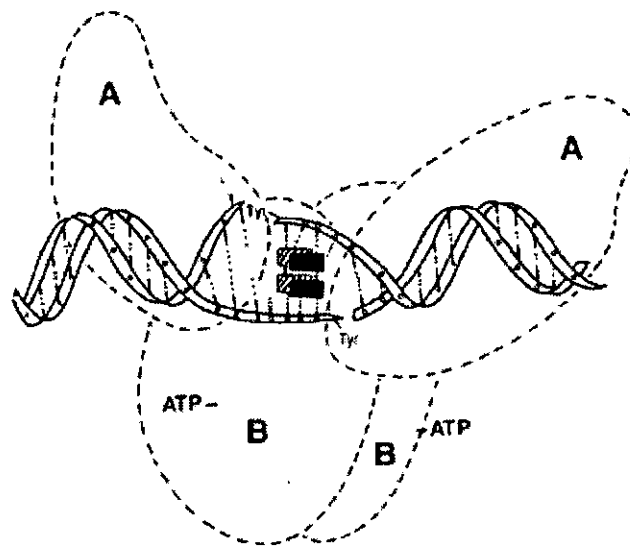


Figura 3. Modelo de unión cooperativa quinolona-DNA en la inhibición de la enzima girasa (Shen *et al.*, 1989)

En este modelo la afinidad y especificidad de unión quinolona-DNA se realiza en una forma cooperativa que depende de la conformación de cada hebra de DNA y de la asociación entre

las moléculas de quinolonas en el sitio de unión. La **Figura 4** muestra las interacciones entre la secuencia de nucleótidos TGTG seleccionados arbitrariamente y varias moléculas de antimicrobianos que se unen a los nucleótidos por medio de puentes de hidrógeno entre los oxígenos de los carbonilos de los grupos ácido y ceto de las quinolonas con los hidrógenos de los átomos donadores de las bases de los nucleótidos. Es importante mencionar que estas interacciones se propusieron en base al apilamiento de las moléculas del ácido nalidíxico en el estado sólido cristalino (Achari y Neidle, 1976; Huber *et al.*, 1980).

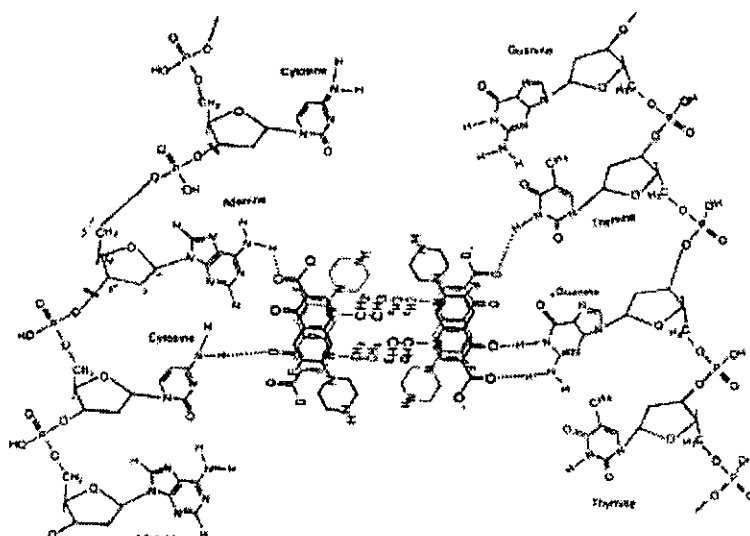


Figura 4. Proposición del modo de unión de las quinolonas a una porción del DNA, (Shen *et al.*, 1989).

Modelo 2. Intercalación de las quinolonas entre los pares de bases de la doble hélice del DNA (Shen *et al.*, 1989), **Figura 5.**

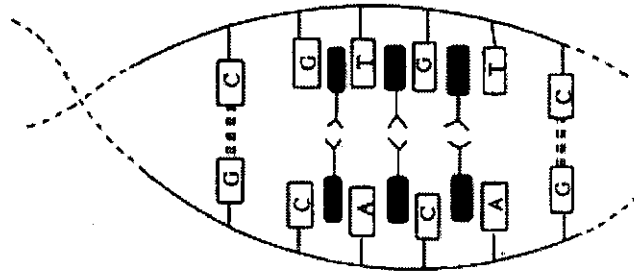


Figura 5. Proposición del modo de intercalación de las quinolonas por Shen *et al.*, 1989

Modelo 3. Es el primer modelo en el que se considera al Mg^{2+} y a los iones fosfato para unir a las quinolonas al DNA (Palumbo *et al.*, 1993). El modelo se basa en los resultados de los experimentos que analizan la interacción de norfloxacina al DNA de plásmidos que depende de la concentración de iones Mg^{2+} ya que en ausencia o en un exceso de él no se observa interacción alguna (Palú *et al.*, 1992).

Para explicar la inhibición de la síntesis del DNA proponen la formación de un complejo ternario de DNA-quinolona-enzima, (**Figura 6**). En donde la unión se lleva en un punto no específico de una hebra del DNA de plásmido por medio de la quelación del Mg^{2+} que se encuentra unido al fosfato de las bases del DNA. Proponiendo que la interacción entre el Mg^{2+} y la quinolona es vía los C=O de la posición 4 y el oxianión del grupo carboxilato de la posición 3.

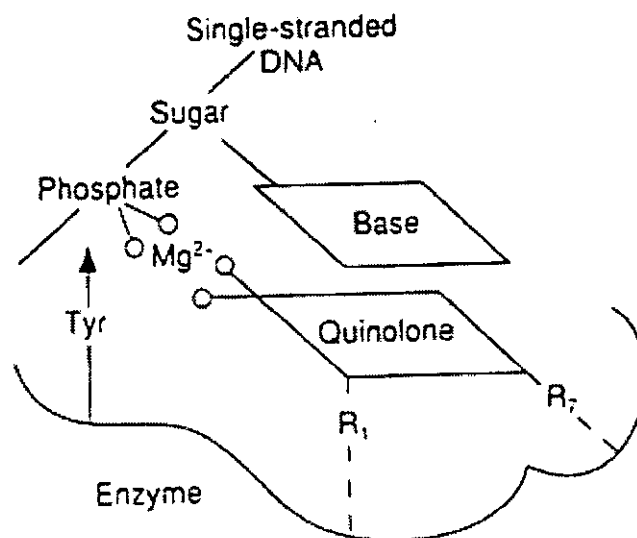


Figura 6. Representación esquemática de los requerimientos estructurales de interacción quinolona-DNA, (Palumbo *et al.*, 1993).

Modelo 4. Intercalación y unión externa de quinobenzoxacinas al DNA (Fan *et al.*, 1995).

Las quinobenzoxacinas son quinolonas tetracíclicas que han mostrado tener una excelente actividad citotóxica en células humanas y de murinos, así como en tumores sistémicos en ratones (Chu *et al.*, 1992). Las bases moleculares de su actividad antineoplásica se desconocen, pero consideran que están mediadas por la topoisomerasa II, ya que se ha comprobado que son potentes inhibidores de ella (Permana *et al.*, 1994). Por medio de estudios *in vitro* demuestran que las quinolonas y las quinobenzoxacinas no se unen a la topoisomerasa, pero sí al DNA. La interacción con el DNA fue dependiente de cationes divalentes como es el Mg^{2+} o Mn^{2+} . Por esta razón, el grupo de investigación analizó complejos binarios quinobenzoxacinas- Mg^{2+} y ternarios quinobenzoxacinas- Mg^{2+} -DNA, con técnicas de RMN¹H, RMN¹³P, FT-IR, UV-VIS, viscosimetría y electroforesis en gel (Fan *et al.*, 1995). Sus resultados los llevaron a proponer la formación equimolecular de complejos

quinobenzoxacina- Mg^{2+} en relaciones estequiométricas 1:1 y 2:2 (**Figura 7 y 8**) considerando mas estable el dímero 2:2.

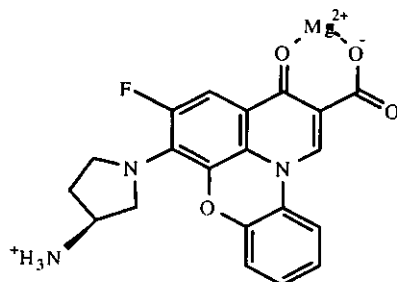


Figura 7. Quinobenzoxacina

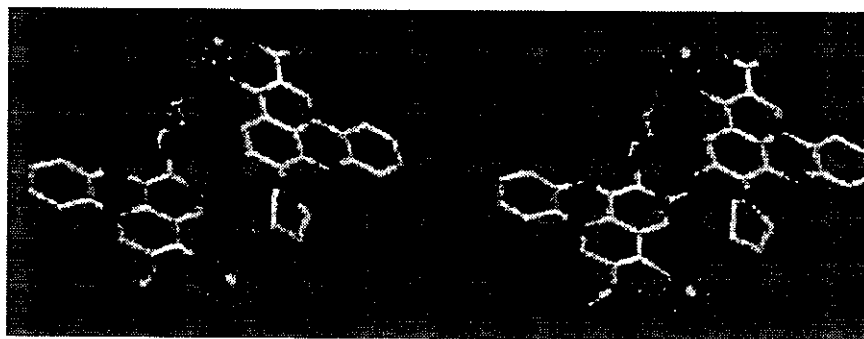


Figura 8. Modelo propuesto del complejo quinolona-magnesio 2:2 (Fan et al., 1995)

Para el modelo de unión quinolona-metal 2:2 propusieron que las interacciones entre las dos moléculas de quinolonas ocurría en un arreglo cabeza-cola estabilizándose por dos iones Mg^{2+} . Este tipo de interacción fue diseñada por medio de técnicas de modelado molecular y sistemas gráficos. Para modelar el complejo ternario, intercalaron una de las moléculas del dímero entre los pares de base de un segmento de la doble hélice del DNA y la otra la unieron externamente a la doble hélice (**Figura 9**). Generaron también un dímero mixto, formado por una quinobenzoxacina y una norfloxacin, que intercalaron al DNA, sugiriendo así un posible mecanismo de inhibición de la girasa y topoisomerasa II.

Es importante mencionar que las interacciones entre quinolonas-metal y quinolonas-DNA, las diseñaron en base a los datos obtenidos de la estructura cristalina del complejo ác. nalidíxico-Cu-fenantrolina (Mendoza-Díaz *et al.*, 1987).



Figura 9. Modelo de la intercalación del complejo quinolona-magnesio 2:2 a la doble hebra del DNA (Fan *et al.*, 1995).

Recientemente se describe en la literatura que las quinolonas actúan como inhibidores de la actividad enzimática de la topoisomerasa IV, enzima estructuralmente semejante a la girasa y cuya función es el desenrollamiento del DNA cromosómico (Chen *et al.*, 1996; Drlica and Zhao, 1997; Anderson *et al.*, 1998) .

1.1.2 Toxicidad

Las reacciones secundarias producidas por las quinolonas en el organismo humano son semejantes entre ellas, se manifiestan en diferente forma y en diferentes partes del organismo humano, **Tabla 3**.

Tabla 3. Efectos secundarios de las quinolonas.

Gastrointestinal:	Nauseas, malestar abdominal, anorexia, irritación gástrica y diarrea.
Sistema nervioso central:	Dolor de cabeza leve, disnea, perturbación del sueño o alteración del humor, agitación, ansiedad, depresión, alucinaciones o confusiones, incremento de convulsiones en personas con padecimiento de la enfermedad de Parkinson*
Reacciones de la piel e hipersensibilidad: (vía tópica)	Salpullido seguido de prurito, fotosensibilidad.
Artropatía:	Artralgia, mialgia, inflamación de articulaciones, erosión de cartilago en animales en etapa de desarrollo, inhibición del desarrollo de cartílagos en embriones.**

- El mecanismo por el cual las quinolonas afectan al sistema nervioso central se desconoce, pero sus efectos se han asociado con la habilidad de las quinolonas para inhibir la unión específica del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico a las membranas sinápticas preparadas del cerebro de rata (Tsuji *et al.*, 1988).
- Debido a estos efectos colaterales, las quinolonas no son recomendadas para administrarse en niños o en mujeres embarazadas.

1.1.3 Estudios de la reactividad química de las quinolonas con metales

En relación a la reactividad química de las quinolonas con metales, en la literatura se encuentran descritos diferentes estudios:

a) Estudios farmacocinéticos

La administración de quinolonas con antiácidos metálicos que contienen aluminio y magnesio disminuye la biodisponibilidad de estos antibióticos y la atribuyen a la formación de complejos con estos metales, los cuales se han identificado por medio de técnicas espectroscópicas de UV, (Nakano *et al.*, 1978; Höffken, *et al.*, 1985; Preheim *et al.*, 1986; Nix *et al.*, 1990; Shimada *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1993).

b) Estudios de inhibición

Palù *et al.* (1992) presentaron que la inhibición de la actividad enzimática de la girasa por las quinolonas depende de la presencia de iones divalentes, como es el Mg^{2+} . Para explicar el mecanismo de inhibición proponen dos modelos gráficos: uno que implica la formación de un complejo binario (quinolona- Mg^{2+}) que se intercala en la doble hebra del DNA (Fan *et al.*, 1995) y el otro la formación de un complejo ternario DNA- Mg^{2+} -quinolona (Palumbo *et al.*, 1993).

c) Preparación e identificación de estructuras de complejos quinolona-metal

La primera estructura cristalina descrita de un complejo quinolona-metal fue la de un complejo mixto del ácido nalidíxico con 1,6-fenantrolina y cobre $[Cu(Phe)(NAL)(H_2O)]NO_3 \cdot 3H_2O$ obtenido por medio de una co-cristalización, lo caracterizaron por espectroscopia de RMN¹³C y por difracción de rayos X (Mendoza-Díaz, 1988, 1987). A partir de este compuesto se han descrito recientemente otros complejos tales como, $[Cu(Phe)(cinoxacina)(H_2O)]NO_3 \cdot H_2O$ (Mendoza-Díaz *et al.*, 1993), $(cinoxacina)_2-Cu$ y $(cinoxacina)_2-Ni$ (Ruiz M., *et al.*, 1997).

También se han reportado estudios de la formación de complejos entre quinolonas y metales divalentes y trivalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+}) empleando técnicas de espectrofotometría, potenciometría y espectroscopia de RMN¹H, RMN¹³C, EPR, IR y UV (Nakano *et al.*, 1978; Ross *et al.*, 1993; Mendoza-Díaz e Ireta-Moreno, 1994).

Con los resultados obtenidos mediante estas técnicas se ha establecido que los átomos responsables de la quelación del metal son los oxígenos de los grupos COOH y C=O de las quinolonas. En relación a la preparación de los complejos metálicos de quinolonas se ha

patentado el método de obtención de los complejos del ácido nalidixico con calcio, sodio y cobre por Leshner y Gruett (1962).

d) Pruebas de actividad biológica de complejos quinolona-metal

Se han realizado estudios de la actividad *in vitro* del complejo FeNAL sobre *Entamoeba histolytica* (Anaya-Velázquez *et al.*, 1989) y al complejo NAL-Cu-1,6-fenantrolina se le ha determinado que presenta actividad de nucleasa (Ramírez-Ramírez *et al.*, 1998).

e) Aplicación analítica de los complejos-quinolona-metal

La información obtenida de las investigaciones de los complejos metálicos de las quinolonas, ha inducido a emplearlas como reactivos analíticos para cuantificar trazas de norfloxacin en suero empleando un espectrofluorómetro que se basa en las propiedades fluorescentes del complejo NOR-Fe³⁺ (Issopoulos, 1989; Djurdjevic *et al.*, 1995).

1.2 Importancia de la pared celular bacteriana

La pared celular de las bacterias es una estructura muy importante porque funciona como un detector y protector de los cambios del medio ambiente. Sin la pared celular las células estallarían debido a la presión osmótica ejercida sobre su membrana citoplasmática, ya que normalmente se encuentran rodeadas de un medio acuoso. Bioquímicamente funciona como una estructura que controla la entrada de nutrientes y la salida de productos metabólicos. Su composición estructural y química es muy compleja y depende del tipo de bacteria, de la etapa de desarrollo y del medio en donde se desarrolla la bacteria. Generalmente las bacterias se diferencian por medio de la tinción de Gram. La diferencia en el teñido en las bacterias se debe a la composición química de la pared y en base a esta tinción las bacterias se identifican como bacterias gram-positivas y gram-negativas. La pared celular de las bacterias gram-positivas es relativamente gruesa y está constituida principalmente en un 90% de su peso de

peptidoglucanos también llamados como mucopéptido o mureína. El otro 10% de la pared son polímeros aniónicos llamados ácidos teicoicos que son polisacáridos ácidos (**Figura 10**).

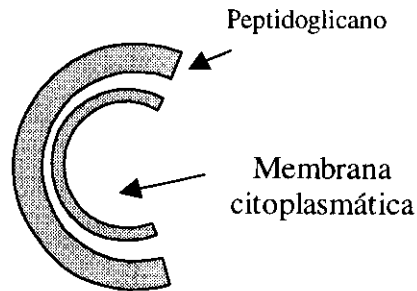


Figura 10 . Diagrama general de la pared celular de una bacteria gram-positiva

La composición de la pared celular de las bacterias gram-positivas es relativamente simple comparándola con la pared de las bacterias gram-negativas que es bioquímicamente más compleja (**Figura 11**).

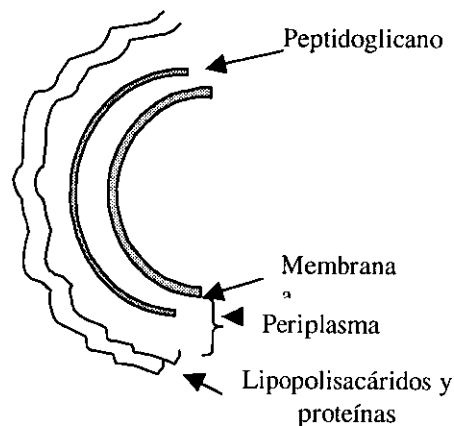


Figura 11. Diagrama general de la pared celular de una bacteria gram-negativa

Las bacterias gram-negativas presentan una membrana externa altamente organizada, la cual está constituida por una bicapa de fosfolípidos y lipopolisacáridos. Esta membrana funciona como una barrera de permeabilidad con poros de difusión hidrofílica específicos llamadas porinas que conectan al periplasma de la célula con el medio externo. En estas bacterias la

capa de peptidoglucanos es muy delgada y con frecuencia representa del 5 al 20 % de la pared celular. Los ácidos teicoicos por lo regular no están presentes en esta clase de bacterias, pero contienen lipopolisacáridos (LPS) y proteínas en la membrana externa. Generalmente los lipopolisacáridos de la membrana externa en estas bacterias actúan como endotoxinas y los polisacáridos como antígenos "O", produciendo síntomas de enfermedad. Debido a la composición química de la pared celular en los microorganismos, en las infecciones humanas predominan los microorganismos gram-negativos sobre los gram-positivos.

Es importante señalar que la cantidad de peptidoglucanos varía considerablemente de una especie a otra, sin embargo, las bacterias gram-negativas contienen menos peptidoglucanos que las gram-positivas.

1.3 Carboxipeptidasa A, Fosfatasa alcalina y Hemoglobina

La carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1) (Vallee y Neurath, 1954), es una enzima proteolítica extraída del páncreas bovino, dependiente de zinc, con una masa molecular aproximada de 35250 Da. La enzima cataliza la hidrólisis de residuos de aminoácidos aromáticos de carboxilos terminales de péptidos y proteínas. Se ha sintetizado como zimógeno y se han identificado tres formas diferentes de la enzima $A\alpha$, $A\beta$ y $A\gamma$ con 307, 305 y 300 residuos de aminoácidos, respectivamente. El tamaño depende del procedimiento empleado en su aislamiento, diferenciándose marcadamente en sus propiedades físicas pero con características cinéticas idénticas.

La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)(Garen, 1960) es una fosfomonoestearasa no-específica que presenta las actividades de hidrólisis y de transferasa, es decir puede funcionar vía un intermediario fosfoserina para producir fosfato inorgánico libre o bien transferir el grupo fosforilo a otros alcoholes (Kim y Wickoff, 1991; Coleman, 1992; Schwartz y Lipmann, 1961). En general cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato de alcoholes primarios y

secundarios, de alcoholes de azúcares, de alcoholes cíclicos, fenoles y aminas. Se ha aislado de bacterias, hongos, invertebrados, pescado y mamíferos, pero no se ha aislado de plantas superiores. En el hombre se encuentra ampliamente distribuida en las membranas celulares de tejidos y órganos del cuerpo (incluyendo huesos) y en la *E. coli*, se le ha localizado en el espacio periplásmico de la pared celular. En el hombre se han identificado cuatro isoenzimas y en la *E. coli* tres isoenzimas. Su función específica se desconoce pero al parecer participa en la mineralización del hueso, por medio de la formación de fosfato de calcio. Estructuralmente es un dímero que contiene dos átomos de zinc y uno de magnesio en cada sitio activo de la enzima. El zinc se libera a un pH menor de 3 debido a que el dímero se disocia o bien con agentes quelantes como es el EDTA. El peso molecular de la enzima aislada de *E. coli* es de 94000 Da y las enzimas en el hombre son de aproximadamente de 160000 Da.

La hemoglobina es el almacén más grande de hierro en el organismo humano (70-75 %). Consiste de cuatro cadenas polipeptídicas de dos diferentes clases, dos monómeros α y dos monómeros β . Presenta la propiedad peroxidativa sobre ácidos grasos poliinsaturados, lípidos, proteínas y carbohidratos y el mecanismo de acción por el cual realiza su actividad es semejante a la de las peroxidasas (Tappel, 1953, Elverse *et al.*, 1994). Sin embargo, debido a que su actividad de peroxidasa es menor, en los ensayos se debe emplear de un 10 a 100 % más de hemoglobina que de una peroxidasa ordinaria.

Su actividad no es específica y se pueden emplear varios compuestos como substratos como por ejemplo: el ácido 2,2'-azino bis (3-etilbenzotiazolinosulfónico) (ABTS), dopamina, guayacol, o-dianisidina, pirogalol, bencidina y sus derivados, entre otros. El pH óptimo para el ensayo de la hemoglobina es de 5.0 a 5.5 semejante al empleado con las peroxidasas y el amortiguador debe ser inorgánico a base de fosfatos o carbonatos para evitar su oxidación.

2. Planteamiento del problema

Las propiedades antimicrobianas y farmacológicas de las quinolonas han fomentado el interés para continuar su investigación química, estructural, farmacológica y terapéutica, con la finalidad de reducir sus efectos tóxicos, de incrementar su eficacia y determinar su mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de estos antimicrobianos no se ha establecido, sin embargo, el modo de unión de las quinolonas a la enzima girasa y al DNA se ha tratado de explicar empleando técnicas de modelado molecular que detallan únicamente la etapa de aproximación del fármaco al sitio de unión (receptor) (Fan *et al.*, 1995). Este proceso de reconocimiento es semejante a la hipótesis de Fisher de “Llave-cerradura”, que inicialmente se aplicó a reacciones de enzima-sustrato (Fisher, 1894). Frecuentemente, este tipo de estudio falla en sus predicciones debido a que se ignoran los estudios farmacocinéticos, la reactividad química de los compuestos en estudio y los mecanismos de defensa del organismo humano. (Shen *et al.*, 1989; Balumbo, *et al.*, 1993; Fan *et al.*, 1995)

Las quinolonas son moléculas polifuncionales y a la fecha se desconoce la participación de cada uno de los sustituyentes en la acción bactericida. Los grupos reactivos de estas moléculas en un medio acuoso son el grupo carboxílico y los átomos de nitrógeno del sustituyente del C(7). Por ejemplo, los átomos de nitrógeno de los anillos de piperidinilo o pirrolidinilo en las quinolonas tienden a protonarse a pH ácidos formando especies catiónicas que pueden ser susceptibles a bases. El grupo carboxílico en C(3) no es reactivo a nucleófilos en un medio acuoso, sin embargo, a pH ligeramente básicos tiende a disociarse favoreciendo la solubilización de la quinolona en medio acuoso lo cual facilita su absorción y distribución en el organismo humano. Además, su disociación lo hace reactivo hacia electrófilos, como por

ejemplo los cofactores inorgánicos (cationes), moléculas orgánicas electrodeficientes y centros electrofílicos formados *in situ* durante los ciclos catalíticos.

En relación a la reactividad química de las quinolonas se encuentran descritos en la literatura diferentes estudios de la interacción con varios metales (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+}) y con algunas biomoléculas (enzima girasa, enzima topoisomerasa IV y DNA).

Con el conocimiento de la reactividad química de estos antibióticos con metales divalentes y biomoléculas, se puede contribuir al estudio de su mecanismo de acción, el cual es importante e indispensable para poder diseñar nuevos inhibidores específicos con efectos colaterales mínimos. Con el fin de aportar más información en esta línea de investigación estructural y de la reactividad química se planteó el estudio de seis quinolonas, el ácido nalidíxico (NAL), el ácido piromídico (PIR), la rosoxacina (ROS), la norfloxacin (NOR), la ciprofloxacina (CIP) y la ofloxacina (OFLO) (**Figura 12**), frente a seis cationes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+}), a nucleósidos, a nucleótidos, a tres proteínas y sobre una bacteria gram-negativa.

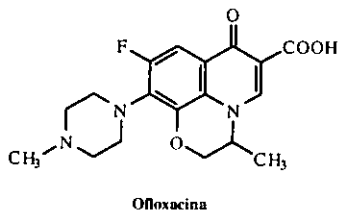
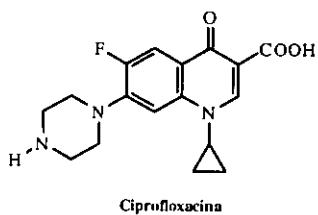
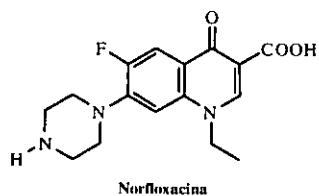
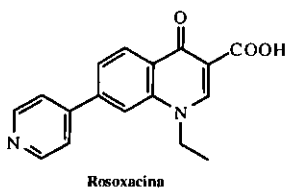
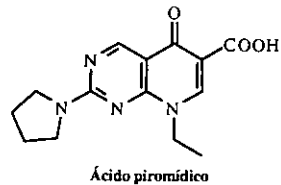
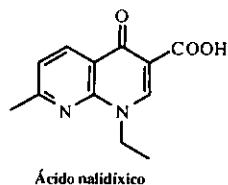


Figura 12. Quinolonas

3. Objetivos

3.1 Objetivo general:

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la reactividad química de un grupo de quinolonas con metales divalentes y biomoléculas.

3.2 Objetivos particulares:

- Cristalizar las quinolonas como ácidos carboxílicos
- Determinar las estructuras de las quinolonas por difracción de rayos X en el estado sólido cristalino.
- Preparar complejos metálicos de las seis quinolonas con metales (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+}) mediante reacciones ácido base y cristalizarlos.
- Determinar las estructuras de los complejos quinolona-metal, por difracción de rayos X en el estado sólido cristalino.
- Co-cristalizar quinolonas con nucleósidos y nucleótidos y determinar sus estructuras por difracción de rayos X en el estado sólido cristalino.
- Pre-sensibilizar células de *Escherichia coli* con quinolonas.
- Observar al microscopio electrónico de transferencia las células pre-sensibilizadas.
- Aislar y cuantificar proteínas y DNA de las células pre-sensibilizadas.
- Probar a las quinolonas como inhibidores de metaloenzimas, diferentes a las topoisomerasas.

4. Metas

- Con los resultados de difracción de rayos X se aportarán estructuras en el estado sólido cristalino de cuatro quinolonas como ácidos carboxílicos que a la fecha no se encuentran descritas en la literatura.
- Se aportarán nuevas estructuras cristalinas de los complejos metálicos de las quinolonas, con las cuales se confirmarán los estudios espectroscópicos de RMN¹³C, IR y UV de la interacción y capacidad quelante de las quinolonas descritas por algunos autores.
- Con las estructuras de los complejos, se establecerán las geometrías de coordinación, la estequiometría, las conformaciones y esteroquímicas de los núcleos y sustituyentes de los ligantes en cada complejo.
- Por medio de co-cristalizaciones en un medio acuoso se crecerán cristales de complejos quinolona-nucleósido y quinolona-nucleótido cuyas estructuras cristalinas permitirán determinar posibles interacciones químicas entre las subunidades que conforman al polímero natural del DNA (nucleósidos y nucleótidos) y moléculas de quinolonas.
- Con la observación de las células de *Escherichia coli* pre-sensibilizadas se determinará el daño sobre su pared celular, que es funcional y estructuralmente vital para la célula y cuya estabilidad es dependiente de cationes divalentes como son el Ca²⁺ y el Mg²⁺.
- Mediante la cuantificación de proteínas y DNA de células pre-sensibilizadas se comprobará y comparará el grado de sensibilización de la pared celular producida por las quinolonas y el EDTA.
- Por medio de ensayos de inhibición enzimática de proteínas dependientes de metales se establecerá o eliminará a las quinolonas como inhibidores específicos de las topoisomerasas.

5. Materiales y métodos

Las sustancias químicas utilizadas en los diferentes experimentos, fueron de grado analítico. Se obtuvieron principalmente de Aldrich-Sigma Chemical Co., Merck y de J. T. Backer Chemical Co.

Para el presente trabajo se eligieron seis quinolonas el ácido nalidíxico, el ácido piromídico, la norfloxacin, la ciprofloxacina, la ofloxacina y la rosoxacina (**Figura 12**), seleccionadas con base en su espectro de acción, potencia y estructura química. Los cuatro primeros antibióticos son grado reactivo y los dos últimos se obtuvieron por extracción de la solución inyectable Floxstat de 400 mg (Cilag de México S.A. de C.V) y de cápsulas de Eradacil de 150 mg (Sanofi-Winthrop, S.A. de C.V) respectivamente. Antes de utilizarlos se determinó su pureza por medio de su p.f, cromatografía en capa fina y RMN¹H. Los resultados en cada caso coinciden con los descritos en la literatura.

Las técnicas utilizadas para determinar la estructura y la reactividad de las quinolonas hacia cationes divalentes, nucleósidos, nucleótidos, células *in vitro* y biomoléculas fueron: la cristalización, difracción de rayos X, pruebas microbiológicas, pruebas bioquímicas y microscopía electrónica de transmisión. Estas técnicas se describen a continuación:

5.1 Cristalización

a) Cristalización de las quinolonas como ácidos carboxílicos

Para obtener cristales adecuados para los estudios de difracción de rayos X de los ácidos carboxílicos de quinolonas, se investigó su solubilidad en diferentes disolventes orgánicos de baja, media y alta polaridad, ensayando 1 mg de quinolona con cada disolvente. Con base en la solubilidad se crecieron cristales por evaporación lenta de una disolución de cada quinolona en un disolvente y en mezclas binarias de disolventes.

b) Co-cristalización de quinolona-nucleósido y quinolona-nucleótido.

Para determinar posibles interacciones químicas entre las subunidades que forman al polímero natural del DNA y moléculas de quinolonas se intento co-cristalizar el ácido nalidíxico con los cuatro nucleósidos y un nucleótido:

NAL-citidina	NAL-guanosina	NAL-timidina
NAL-adenosina	NAL-citidilato	

Se prepararon disoluciones acuosas a una concentración de 25 mg/ml del ácido nalidíxico, de cuatro nucleósidos (adenosina, timidina, guanosina, citidina) y de un nucleótido (citidilato) por separado. La quinolona se solubilizó al hacerla reaccionar estequiométricamente con hidróxido de sodio. Los nucleósidos y el nucleótido se disolvieron directamente en agua desionizada. Posteriormente se prepararon las mezclas, en una relación estequiométrica 1:1 de la sal de sodio del ácido nalidíxico con cada uno de los nucleósidos y el nucleótido respectivamente, a temperatura ambiente.

La co-cristalización del ácido nalidíxico con los nucleósidos y el nucleótido se realizó por medio del método de difusión de vapor en gota suspendida (McPherson, 1982), debido a que los cuatro nucleósidos y el nucleótido son insolubles en los disolventes orgánicos (cloroformo y diclorometano) en los cuales se solubiliza el ácido nalidíxico. El método consistió en depositar gotas de 10 μ l en cubreobjetos de vidrio previamente siliconizados, los cuales se colocaron invertidos sobre los pozos de la caja Linbro, sellándolos con grasa de silicón (Dow Corning). Las gotas contenían 5 μ l de la mezcla quinolona-nucleósido o nucleótido y 5 μ l de un agente precipitante. Cada gota se equilibrio contra 500 μ l del agente precipitante. Con esta técnica se utilizaron tres agentes precipitantes: 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y polietilen glicol 6000 (PEG 6K), para cada mezcla a cristalizar en un intervalo de pH de 4 a 9.

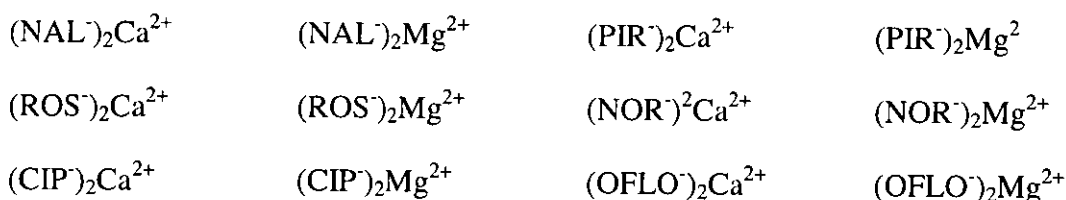
Sustancias utilizadas en la cristalización de proteínas, péptidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos (Jancarik y Kim, 1991). El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es una sal que tiene la propiedad de deshidratar las biomoléculas y disminuir la actividad química del agua, el MPD es un disolvente orgánico que tiende a disminuir la fuerza iónica de las biomoléculas y a estabilizarlas por medio de propiedades dieléctricas y el PEG 6K es un polímero de bajo peso molecular que se hidrata fácilmente, reduciendo el volumen de la gota suspendida y las propiedades dieléctricas del agua.

c) Preparación y cristalización de los complejos quinolona-metal

Los cationes metálicos que se emplearon para preparar los complejos quinolona-metal son el Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} . Cationes de vital importancia en reacciones y procesos biológicos de células procariontes y eucariontes.

Método I:

Se prepararon doce complejos quinolona-metal por medio de la reacción química entre la sal de sodio de cada quinolona (NAL, PIR, ROS, NOR, CIP y OFLO) y los cloruro metálicos de magnesio y calcio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en una relación estequiométrica 2:1 respectivamente:



La reacción se realizó a temperatura ambiente y en medio acuoso. Los complejo formados se lavaron primero con suficiente agua y posteriormente con diclorometano para eliminar los residuos de la sal metálica y quinolona que no reaccionaron. Posteriormente los polvos se secaron al vacío y se determinó su solubilidad. El crecimiento de cristales se realizó por medio del método de evaporación lenta de disoluciones en metanol-agua y metanol-etanol-agua de

cada complejo, con una concentración de 1 mg/ml. Para el estudio por difracción de rayos X se colocó un cristal del complejo formado en un tubo capilar equilibrándolo con agua destilada y sellándolo por los dos extremos.

Método II:

Como otra alternativa para preparar y crecer cristales de los complejos metálicos de las quinolonas se empleó el método del gel. Los complejos se obtienen mediante reacciones ácido-base. Este método se ha empleado en la preparación y cristalización de complejos de ácidos carboxílicos alifáticos de bajo peso molecular con calcio, obteniendo excelentes resultados (Henisch, 1988). En este trabajo el hidrogel se preparó con alcohol polivinílico debido a que es un polímero no iónico y a su disponibilidad para las pruebas.

El gel se preparó de la siguiente manera: en un vaso de precipitados se disolvieron 25 g de alcohol polivinílico 150 en 100 ml de agua desionizada, agitando durante 48 hrs. La densidad del gel fue de 1.020 g/ml. Por separado se disolvieron las quinolonas (NAL, PIR, ROS, NOR, CIP y OFLO) y las sales metálicas ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , MnCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en medio acuoso a una concentración de 0.04 M y 0.08 M, respectivamente, filtrándose a través de membranas de 0.4 μm . En tubos con tapón de rosca se colocó 1 g del gel, se adicionó 1 ml de la quinolona 0.04 M y se mezcló perfectamente con una varilla de vidrio. Posteriormente, se depositó sobre la superficie del gel 1.0 ml de la sal metálica 0.8 M, la cual se difundió uniformemente por capilaridad a través del gel. Con éste método se realizó la reacción y cristalización de cada una de las quinolonas con Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} , respectivamente. El cristal del complejo se colocó en un tubo capilar equilibrándolo con aceite mineral y sellándolo por ambos extremos.

5.2 Determinación de las estructuras por difracción de rayos X

Los cristales se caracterizaron por métodos difractométricos, determinando las dimensiones de la celda unitaria, el sistema cristalino y el grupo espacial. Las intensidades difractadas se capturaron en un difractómetro automático Siemens P4/PC. Los datos obtenidos se procesaron para determinar la estructura tridimensional de cada uno de los cristales empleando el procedimiento de métodos directos incorporados en el programa SHELXTL (Sheldrick, 1990). El mismo paquete de programas se utilizó para el refinamiento de las estructuras. El método está basado en el procedimiento de mínimos cuadrados minimizando la función $w(|F_{ol}| - |F_{cl}|)^2$ en donde w representa una función de pesado basada en la relación recíproca de $|F_{ol}|$.

Con la información obtenida, las posiciones de los átomos (x, y, z) y sus parámetros de vibración térmica se realizó una descripción detallada de la estructura molecular cristalina en términos de las distancias interatómicas, los ángulos de enlace, el empaquetamiento y el apilamiento cristalino y las interacciones intra e intermoleculares mediante proyecciones del contenido molecular de la celda unitaria.

Para llevar a cabo el análisis conformacional (determinación de planos, conformación de anillos, interacciones intra e intermoleculares y puentes de hidrógeno) se empleó el programa PARST97 (Nardelli, 1995).

5.3 Pruebas microbiológicas

En este trabajo se utilizó la cepa de *Escherichia coli* 10536. Esta bacteria es gram-negativa y se eligió por su sensibilidad a diferentes antibióticos, por la complejidad química de su pared celular a comparación de las bacterias gram-positivas y porque es una especie ampliamente estudiada. La cepa de laboratorio fue proporcionada por el Departamento de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM. Para su desarrollo se empleó agar y caldo de tripticasa soya (TS) (Bioxon). Todas las pruebas se efectuaron por triplicado con sus

blancos y controles respectivos, utilizando agua desionizada, condiciones estériles y técnicas microbiológicas básicas.

En los experimentos se empleó la bacteria en fase estacionaria, la cual es la más recomendable para estudiar la reactividad química de las quinolonas sobre la pared celular, ya que en esta etapa la bacteria alcanza su máximo desarrollo y estabilidad.

Para la obtención de células sensibilizadas fue necesario establecer las condiciones de cultivo tales como, la población de la biomasa y la fase de desarrollo de la bacteria, así como la concentración de cada antibiótico que se empleará para sensibilizarlas. Considerando que las quinolonas actúan como agentes quelantes de metales se empleó como referencia el EDTA, el cual es un conocido agente quelante y secuestrante de cationes divalentes. A continuación se da la secuencia de experimentos realizados:

a) Activación de la cepa y estandarización del inóculo

Debido a que la cepa de *E.coli* 10536 se mantenía en refrigeración para su conservación, fue necesario activarla antes de cada experimento, mediante la resiembra en agar de tripticosa soya. Después de activarla por incubación a 37 °C durante 24 horas, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de solución fisiológica. De la suspensión se tomó 0.1 ml y se diluyó con aproximadamente 100 ml de solución fisiológica, ajustando el índice de turbidez a 5 UK (unidades klett) empleando un fotocolorímetro.

b) Desarrollo de biomasa en fase estacionaria (biomasa estándar)

Se inocularon 3 matraces bafleados conteniendo 100 ml de caldo TS, con 0.1 ml del inóculo estándar, se incubaron a 37 °C con agitación rotatoria a 200 r.p.m. Cada hora durante 24 horas, se midió el índice de turbidez del medio contra un blanco de TS (la turbidez fue proporcional a la densidad celular) y se tomó en ese momento 1 ml del cultivo para realizar la cuenta de

células viables en placa. Con las lecturas del índice de turbidez, se trazó la curva de desarrollo de las bacterias y en base a ella se decidió desarrollar la biomasa con un periodo de incubación de 8 horas.

Para determinar el número de células viables de la biomasa de 8 horas, se hicieron diluciones 1:10 a 1:100 del cultivo. Se tomó 1 ml de cada dilución y se inocularon en tubos de ensayo que contenían 20 ml de agar de TS a 45°C, se mezclaron y se vertieron en cajas petri, al solidificar se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La multiplicación de las bacterias en el medio sólido dio como resultado la formación de colonias macroscópicas visibles a simple vista. Cada colonia se formó a partir de una célula bacteriana y por lo tanto, contando el número de colonias formadas y tomando en consideración el factor de dilución, se calculó la cantidad de bacterias desarrolladas durante el periodo de incubación de 8 horas. La población de bacterias (biomasa estándar) se utilizó en los siguientes experimentos:

c) Determinación de la concentración bactericida (CB) de las quinolonas

A una serie de matraces bafleados conteniendo 100 ml de biomasa estándar, se adicionó el antibiótico, diluido en 100 ml de caldo TS y precalentado a 37 °C, en las concentraciones mostradas en la **Tabla 4**, que se establecieron con base en la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada antibiótico sobre *E. coli* reportadas en la literatura y ensayos con diferentes concentraciones. El pH inicial y final del medio del cultivo fue de 7.5. Después de adicionar el antibiótico a los matraces se continuó incubando a 37 °C y cada 2 horas durante 8 horas, se midió el índice de turbidez contra un blanco de TS y se tomó 1 ml del medio de cultivo para la cuenta de células viables en placa vertida. Se consideró como concentración bactericida (CB) aquella concentración que produjo la muerte de la biomasa estándar en el menor tiempo de exposición del antibiótico.

Tabla 4. Concentraciones aplicadas para determinar la concentración bactericida de cada quinolona sobre la biomasa estándar

	$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$
NAL	500	CIP	100
	750		250
	1000		350
	1250		500
PIR	100	OFLO	500
	150		750
	250		1000
	350		1250
	500		
ROS	100	EDTA	500
	250		750
	350		1000
	500		1250
	750		
NOR	1000		
	100		
	250		
	350		
	500		

NAL = ácido nalidíxico, PIR = ácido piromídico, ROS = rosoxacina, NOR = norfloxacin, CIP = ciprofloxacina, OFLO = ofloxacina, EDTA = ácido etilen diamino tetraacético.

d) Sensibilización de la biomasa con quinolonas

A una serie de 7 matraces, conteniendo 100 ml de biomasa estándar recientemente desarrollada, se les adicionó la concentración bactericida de cada antibiótico (Tabla 5) diluidos en 100 ml de caldo TS precalentado a 37°C, se continuó incubando durante 30 minutos a 37 °C con agitación a 200 r.p.m. Inmediatamente después, los matraces se colocaron en hielo junto con tres matraces adicionales de biomasa estándar sin tratamiento que se emplearon como dos blancos y un control. Posteriormente las biomasas se centrifugaron a 12100 xg durante 15 min a 4 °C en una centrifuga Beckman Modelo J2-21 con un rotor JA-20. Después se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con solución salina. Los paquetes celulares se colocaron en hielo o refrigeración hasta el momento de la ruptura.

Tabla 5. Concentración bactericida (CB) de las quinolonas

Antibiótico	µg/ml
Ácido nalidíxico	1000
Ácido piromídico	500
rosoxacina	750
norfloxacina	250
ciprofloxacina	250
ofloxacina	1000
EDTA	1000
control	-
blanco	-

e) Ruptura bacteriana

En la obtención de extractos de células procariontes, la ruptura de la pared celular es uno de los pasos críticos en los procesos de purificación de proteínas, debido a que las condiciones empleadas por cada método repercuten en la obtención de proteínas totales, actividad biológica, integridad y degradación de las proteínas, entre otros. Para romper la pared celular de las bacterias gram-negativas se recomienda aplicar métodos enzimáticos debido a la naturaleza química de su pared celular, minimizando así la desnaturalización de las proteínas que otros métodos producen (Cull y McHenry, 1990). La ruptura de bacterias gram-negativas se realiza generalmente con lisozima (Leive, 1974), siendo más efectiva cuando las células se permeabilizan y desestabilizan previamente con un detergente y un agente quelante como son el SDS y el EDTA, respectivamente. Estas sustancias desestabilizan a los lipopolisacáridos, que se encuentran fuertemente estabilizados por cationes divalentes, principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} (Marshall, 1991; James, 1991), facilitando la degradación de los peptidoglucanos por la enzima. Además, la ruptura celular frecuentemente se realiza en un amortiguador Tris-HCl 50mM a pH 7.5 u 8.0 el cual ayuda en forma efectiva a liberar los lipopolisacáridos y contribuye a permeabilizar la membrana externa de las bacterias (Irvin *et al.*, 1981).

Para aplicar un método de ruptura celular se consideró el tipo de bacteria, etapa y condiciones de desarrollo, así como el material celular que se deseó evaluar. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

Sobre un mortero previamente enfriado con hielo seco se colocó el paquete celular, se le adicionó poco a poco (para evitar formación de espuma) hielo seco molido y se maceró perfectamente durante 20 minutos. El macerado se pasó a tubos de centrifuga de 50 ml, se centrifugaron a 12100 xg durante 15 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante sobre un vaso de precipitado, se cubrió y se colocó sobre hielo, para hacer una segunda extracción al residuo sólido se le adicionaron 15 ml de agua desionizada y se centrifugó, así se aseguró la extracción de moléculas solubles en agua. Finalmente se juntó y registró el volumen total de cada extracto, para el siguiente experimento. El proceso se aplicó a cada paquete de células. Las seis biomasas se trabajaron juntas con dos blancos y un control.

Blanco: La ruptura de estas células se realizó macerándolas directamente con hielo seco durante 20 min, al igual que las células sensibilizadas con antibióticos.

Control: La ruptura se realizó con lisozima sobre células permeabilizadas con Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1mM y SDS al 0.1%. Al paquete se le adicionaron los agentes permeabilizantes y se incubó con agitación suave durante 20 min en hielo, posteriormente se le adicionó 1 ml de la solución de lisozima con una concentración de 2 mg/ml y se incubó durante 1 hora con agitación suave en hielo. Al terminó de ese tiempo se hizo la maceración con hielo seco durante 20 minutos.

5.4 Pruebas bioquímicas

La evaluación de la sensibilización y ruptura de la pared celular se realiza por medio de métodos directos e indirectos, los primeros emplean la microscopía que es una de las alternativas más simples y rápidas y los indirectos se basan en la cuantificación de ciertos

compuestos como por ejemplo, proteínas, enzimas, entre otros, liberados por ruptura celular (Kennedy y Cabral, 1993).

En el presente trabajo, se aislaron dos de las biomoléculas de esta bacteria: las proteínas por medio de la precipitación fraccionada (salting out) con sulfato de amonio hasta el 100 % y el DNA con bromuro de cetil tributil amonio (CTAB).

a) Aislamiento y cuantificación de Proteínas

El aislamiento de las proteínas de los extractos obtenidos de la ruptura bacteriana en este trabajo se realizó por medio del procedimiento de “salting out” con sulfato de amonio, el cual es uno de los métodos más comunes en la purificación de proteínas (Englard y Seifter, 1990).

El método se basa principalmente en la neutralización de las cargas de superficie de las proteínas y sustitución de las moléculas del agua por sal, lo cual hace que las proteínas precipiten debido a la disminución de su solubilidad, produciendo además una reducción de su actividad química protegiéndolas así de la desnaturalización. La cuantificación de las proteínas se realizó empleando el método de Lowry modificado cuya reacción es semejante a la del ensayo original (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1979), la prueba se realizó en condiciones alcalinas en donde el Cu^{2+} del reactivo forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas aisladas reduciéndolo a Cu^+ , la reacción es colorida y el color desarrollado se debe principalmente a los aminoácidos tirosina y triptofano y en menor grado a la cistina, cisteína e histidina, de acuerdo a lo reportado en la literatura. El trazo de los datos de la muestra estándar (concentración de proteína contra absorbencia) permitió determinar por medio de operaciones de regresión lineal la concentración de las proteínas en mg de cada extracto dializado.

El aislamiento de las proteínas de cada extracto se realizó por medio de precipitaciones fraccionadas sucesivas del 20, 40, 60, 80 y 100%, con sulfato de amonio sólido. Con base en el volumen de cada extracto, se le adicionó a intervalos sulfato de amonio sólido para llevar a

un 20 % de saturación a 4°C disolviendo la sal con agitación magnética suave, permitiendo un reposo de 15 min y después se centrifugó a 12100 xg a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se midió para hacer la precipitación al 40%, el sedimento se transfirió a un tubo recuperando los residuos con la mínima cantidad de amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 8.0. Se congelaron todos los precipitados de cada paquete extraído de las bacterias sensibilizadas para dializar todos los extractos al mismo tiempo. El proceso se repitió para las saturaciones del 60, 80 y 100% de cada extracto.

Los precipitados obtenidos con cada saturación de sulfato de amonio, se transfirieron a membranas de diálisis Spectra Por de 3500 daltones, se dializaron durante 20 horas contra 4 volúmenes de agua desionizada y después contra 4 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 8 a 4°C. Las muestras dializadas se transfirieron a tubos eppendorf y se concentraron mediante liofilización en una liofilizadora Edwards Modulyo, registrando el volumen final de cada concentrado para calcular el contenido de proteínas posteriormente.

Cuantificación de Proteínas (Método de Lowry, modificado):

La determinación se realizó con el ensayo de Bio-Rad DC (No. de catálogo 500-0116), el cual consta de :

Reactivo A: Solución de tartrato de cobre alcalina.

Reactivo B: Reactivo de Folin diluido

Estándar de albúmina con una concentración de 2 mg/ml

Durante el ensayo de cuantificación de proteínas se preparó una curva estándar con concentraciones desde 0.2 a 1.8 mg/ml, con el mismo amortiguador que la muestra y el blanco, Tris-HCl 0.05 M pH 8. A una serie de tubos de ensayo de 1 ml se les adicionó 5 µl de las muestras y estándares respectivamente. Se les adicionó 25 µl del reactivo "A" a cada tubo y se mezclaron perfectamente. Posteriormente se les agregó 200 µl del reactivo B, se

mezclaron y dejaron en reposo durante 15 min. Se midió la absorbencia a 750 nm contra el blanco de reactivo y se preparó la curva estándar trazando los valores de absorbencia vs la concentración de proteína en mg/ml. Empleando la curva estándar, se determinó la concentración final de proteína de cada precipitado.

b) Aislamiento y cuantificación de DNA

El aislamiento se realizó por medio de un procedimiento que emplea CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) (Rogers and Bendich, 1988).

El empleo de una solución amortiguadora de CETAB con un pH de 8 y una fuerza iónica de 1.4 M permite en el aislamiento del ADN, mantener estables los enlaces de hidrógeno, los enlaces fosfodiéster y los enlaces N-glicosilo entre las hebras complementarias del DNA durante la extracción. El pH y la fuerza iónica ayudan a disociar el complejo DNA-proteína, al reducir el carácter catiónico de las histonas y al disminuir las interacciones iónicas entre el DNA y los cationes. El EDTA se empleó con dos propósitos: el de secuestrar iones metálicos divalentes como Cd^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} que tienden a formar sales con los grupos fosfatos aniónicos del DNA y el de inhibir a las enzimas desoxiribonucleasas que requieren de Mg^{2+} o Mn^{2+} para degradar el DNA, catalizando la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en el DNA. Los polisacáridos y las proteínas se eliminan con β -mercaptoetanol, CTAB y extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico. El RNA se elimina con una ribonucleasa (RNasa) después de las proteínas y el DNA se precipita con alcohol isopropílico para su aislamiento.

Para su extracción se emplearon los siguientes reactivos:

- Amortiguador CETABX que consta de: CTAB 2% (w/v), NaCl 1.4 M, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, EDTA 20 mM, β -mercaptoetanol 0.2 %.
- Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
- Isopropanol

- Amortiguador de lavado frío:
- Etanol al 70%/10 mM de acetato de amonio
- Amortiguador TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8
- Solución de ensayo de bajo rango: 2.5 µl de solución Hoechest, 2.5 µl de amortiguador 10xTNE, 22.5 ml de agua destilada, conservada en botella ámbar.

Sobre un mortero previamente enfriado se colocó el paquete celular, se maceró con hielo seco molido durante 20 minutos. El macerado se transfirió a un tubo corex de 25 ml, que contenía 10 ml de CETABX previamente calentado a 60°C recuperando los residuos con el mínimo de CETABX, se mezcló suavemente y se incubó por 30 min. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente, se le adicionó 6.5 ml de una mezcla 24:1 de CHCl₃/alcohol isoamílico, se tapó el tubo, se mezcló suavemente durante 10 min y se centrifugó a 1940 xg durante 30 min. La fase acuosa se transfirió con una pipeta a otro tubo corex, el cual contenía 50 µl de una solución de RNasa (de 10 mg/ml). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se adicionó 2/3 del volumen de 2-propanol frío, se tapó con un parafilm y se mezcló suavemente para precipitar los ácidos nucleicos, se incubó en congelador durante 48 horas hasta observar turbidez. Se centrifugó a 1940 xg durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se le adicionó 5 ml de amortiguador de lavado frío. Se centrifugó a 1940 xg durante 30 min, se decantó el sobrenadante y secó la pastilla en horno de vacío o desecador durante 10 min. Se disolvió la pastilla en 0.5 ml de amortiguador TE y se dejó en reposo durante toda la noche a 4°C. Las seis biomasas sensibilizadas se trabajaron junto con dos blancos y un control.

Blanco: La ruptura de las células se realizó macerándolas con hielo seco durante 20 min, igual que a las células sensibilizadas con antibióticos.

Control: La ruptura se realizó con lisozima sobre células permeabilizadas con Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1mM y SDS al 0.1%. Al paquete se le adicionaron los agentes

permeabilizantes y se incubó con agitación suave durante 20 min en hielo, posteriormente se le adicionó 1 ml de una solución de lisozima con una concentración de 2 mg/ml y se incubó durante 1 hora con agitación suave en hielo. Al terminó de ese tiempo se hizo la maceración con hielo seco molido durante 20 min.

Cuantificación de DNA:

Se colocaron 2 ml de reactivo de bajo rango en una celdilla de cuarzo, se le adicionaron 2 μ l de la solución de DNA en TE, se mezcló y se leyó en el fluorómetro calibrado.

c) Pruebas de actividad e inhibición enzimática

Para realizar las pruebas de inhibición de actividad enzimática de proteínas dependientes de metales se emplearon tres proteínas disponibles en el laboratorio, que son las siguientes:

Carboxipeptidasa A:

Para poder determinar la acción inhibitoria de las quinolonas se procedió a medir la actividad enzimática de la enzima sobre el hipuril-l-fenilalanina (HLPA) empleando las condiciones descritas por McClure *et al.* (1964).

- Carboxipeptidasa A: 3.2 mg/ml en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.5 (25 μ l de la enzima en 1500 μ l de amortiguador de fosfatos).
- HLPA 1 mM en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.5 con NaCl 0.5 M.
- Inhibidores (quinolonas y EDTA): 1mM en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.5.

Actividad enzimática:

En una celdilla de cuarzo se incubaron 490 μ l de HLPA con 490 μ l de amortiguador de fosfatos durante 1 min a 27 °C. Se adicionaron 20 μ l de la enzima, se mezclaron rápidamente y se midió la hidrólisis del HLPA por la enzima a una absorbencia de 254 nm durante 15 min.

La unidad de la actividad enzimática se definió como la cantidad requerida de enzima para producir un cambio de absorbencia de 0.1/15 min a pH 7.5, a 27 °C y a 254 nm.

Inhibición de la actividad enzimática por quinolonas y EDTA:

En una celdilla de cuarzo se incubaron 490 µl de HPLA con 490 µl del inhibidor a 27 °C, durante 1 min. La concentración final del inhibidor en la celdilla fue de 0.49 mM. Se adicionaron 20 µl de la enzima, se mezclaron rápidamente y se midió la inhibición de la hidrólisis del HPLA por la enzima a una absorbencia de 254 nm durante 15 min.

Fosfatasa alcalina:

- Amortiguador Tris 1 M, pH 8.0

- p-nitrofenilfosfato 1mM en amortiguador Tris 1M, pH 8.0

- Fosfatasa alcalina de 4 mg/ml (20 µl de la enzima en 1500 µl de amortiguador Tris 1M pH 8.0)

- Inhibidores (quinolonas y EDTA): 1mM en amortiguador Tris-HCl 1M pH 8.0

Actividad enzimática:

En una celdilla de cuarzo se incubaron 490 µl de p-nitrofenilfosfato con 490 µl de amortiguador Tris a 30°C, durante 1 min., se adicionaron 20 µl de la enzima, se mezclaron rápidamente y se midió la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la enzima, a una absorbencia de 405 nm durante 20 min. La unidad de la actividad enzimática se definió como la cantidad requerida de enzima para producir un cambio de absorbencia de 0.1 en 20 min a pH 8.0, a 30 °C y a 405 nm.

Inhibición de la actividad enzimática por quinolonas y EDTA:

En una celdilla de cuarzo se incubaron 490 µl de p-nitrofenilfosfato con 490 µl del inhibidor a 30°C durante 1 min. La concentración final del inhibidor en la celdilla fue de 0.49 mM. Se

adicionaron 20 µl de la enzima, se mezclaron rápidamente y se midió la inhibición de la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato por la enzima, a una absorbencia de 405 nm durante 20 min.

Hemoglobina:

- Amortiguador fosfato-citrato 50 mM, pH 5.4
- Guayacol 0.1 M en amortiguador de fosfato-citrato 50 mM, pH 5.4
- H₂O₂ 176 mM
- Hemoglobina 1 mg/ml
- 1,10-fenantrolina 1 mM.
- EDTA 1 mM
- Quinolonas 1mM

Medición de la actividad peroxidativa de la hemoglobina:

En una celdilla de cuarzo de 1 ml se colocaron 750 µl del amortiguador fosfato-citrato, 100 µl de la sol. de guayacol y 100 µl de la solución de H₂O₂, se mezclaron e incubaron a 30°C, durante 1 min. Inmediatamente después se adicionó 20 µl de la solución de hemoglobina, se mezcló rápidamente y se midió la actividad de peroxidasa de la hemoglobina sobre el H₂O₂, a una absorbencia de 483 nm durante 15 min. La unidad de la actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para producir un cambio de absorbencia de 0.1 en 15 min a pH 5.4, a 30 °C y a 483 nm.

Medición de la inhibición de la actividad peroxidasa de la hemoglobina por quinolonas, EDTA y 1,10-fenantrolina:

En una celdilla de cuarzo de 1 ml se colocaron 490 µl del inhibidor, 260 µl de amortiguador fosfato-citrato, 100 µl de la solución de guayacol y 100 µl de la solución de H₂O₂, se mezclaron e incubaron a 30°C durante 1 min. La concentración final del inhibidor en la celdilla fue de 0.49 mM. Inmediatamente después, se adicionaron 20 µl de la solución de

hemoglobina, se mezcló rápidamente y se midió la inhibición de la actividad de peroxidasa de la hemoglobina sobre el H₂O₂, a una absorbencia de 483 nm durante 15 min.

5.5 Preparación de las células para el análisis ultraestructural

- amortiguador de fosfato-salino PBS: NaCl 5.84 g, KH₂PO₄ 1.36 g, NaHPO₄.2H₂O 8.9 g, ajustar el pH 7.3 ó 7.4
- glutaraldehído 2.5%
- oxido de propileno
- acetato de plomo
- acetato de uranilo
- resina epon
- tetróxido de osmio al 1%
- soluciones de etanol al 60, 70, 80, 90, 96 y 100%.

Para este estudio se utilizó biomasa estándar sensibilizada. A cada biomasa se le eliminó el medio de cultivo y se lavó 3 veces con solución fisiológica a 4°C, centrifugando a 12100 xg durante 15 min. Posteriormente se colocaron aproximadamente 0.5 ml de las células lavadas en tubos eppendorf con ayuda de una varilla y se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 30 seg para eliminar los residuos de la solución fisiológica.

Conservación de las células por medio de la fijación de proteínas y lípidos: inmediatamente después de eliminar la solución fisiológica se adicionó a cada paquete de células 1 ml de glutaraldehído al 2.5 % en un regulador de fosfato salino (PBS), se agitó en un vortex durante 5 min y se dejó en reposo durante 24 horas en refrigeración. Posteriormente se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 30 seg, se eliminó el sobrenadante y se le adicionó al paquete sin resuspender regulador PBS por 3 veces seguidas, eliminando el sobrenadante. Después se adicionó

aproximadamente 500 μ l de tetróxido de osmio al 1% en agua desionizada, como fijador de membranas, dejándolo actuar 24 horas.

Deshidratación de las células: las células se deshidrataron con adiciones sucesivas de soluciones de etanol al 60, 70 , 80, 90, 96 y 100%, con cada solución se dejó 5 min en reposo y se decantaron. Posteriormente se les adicionó 500 μ l de óxido de propileno, reposando 5 min y después se decantaron perfectamente.

Cada paquete se embebió en una resina epóxica que polimerizó a 40°C, formando un bloque sólido de plástico, de los cuales se realizaron cortes de 50 nm de espesor con un microtomo, colocándolos sobre rejillas de cobre. Los cortes se contrastaron con acetato de plomo, acetato de uranilo y posteriormente se observaron en el microscopio electrónico de transmisión.

6. Resultados

6.1 Cristalización de las quinolonas como ácidos carboxílicos

De las pruebas de solubilidad se encontraron dos disolventes para solubilizar a las quinolonas: el cloroformo y el diclorometano. El volumen que se empleó de estos disolventes para disolver 1 mg de quinolona, permitió apreciar la influencia de los sustituyentes sobre su solubilidad, (Tabla 6).

Tabla 6. Solubilidades de las seis quinolonas a 25 °C, en mg/ml

Disolvente	NAL	PIR	ROS	NOR	CIP	OFLO
CH ₂ Cl ₂	1:3*	1:3	1:6	1:25	1:34	1:36
CHCl ₃	1:1.5	1:1.5	1:4	1:20	1:25	1:28
Hexano	I	I	I	I	I	I
Acetato de etilo	I	I	I	I	I	I
Acetona	I	I	I	I	I	I
Etanol	I	I	I	I	I	I
Metanol	I	I	I	I	I	I
Alcohol Isopr.	I	I	I	I	I	I
Dioxano	I	I	I	I	I	I
Eter	I	I	I	I	I	I
DMSO	I	I	I	I	I	I
H ₂ O	I	I	I	I	I	I

I = insoluble

NAL = ác. nalidíxico, PIR = ác. piromídico, ROS = rosoxacina, NOR = norfloxacin.

CIP= cirprofloxacin, OFLO = ofloxacin.

*Ejemplo: la solubilidad de NAL es de 1 mg en 3 ml de diclorometano.

Con el cloroformo y el diclorometano se realizaron las pruebas de cristalización de cada quinolona empleando la técnica de evaporación lenta. El crecimiento de cristales, no fue satisfactorio por lo cual, se probaron combinaciones binarias con otros disolventes obteniendo cristales de únicamente cuatro quinolonas a partir de dichas disoluciones:

NAL diclorometano-isopropanol PIR diclorometano-isopropanol

ROS cloroformo-dioxano NOR cloroformo-etanol

Posiblemente, la adición de dioxano, isopropanol o etanol controló la velocidad de evaporación favoreciendo la fase de equilibrio del crecimiento de cristales debido a que se minimiza la energía libre del sistema. También se puede atribuir a un mejoramiento de las

fuerzas de interacción estéricas e hidrofóbicas entre las moléculas y a las propiedades de la mezcla como son su densidad, su constante dieléctrica, su viscosidad y solubilidad.

6.2 Determinación de las estructuras por difracción de rayos X de las quinolonas como ácidos carboxílicos

De los cristales obtenidos, los de norfloxacin crecieron como cristales gemelos y debido a ello no se pueden emplear en los estudios de difracción de rayos X ya que los patrones de difracción son complicados y difíciles de interpretar. Algunas de las características de los cristales de NAL, ROS, PIR y NOR se muestran en la **Tabla 7**:

Tabla 7. Características físicas de cuatro cristales de quinolonas

	NAL	PIR	ROS	NOR
Tamaño	> 4 mm	> 4 mm	> 4 mm	> 4 mm
Color	inoloro	amarillo claro	transparente	amarillo claro
Estructura interna	uniforme	uniforme	uniforme	irregular, gemelos
Estabilidad a TA	buena	buena	buena	Se fracturan y se pulverizan
Caras externas	definidas	definidas	definidas	irregulares

NAL = ácido nalidíxico, PIR = ácido piromídico, ROS = rosoxacina, NOR = norfloxacin
TA = temperatura ambiente

De estas quinolonas, se encuentran descritas en la literatura dos estructuras: el ácido nalidíxico y la norfloxacin, por lo cual se procedió a resolver únicamente por difracción de rayos X, la estructura de rosoxacina y del ácido piromídico.

En la **Tabla 1A** (Apéndice), se presentan los datos de los cuatro cristales (NAL, PIR, ROS y NOR), las condiciones experimentales empleadas para realizar la captura de datos, los programas y métodos aplicados para la solución y refinamiento de sus estructuras. Las cuatro quinolonas son estructuralmente diferentes y cristalizaron en diferente sistema cristalino y grupo espacial, propiedad que se debe principalmente a las condiciones empleadas en su cristalización. A continuación se describen las estructuras y conformaciones obtenidas en el estado sólido cristalino de la rosoxacina y del ácido piromídico:

Rosoxacina: ácido 1,4-dihidro-1-etil-4-oxo-7-(4-piridil)-3-carboxílico-quinolona. Los datos de su celda unitaria, las condiciones experimentales y el programa empleado para resolver y refinar su estructura se presentan en la **Tabla 1A**, (Apéndice). Sus coordenadas atómicas y factores de temperatura isotrópico equivalente se presentan en la **Tabla 2A** (Apéndice).

Por medio de los estudios de difracción de rayos X del cristal de rosoxacina se determinaron dos moléculas independientes por unidad asimétrica (A, B). Las dos moléculas son químicamente idénticas pero conformacionalmente diferentes, debido a las diferencias de hasta 0.1 Å en sus longitudes de enlace y a diferencias mayores de 10° en algunos de sus ángulos de enlace (**Tabla 3A**, Apéndice).

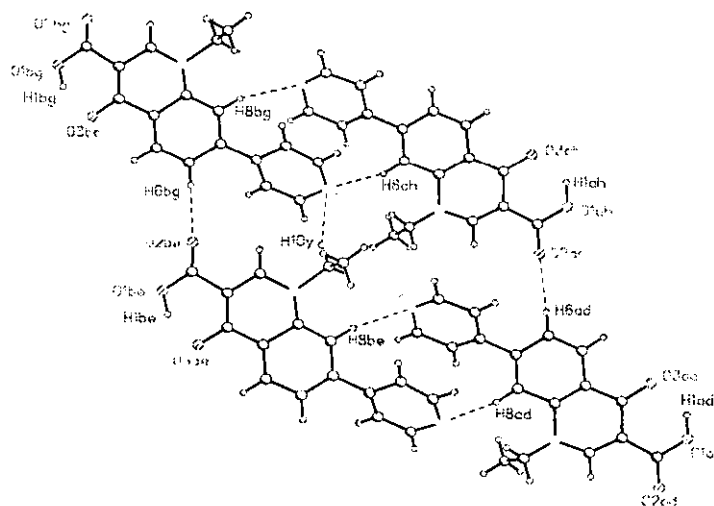


Figura 13. Contenido molecular de la celda unitaria

En la **Figura 13** se muestra a las dos moléculas en la celda unitaria que se encuentran estabilizadas externamente por medio de fuerzas de van der Waals, cuatro interacciones intermoleculares C-H \cdots O con longitudes de enlace menores a 3 Å y dos interacciones menores de 3.4 Å (**Tabla 4A**, Apéndice). Internamente ambas moléculas en el cristal se estabilizan por puentes de hidrógeno intramoleculares, entre los grupos hidroxilos de los ácidos carboxílicos y

los oxígenos de los grupo ceto, O(1a)-HO(2a)···O(3a) y O(1b)-HO(1b)···O(3b) con longitudes de enlace de 2.563 (5) y 2.541 (5) Å para A y B respectivamente.

La molécula de rosoxacina presenta un núcleo de quinolona formado por dos anillos fusionados **a** y **b** que son casi planos y tres sustituyentes: un anillo de piridina en C(7), un grupo etilo en N(1) y un grupo carboxílico en C(3) (**Figura 14**).

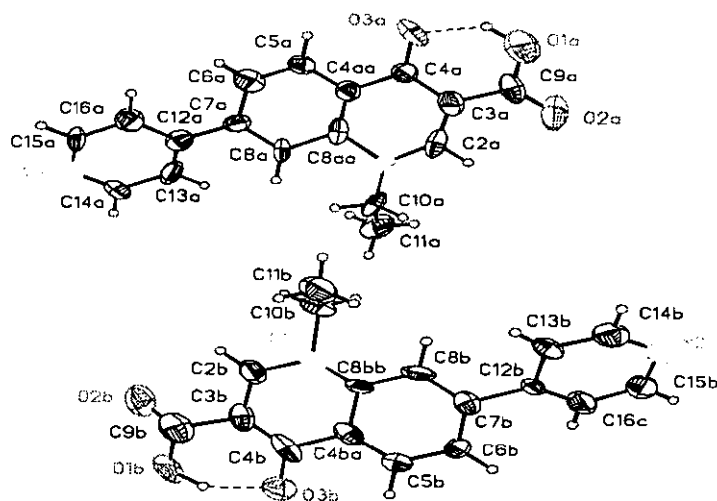


Figura 14. Estructura de rosoxacina

La conformación de los tres sustituyentes y del núcleo de quinolona se determinó por medio del ángulo dihedro calculado entre los planos **1**, **2**, **3** y **4** que definen a la molécula (**Figura 14a**), considerando como plano central o de referencia el plano **1** que contiene su núcleo (**Tabla 8**). Los valores obtenidos indican que el anillo de piridina y el grupo etilo, en ambas moléculas no son co-planares al núcleo, debido a que el grupo piridinil en A se encuentra a 44.4° y en B a 44.2° con respecto al núcleo y el grupo etilo en ambas moléculas se encuentra en una posición perpendicular al núcleo central, observándose entre ellas una diferencia de 8.4°. El grupo carboxílico es casi co-planar al núcleo en ambas moléculas, A y B, debido a que mediante un puente de hidrógeno intramolecular forma el anillo **c** de seis átomos con el

oxígeno del carbonilo de C(4). Los átomos en los planos 1,2 y 3 no desvían significativamente de la planaridad, lo cual significa que los anillos **a**, **b**, **c** y **d** son planos.

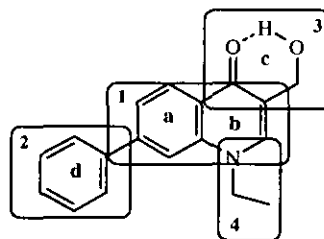


Figura 14a

Tabla 8. Ángulos dihedros (°) calculados entre los diferentes planos de las moléculas de la rosoxacin

Planos	Molécula A	Molécula B
núcleo quinolona(1)-anillo de piridina(2)	44.4 (12°)	44.2 (1)
núcleo quinolona(1)-grupo etilo(4)	84.8 (36°)	76.4 (4)
núcleo quinolona(1)-grupo carboxílico(3)	7.60(12°)	4.73(1)

La orientación del grupo etilo y del anillo de piridina en la molécula se determinó por medio del ángulo de torsión entre cuatro átomos (A-B-C-D) (**Tabla 9**). El grupo etilo en ambas moléculas se encuentran ligeramente orientadas hacia el grupo carboxílico, mostrando una diferencia de 6° entre ellas. El ángulo de torsión definido para la secuencia de átomos C(6)-C(7)-C(12)-C(16) es de -46.83 (7°) y 42.68(7°) en A y B respectivamente, lo cual indica que el anillo de piridina no es coplanar al núcleo principal, encontrándose en una posición perpendicular al núcleo.

Tabla 9. Algunos ángulos de torsión (°) de la rosoxacin

Átomos	Molécula A	Molécula B
C(2)-N(1)-C(10)-C(11)	-97.00 (6°)	102.95 (5)
C(6)-C(7)-C(12)-C(16)	-46.83 (7°)	42.68 (7)

Acido piromídico: ácido 5,8-dihidro-8-etil-5-oxo-2-(1-pirrolidinil)pirido[2,3-d]pirimidina-6-carboxílico). Por medio de los estudios de difracción de rayos X se determinó una molécula independiente por unidad asimétrica y el mismo contenido por celda unitaria. Los datos de la

celda unitaria, las condiciones experimentales y el programa empleado para resolver y refinar la estructura se presentan en la **Tabla 1A**, (Apéndice), las coordenadas atómicas y factores de temperatura isotrópico equivalentes se presentan en la **Tabla 5A** (Apéndice).

Las moléculas en el cristal se mantienen estabilizadas externamente por fuerzas de van der Waals y seis interacciones intermoleculares C-H \cdots O y C-H \cdots N menores de 3.4 Å. Internamente se estabilizan por medio de un puente de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno del ácido carboxílico y el oxígeno del grupo ceto, O(1)-H(1) \cdots O(3) con una longitud de 2.524 (3) Å, (**Figura 15** y **Tabla 6A**, Apéndice).

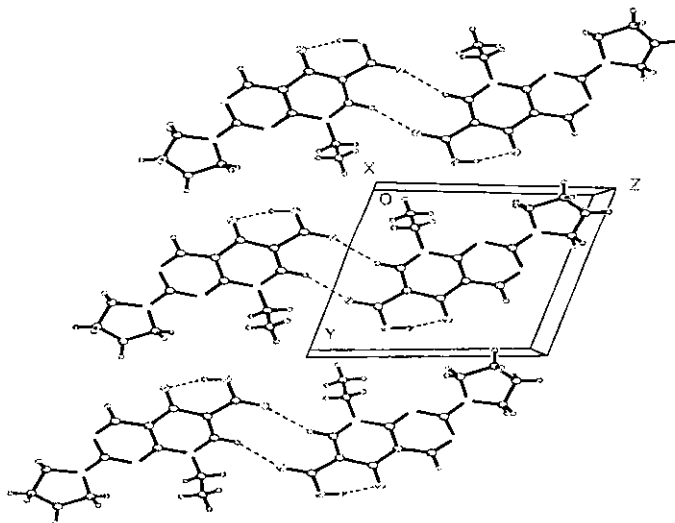


Figura 15. Contenido molecular de la celda unitaria de ácido piromídico

La molécula presenta un núcleo de piridopirimidona formado por dos anillos **a** y **b** con tres sustituyentes: un grupo carboxílico en C(6), un grupo etilo en N(8) y un grupo pirrolidinil en C(2) (**Figura 16**). Sus longitudes y ángulos de enlace de la molécula se encuentran dentro de los valores descritos en la literatura (**Tabla 7A**, Apéndice).

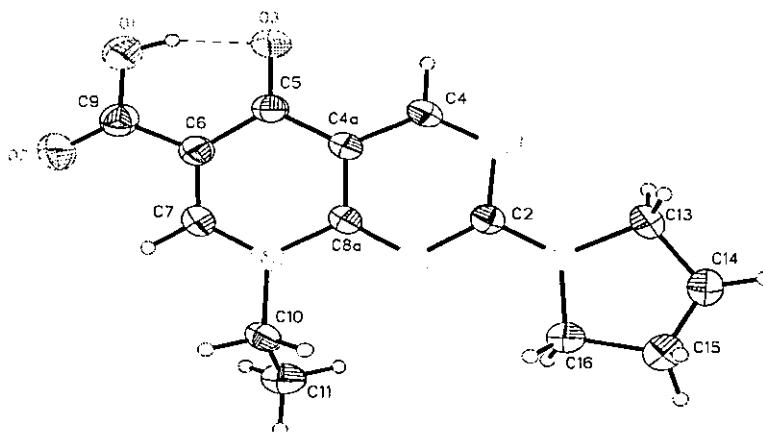


Figura 16. Estructura de ácido piromídico

La conformación de los sustituyentes se determinó por medio del ángulo dihedro calculado entre los planos **1**, **2**, **3** y **4** que definen a la molécula tomando como referencia al plano **1** que contiene el núcleo de la molécula (**Figura 16a** y **Tabla 10**).

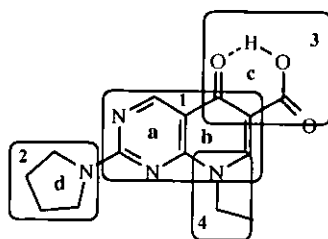


Figura 16a

Tabla 10. Ángulos dihedros (°) calculado entre los diferentes planos de la molécula del ác. piromídico

Planos	ángulo
Piridopirimidona(1)-anillo pirrolidinil(2)	6.6 (1)
Piridopirimidona(1)-grupo etilo(4)	87.5 (5)
Piridopirimidona(1)-grupo carboxílico(3)	1.1 (8)

Los grupos pirrolodinil y carboxílico son coplanares al núcleo de la molécula, mientras que el grupo etilo adquiere una posición perpendicular al núcleo, semejante a la observada en el ácido nalidíxico (Achari y Neidle, 1976; Huber *et al.*, 1980), del ácido pipemídico (Fonseca, 1986), ácido aminooxolínico (Czugler *et al.*, 1976), ácido oxolínico (Cygler y Huber, 1985), norfloxacin (Wallis *et al.*, 1994) y peflacina (Toffoli *et al.*, 1987).

Los anillos **a**, **b**, y **c** en la molécula son planos y coplanares entre sí. Sin embargo, los átomos del anillo **d** desvían significativamente del plano confiriéndole una conformación de sobre, que se determinó con base en sus parámetros de conformación: $q_2 = 0.3508 (3)$ y $\phi = -86.55 (5)^\circ$ (Cremer y Pople, 1975).

La orientación del grupo etilo y del anillo pirrolidinil en la molécula se determinó por medio del ángulo de torsión calculado entre cuatro átomos (A-B-C-D). El grupo etilo presenta un ángulo de $92.9(4)^\circ$ entre C(7)-N(8)-C(10)-C(11) semejante al del ácido nalidíxico (Achari y Neidle, 1976; Huber *et al.*, 1980) y de la rosoxacina, el valor muestra que el grupo etilo se encuentra ligeramente orientado hacia el grupo carboxílico. El ángulo de torsión entre los átomos N(3)-C(2)-N(12)-C(13) del anillo de pirrolidinil es de $-1.38 (3)$ lo cual indica que este anillo se encuentra coplanar al núcleo.

6.3 Cocrystalización de quinolona-nucleósido y quinolona-nucleótido.

Este tipo de estudio se realizó debido a que se consideró que la cristalización permitiría crecer cristales de complejos quinolona-nucleósido y quinolona-nucleótido, que se formarían por medio de alguna de las interacciones no-covalentes y débiles como por ejemplo: de tipo iónico (electrostática), ión-dipolo, dipolo-dipolo, enlace por puente de hidrógeno, por transferencia de carga, hidrofóbicas o de van der Waals, que se proponen en algunos modelos de formación fármaco-receptor y a las observadas en complejos cristalinos formados mediante esta técnica (Jancarik y Kim, 1991). Sin embargo, de las 360 pruebas realizadas no se obtuvieron cristales

de los complejos esperados en las condiciones descritas, en su lugar crecieron cristales transparentes y estables de diferente tamaño a temperatura ambiente en el intervalo de pH de 4 a 8, siendo óptimos en pH de 7 y 8 en los tres agentes precipitantes (**Tabla 11**).

Tabla 11. Condiciones en las que se obtuvieron cristales, por medio de gota colgante

Prueba	pH	Agente precipitante
NAL-citidina	7 y 8	PEG 6K
	6, 7 y 8	MPD
	7 y 8	(NH ₄) ₂ SO ₄
NAL-guonosina	7 y 8	PEG 6K
	6	MPD
	7 y 8	(NH ₄) ₂ SO ₄
NAL-timidina	7 y 8	MPD
NAL-adenosina	7 y 8	PEG 6K
	7	MPD
	7 y 8	(NH ₄) ₂ SO ₄
NAL-citidilato	8	PEG 6K
	7	MPD
	7 y 8	(NH ₄) ₂ SO ₄

Se determinaron los patrones de difracción de los cristales obtenidos por medio de la técnica de difracción de rayos X, los cuales se emplearon para establecer sus parámetros de celda que resultaron ser idénticos a los del ácido nalidíxico.

6.4 Complejos quinolona-metal

La preparación de los complejos fue rápida y sencilla mediante reacciones ácido-base con un rendimiento cuantitativo, que no requirieron de procedimientos complejos o de condiciones drásticas. Doce complejos se obtuvieron en forma de polvos blancos cristalinos insolubles en cloroformo, diclorometano y agua, pero solubles en mezclas de metanol-agua y metanol-etanol-agua.

De las pruebas de cristalización por evaporación lenta de disolvente, únicamente cristalizó el complejo NAL-Ca²⁺ (nalidixato de calcio: bis[1,4-dihidro-1-etil-7-metil-4-oxo-3-carboxilato-1,8-naftiridina] de calcio trihidratado) como cristales transparentes y bien formados. Fuera del disolvente tienden a decaer rápidamente convirtiéndose en polvo blanco. Los otros complejos

metálicos precipitaron y tal vez para su recristalización sea necesario adicionar un tercer disolvente que disminuya la velocidad de evaporación del alcohol y modifique a la vez las propiedades de la mezcla. Con estos complejos ya no se empleó otro método de cristalización. De los 36 complejos preparados por el método en gel únicamente cristalizó el complejo Nor-Mn²⁺ (norfloxacinato de manganeso: bis[1,4-dihidro-1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-carboxilato quinolona] de manganeso dihidratado). Los cristales crecieron en una semana a temperatura ambiente, son cúbicos bien formados y de color amarillo. Tienen la desventaja de decaer rápidamente fuera del gel, pero permanecen estables durante dos días en agua destilada. El mecanismo por el cual creció el cristal se desconoce, pero se considera que se formó por los gradientes de concentración del complejo en el gel, que evitan la nucleación inmediata y precipitación del complejo como material amorfo. Los antibióticos NAL, PIR, ROS, CIP y OFLO en estas condiciones reaccionaron con los metales Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ y Mn²⁺ obteniéndose sus complejos respectivos, sin embargo, precipitaron en el gel, lo cual puede deberse al tipo de polímero empleado, al tamaño de la columna del gel, a la concentración ó a la rapidez con que se efectuó la reacción ácido-base en el gel.

De las reacciones ácido-base en el gel, los complejos quinolona-Cu²⁺ y quinolona-Fe³⁺ no cristalizaron ni precipitaron, los geles se mantuvieron transparentes. La formación del complejo se detectó mediante el cambio del color azul del sulfato de cobre a verde y el amarillo del Fe³⁺ a rojo, que indican la formación de los complejos metálicos pero son solubles en medio acuoso. Las pruebas se realizaron con sus respectivos blancos, es decir se adicionaron sales metálicas y quinolonas a geles por separado y no se observó formación de precipitados o cambios de color.

6.5 Determinación de las estructuras por difracción de rayos X en el estado sólido cristalino de los complejos quinolona-metal.

a) Nalidixato de calcio:

Este compuesto es el primer homocomplejo metálico de quinolona que presenta calcio y que se determina en el estado sólido cristalino.

Los estudios de difracción de rayos X del cristal indican que existen dos moléculas independientes por unidad asimétrica, debido a la simetría $\bar{1}$, el número de moléculas en la celda unitaria es de cuatro y sus datos, así como, las condiciones experimentales y el programa empleado para resolver y refinar la estructura se presentan en la **Tabla 8A**, (Apéndice).

La molécula del complejo consiste de un catión de Ca^{2+} , dos aniones nalidixato y dos moléculas de agua (**Figura 17**), sus coordenadas atómicas y factores de temperatura equivalente isotrópico se presentan en la **Tabla 9A** (Apéndice).

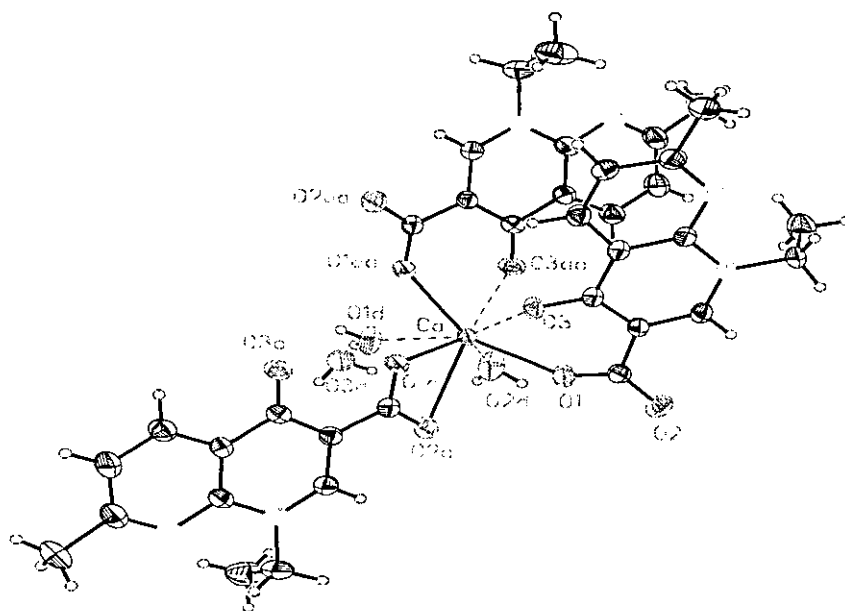


Figura 17. Estructura de nalidixato de calcio

El catión Ca^{2+} en el cristal presenta una coordinación de ocho, un radio iónico de 1.26 y una geometría cúbica distorsionada. Se encuentra unido a ocho átomos de oxígeno, de los cuales, cuatro corresponden a dos ligantes nalidixato, dos a los oxígenos de las moléculas de agua y para completar el número de coordinación de ocho se une a otra molécula de nalidixato generada por simetría. Los átomos de oxígeno se coordinan al calcio con diferente longitud de enlace observándose cuatro fuertemente coordinados y dos débilmente coordinados (**Tabla 10A**):

Ca-O(1)..... 2.354 (2) Å corresponde al oxígeno del carboxilato $-\text{COO}^-$ (molécula 1)

Ca-O(1a).... 2.423 (2) Å corresponde al oxígeno del carboxilato $-\text{COO}^-$ (molécula 2)

Ca-O(1aa)... 2.413 (2) Å corresponde al oxígeno del carboxilato $-\text{COO}^-$ (molécula 3)

Ca-O(3aa)... 2.345 (2) Å corresponde al oxígeno del carbonilo $\text{C}=\text{O}$ en el C(4) (molécula 3)

De estas longitudes Ca-O se puede apreciar que la coordinación principal de los ligantes se realiza por medio de los aniones carboxilato los cuales contienen la mayor densidad electrónica para formar dichos enlaces. La distancia Ca-O (3aa) es corta y se debe a que el oxígeno es de un carbonilo y a la distancia y orientación del ligante que lo dona.

Los dos oxígenos débilmente coordinados son :

Ca-O(3) 2.470 (2) Å corresponde al oxígeno del $\text{C}=\text{O}$ en el C(4) (molécula 1)

Ca-O(2a) 2.749 (3) Å corresponde al oxígeno del $\text{C}=\text{O}$ del COO^- (molécula 2)

Las diferencias en las distancias de enlace se atribuyen a que una molécula nalidixato se esta coordinando al Ca^{2+} por medio de dos oxígenos que pertenecen a dos grupos funcionales con diferente ambiente químico en el cristal. Las longitudes de enlace Ca-O en las moléculas de agua de coordinación también son diferentes, sin embargo, se encuentran en el intervalo de distancias de 2 a 3 Å establecido para compuestos con calcio hidratado (Einspahr y Bugg, 1980).

Ca-O(1W) 2.412 (3) Å

Ca-O(2W) 2.494 (3) Å

Las longitudes y ángulos de enlace de los dos ligantes nalidixato en el complejo, son semejantes a los descritos para el ácido nalidíxico (Achari y Neidle, 1976; Huber, 1980).

Los dos ligantes en el complejo se unen de forma diferente al calcio: **a**) uno de ellos en forma bidentada, vía un anillo de cuatro átomos en donde el ión carboxilato utiliza ambos oxígenos para quelar al calcio y el otro **b**) en forma β vía un anillo de seis átomos, utilizando el oxígeno del grupo ceto y un oxígeno del grupo carboxilato (**Figura 17a**). Así mismo, el ligante generado por simetría presenta el tipo de unión β.

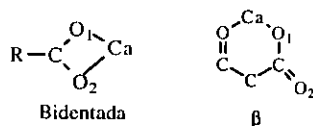


Figura 17a. Formas de unión del carboxilato en el complejo de nalidixato de calcio

La orientación y conformación de cada ligante en el complejo se determinó calculando los ángulos dihedros entre los planos **1, 2, 3, 4, 5** y **6** que involucran a los dos ligantes de la molécula, el tercer ligando es idéntico a uno de ellos debido a que se generó por simetría, (**Figura 17b** y **Tabla 12**).

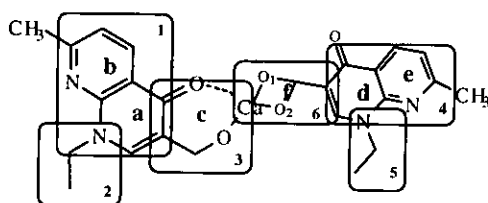


Figura 17b

Los ángulos dihedros entre los planos **1, 2 y 4,5** de cada ligante indican que los grupos etilos en el complejo se encuentran perpendiculares a los núcleos de naftiridona respectivamente, en una conformación β , observándose una diferencia de 2° entre los planos **2 y 5**. Los ángulos dihedro entre los planos **1,4, 1,3 y 6,4** muestran que los núcleos de los ligantes en la molécula tienen diferente orientación y los grupos carboxilato en el complejo ya no se encuentran coplanares a los núcleos de naftiridona como en la molécula del ácido nalidíxico, debido a que el O(1) al girar y coordinarse con el calcio desvía de la planaridad (**Tabla 12**).

Tabla 12. Ángulos dihedros ($^\circ$) calculado entre los diferentes planos de la molécula de $(NAL^-)_2Ca^{2+}$

Planos	ángulo
naftiridina(1)-grupo etilo(2)	85.38 (3)
naftiridina(4)-grupo etilo(5)	87.15(1)
Naftiridina(1)-naftiridina(2)	22.93(2)
Naftiridina(1)-Ca-O(1)-C(11)-C(3)-C(4)-O(3)	31.69 (2)
naftiridina (4)-C(3)-C(11)-O(1a)-Ca-O(6)	19.46(3)

Los átomos en los planos **1 y 4** son co-planares. Sin embargo, los átomos del anillo **c** desvían significativamente del plano confiriéndole una conformación de “sobre” que se determinó con base en sus parámetros de conformación: $q_2 = 0.5387 (5)$, $q_3 = 0.1800 (5)$, $\phi = -25.33(6)$, $Q = 0.5680 (5)$, $\theta = 71.52 (6)$, (Cremer y Pople, 1975).

La orientación de los grupo etilo y carboxilato en los ligantes se determinó por medio del ángulo de torsión entre cuatro átomos (A-B-C-D), (**Tabla 13**). Indicando que los etilos se encuentran ligeramente orientados hacia el grupo carboxílico.

Tabla 13. Algunos ángulos de torsión ($^\circ$) del $(NAL^-)_2Ca^{2+}$

Átomos	ángulo
C(2)-N(1)-C(12)-C(13)	94.37 (3)
C(2a)-N(1a)-C(12a)-C(13a)	-91.80 (3)
C(4)-C(3)-C(11)-O(1)	30.4(3)
C(4a)-C(3a)-C(11a)-O(1a)	5.4(3)

El ángulo de torsión entre los átomos C(4)-C(3)-C(11)-O(1) determina que el O(1) del grupo carboxilato en el ligante unido en forma β se encuentra a 30.4° fuera del plano (anillo c) y el O(1a) presenta una ligera desviación del plano de 5.4° debido a su coordinación bidentada.

Cada molécula del complejo en el cristal se coordina a un segundo átomo de calcio al compartir los O(1) de los carboxilatos de dos ligantes. Es decir dos calcio coordinan entre sí cuatro moléculas del anión nalidixato (**Figura 18**). La coordinación compartida de los carboxilatos de los dímeros es por medio de una unión puente entre cuatro átomos Ca-O-Ca-O formando un anillo plano que genera una estructura dimérica. La distancia Ca...Ca en el anillo es de $3.967(1)\text{\AA}$.

Los dímeros en el cristal se mantienen principalmente unidos por medio de las dos moléculas de agua coordinadas al calcio y una tercer molécula de agua no coordinada al metal por medio de interacciones O(W)-H...O y cuatro interacciones C-H...O y C-H...N con distancias de contacto menores a 3.4\AA (**Figura 18, 19 Tabla 11A y 11B, Apéndice**).

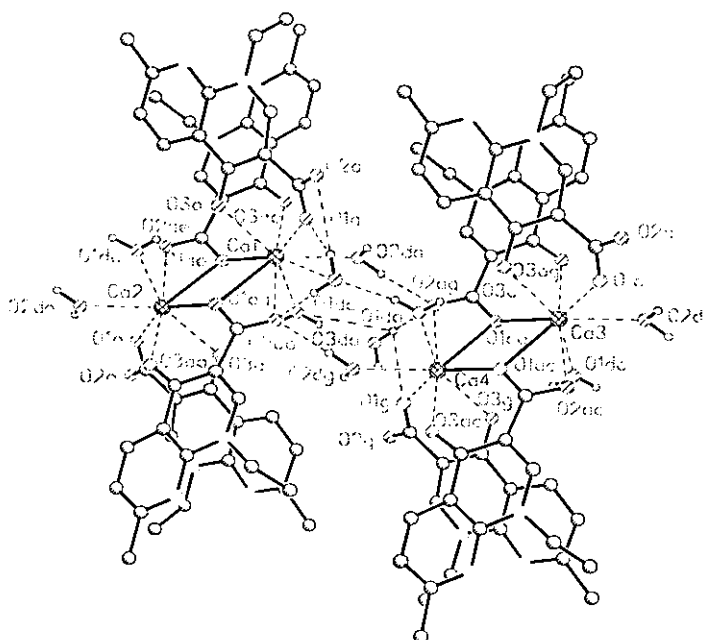


Figura 18. Estructura de los dímeros de nalidixato de calcio

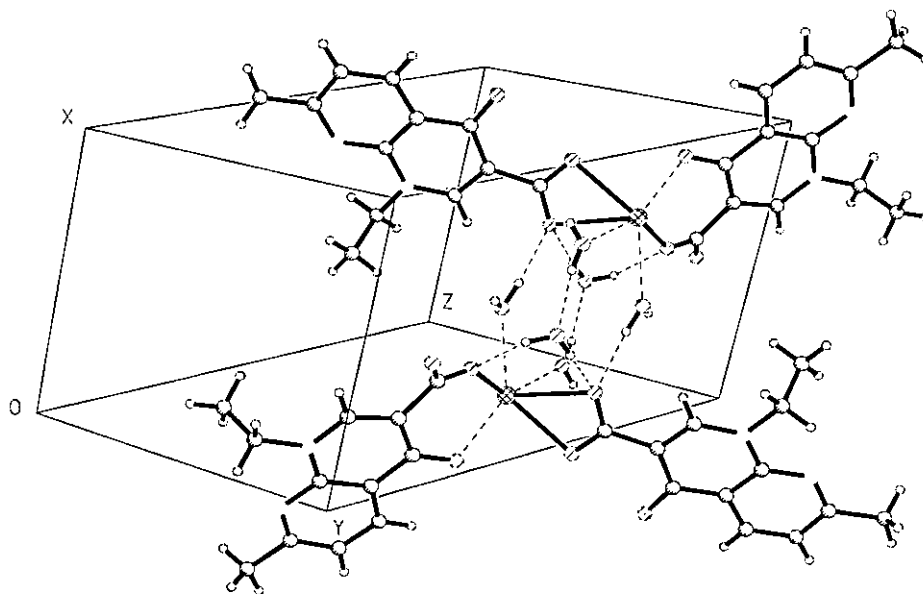


Figura 19. Contenido molecular de la celda unitaria

b) Norfloxacinato de manganeso

Las impurezas del hidrogel impidieron el crecimiento de cristales adecuados para la difracción de rayos X, debido a que ciertas impurezas se quedaron atrapadas en ellos y que no se lograron determinar. Las impurezas y la pérdida de disolvente durante la captura de datos del cristal hicieron que se resolviera la estructura hasta un valor de R del 16 %, por lo cual ya no se realizó un análisis conformacional. La solución de la estructura indicó un sistema cristalino monoclinico con un grupo espacial $C 2/c$, observándose cuatro moléculas por celda unitaria (Tabla 12A). Este compuesto es el primer homocomplejo metálico de una quinolona que presenta manganeso divalente y que se determina por difracción de rayos X en el estado sólido cristalino.

Los datos del cristal, las condiciones experimentales y el programa empleado para resolver y refinar la estructura se presentan en la **Tabla 12A** (Apéndice). Las coordenadas atómicas y los factores de temperatura isotrópico equivalente se presentan en la **Tabla 13A** (Apéndice).

En la **Figura 20**, se puede apreciar que el complejo presenta un átomo de manganeso con carga +2, un número de coordinación de seis y que se encuentra unido a dos ligantes de norfloxacinato y dos moléculas de agua.

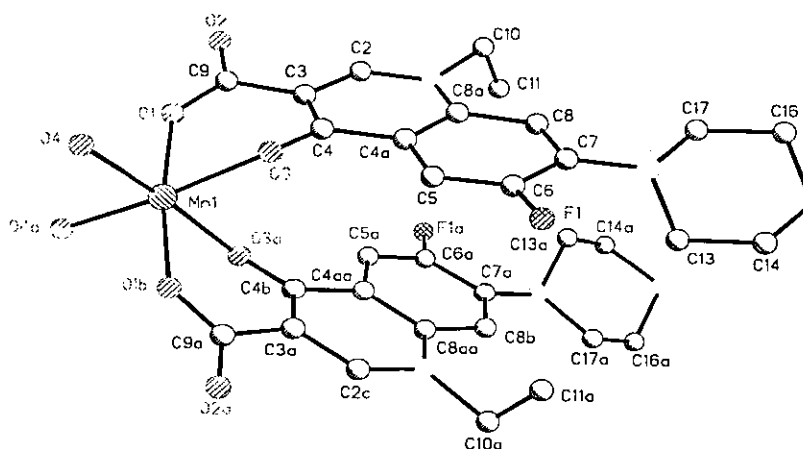


Figura 20. Estructura del norfloxacinato de manganeso

Los dos ligantes en el complejo se unen idénticamente al metal, en una forma β por medio del oxígeno O(1) del grupo carboxilato y el oxígeno O(3) del grupo ceto formando anillos de seis miembros con una conformación aparente de sofá debido a que el manganeso sale del plano del anillo.

Los anillos de piperazinilo en ambos ligantes presentan una conformación de silla y los grupos etilo se encuentran perpendiculares a los núcleos de cada ligando igual que en la molécula de la norfloxacin. Los ligantes en el complejo se encuentran cercanos debido a la coordinación y

a la unión β de los ligantes en el complejo. Sus longitudes de enlace y ángulos de enlace se presentan en la **Tabla 14A** (Apéndice).

Químicamente, la acidez del hidrógeno del ácido carboxílico en las quinolonas se ve escasamente influenciada por los efectos resonantes e inductivos, comprobándose con la obtención de los diferentes complejos que desafortunadamente no cristalizaron para su identificación estructural por difracción de rayos X.

6.6 Determinación de la reactividad química de las quinolonas con bacterias y biomoléculas

a) Sensibilidad de las bacterias a las quinolonas

Las biomasas empleadas en microscopía electrónica, en la cuantificación de proteínas y DNA se estandarizaron a una población promedio de 10^{24} CFU/ml (unidades formadoras de colonias), que se desarrolló en un período de incubación de ocho horas. El tiempo de incubación para obtener a la biomasa se eligió por considerar varios factores tales como, la cuenta de viables, los posibles errores experimentales durante la manipulación de los cultivos, la presencia de sustancias metabólicas y el envejecimiento de las células en el cultivo, entre otros.

La concentración bactericida (CB) de cada quinolona y del EDTA sobre la biomasa de *E. coli* se presenta en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Concentración bactericida de las quinolonas sobre *E. coli* 10536

Antibiótico	CB μg/ml
OFLO	1000
NAL	1000
CIP	250
NOR	250
PIR	500
ROS	750
EDTA (control)	1000

NAL = ácido nalidíxico, OFLO = ofloxacin, CIP = ciprofloxacina, EDTA = ácido etilendiamino tetraacético, ROS = rosoxacina, PIR = ácido piromídico, NOR = norfloxacina.

La CB se definió como la concentración necesaria de cada compuesto para producir en el menor tiempo posible la muerte de toda la población bacteriana.

En la **Tabla 15**, se muestra el efecto bactericida de cada uno de los compuestos probados sobre la biomasa.

Tabla 15 . Efecto de las quinolonas y del EDTA sobre la viabilidad de la biomasa

Antibióticos	Dosis µg/ml	Viabilidad celular ¹					%I ³
		t ₀	t ₂	t ₄	t ₆	ABC ²	
BIANCO		24.6	27.8	29.8	30.9	106.3*	
EDTA	500	±0.014	±0.036	±0.213	±0.110	±0.330	
		24.1	12.7	7.1	5.8	37.5*	64.7
	750	±0.018	±0.038	±0.057	±0.066	±0.142	
		24.1	11.9	6.8	5.4	35.6*	66.5
	1000	±0.018	±0.109	±0.010	±0.067	±0.205	
	24.1	11.6	6.4	5.4	34.9*	67.1	
NAL	1250	±0.018	±0.007	±0.034	±0.008	±0.079	
		24.1	11.5	6.3	5.2	34.5*	67.5
	500	±0.018	±0.002	±0.001	±0.005	±0.040	
		24.6	13.1	5.5	4.3	35.0*	64.7
	750	±0.017	±0.025	±0.054	±0.078	±0.108	
24.6		12.3	6.3	4.7	35.1*	67.0	
PIR	1000	±0.017	±0.0838	±0.035	±0.086	±0.027	
		24.6	12.6	5.4	0	28.4*	73.1
	1250	±0.017	±0.030	±0.057		0.003	
		24.6	11.6	5.4	0	27.3*	74.3
		±0.017	±0.070	±0.048		0.055	
ROS	100	24.6	12.6	9.0	8.0	41.0*	61.4
		±0.038	±0.043	±0.014	±0.031	±0.097	
	150	24.6	12.5	7.8	7.6	40.3*	62.1
		±0.038	±0.035	±0.056	±0.024	±0.009	
	250	24.6	12.4	7.2	6.6	38.3*	64.0
±0.038		±0.148	±0.110	±0.007	±0.248		
NOR	350	24.6	11.5	7.7	6.8	37.7*	64.5
		±0.038	±0.014	±0.063	±0.010	±0.062	
	500	24.6	11.3	6.9	5.3	34.9*	67.1
		±0.038	±0.007	±0.026	±0.006	±0.006	
	100	24.2	12.3	7.1	5.7	36.7*	65.5
±0.059		±0.007	±0.0006	±0.003	±0.0255		
NOR	250	24.2	11.4	6.2	5.7	35.0*	67.1
		±0.059	±0.004	±0.036	±0.030	±0.002	
	350	24.2	11.4	6.1	5.3	34.4*	67.6
		±0.059	±0.008	±0.005	±0.001	±0.033	
	500	24.2	10.8	5.6	5.3	33.2*	68.7
±0.059		±0.002	±0.079	±0.002	±0.033		
NOR	750	24.2	10.0	6.6	4.5	31.8*	70.1
		±0.059	±0.029	±0.006	±0.006	±0.315	
	1000	24.2	10.0	6.4	4.7	31.9*	70.0
		±0.059	±0.009	±0.013	±0.009	±0.011	
	100	24.6	11.8	7.4	6.6	37.7*	64.5
±0.018		±0.071	±0.073	±0.002	±0.140		

CIP	250	24.6 ± 0.018	11.3 ± 0.004	5.5 ± 0.033	4.2 ± 0.013	32.5* ± 0.009	69.5	
	350	24.6 ± 0.018	11.4 ± 0.007	4.0 ± 0.104	3.7 ± 0.448	31.0* ± 0.664	70.8	
	500	24.1 ± 0.018	7.3 ± 0.008	4.3 ± 0.004	4.3 ± 0.004	26.6* ± 0.003	75.0	
	100	24.6 ± 0.006	11.7 ± 0.045	7.4 ± 0.013	6.4 0.0520	37.3* ± 0.001	65.0	
	250	24.6 ± 0.006	10.2 ± 0.024	5.0 ± 0.005	0	25.1* ± 0.033	76.4	
	350	24.6 ± 0.006	7.5 ± 0.031	5.0 ± 0.008	0	21.6* ± 0.049	79.7	
	500	24.6 ± 0.006	8.0 ± 0.008	4.0 ± 0.001	0	21.5* ± 0.013	79.8	
	OFLO	500	24.7 ± 0.077	11.8 ± 0.029	8.1 ± 0.071	4.5 ± 0.064	35.3* ± 0.027	66.8
		750	24.7 ± 0.077	11.2 ± 0.006	8.5 ± 0.005	4.1 ± 0.060	34.3* ± 0.067	67.6
		1000	24.7 ± 0.077	11.3 ± 0.0	8.3 ± 0.005	0	28.8* ± 0.022	73.0
		1250	24.7 ± 0.077	10.1 ± 0.109	8.6 ± 0.043	0	27.4* ± 0.143	74.2

¹No. de células viables en log₁₀

²ABC = área bajo la curva

³% de inhibición de la viabilidad celular en 6 horas

t₀= tiempo cero de incubación, t₂= 2 h de incubación, t₄= 4 h de incubación, t₆= 6 h de incubación.

* p < 0.05

Cada valor presenta su error estándar.

Se realizaron cursos temporales (No. de células viables con respecto al tiempo) con los datos de viabilidad, a los cuales se les determinó el área bajo la curva (ABC) por medio de la regla de Simpson (Tallarida, 1981).

Se realizó un análisis de varianza a los cursos temporales de una vía y la prueba de Dunnett's (Tallarida, 1981) para comparar cada quinolona con el control (EDTA).

Los porcentajes de inhibición se obtuvieron para cada grupo, por medio de la siguiente relación:

$$\%I = [ABC_{\text{control}} - ABC_{\text{tratamiento}}] \times 100 / ABC_{\text{control}}$$

Con el trazó del % de inhibición contra la CB de las quinolonas y EDTA se comparó la efectividad máxima de cada uno de ellos, **Figura 22**. La efectividad máxima presentó el siguiente orden decreciente: CIP>NAL>OFLO>ROS>NOR>PIR>>EDTA

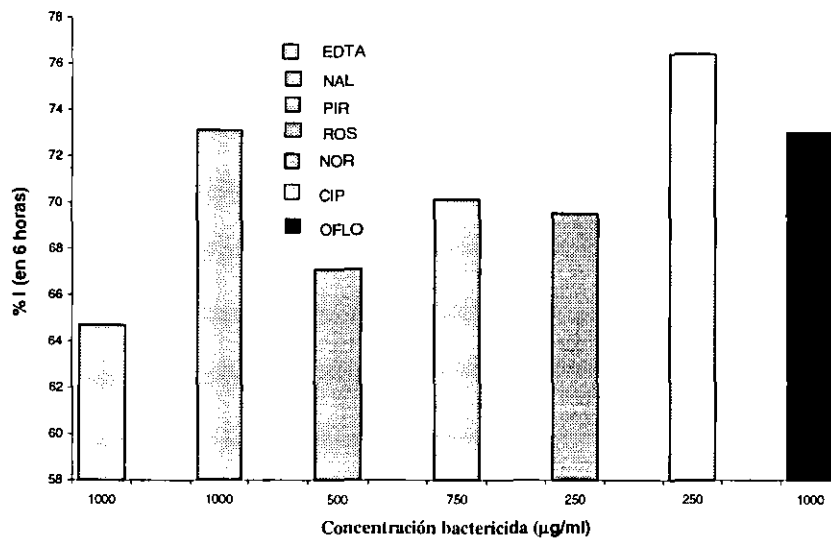


Figura 21. Efectividad máxima de las quinolonas en cultivos de *E. coli* 10536

El EDTA, presentó actividad bactericida *in vitro* a concentraciones semejantes de OFLO Y NAL.

b) Comprobación de las lesiones de la pared celular mediante microscopía electrónica

El daño producido por cada quinolona sobre la integridad de la pared celular de las bacterias se produjo con diferente intensidad (**Figuras 22-27**). Para valorar la intensidad de las lesiones producidas por las quinolonas sobre la pared celular se emplearon un blanco y un control de células (**Figura 28 y 29**). Las **Figura 22, 23 y 24** muestran las células sensibilizadas con ácido nalidíxico, rosoxacina y ácido piromídico, respectivamente. En ellas se aprecia que las células carecen por completo de membrana externa. En la **Figura 25**, las células sensibilizadas con norfloxacin presentan la membrana externa desgarrada conservando el espacio periplasmático entre la membrana externa y la membrana interna. En la **Figura 26**, las lesiones sobre la pared son menos intensa que en las anteriores quinolonas, observándose rupturas localizadas en la pared semejantes a las producidas por el EDTA (control). En la

Figura 27, las células tratadas con ofloxacina carecen por completo de membrana externa, presentan rasgaduras localizadas de la membrana citoplasmática y además se observan unos cuerpos negros en el interior de las células los cuales no se observan en las otras células.



Figura 22. Células tratadas con ác. nalidíxico, observadas a 30000x



Figura 23. Células tratadas con rosoxacina observadas a 32500x



Figura 24. Células tratadas con ácido piromídico, observadas a 32500x



Figura 25. Células tratadas con norfloxacina, observadas a 30000x



Figura 26. Células tratadas con ciprofloxacina observadas a 37500x

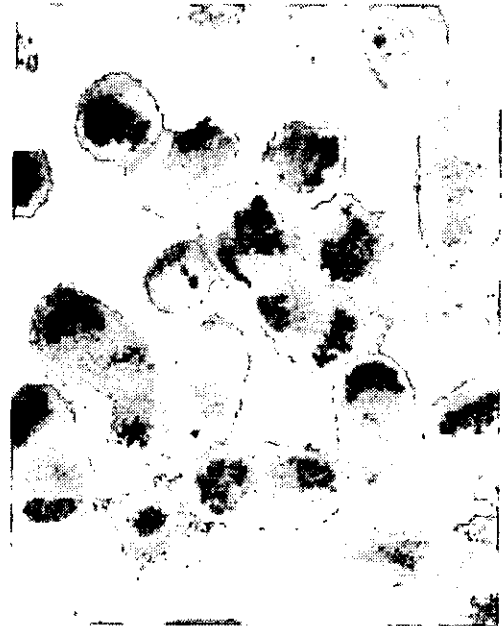


Figura 27. Células tratadas con ofloxacin observadas a 37500x



Figura 28. Células normales de *E. coli* 10536, observadas a 32500x (Blanco)



Figura 29. Células de *E. coli* 10536 tratadas con EDTA, observadas a 35000x (Control)

c) Comprobación de la sensibilización de la pared celular mediante la cuantificación de proteínas y DNA

Proteínas:

Los miligramos de proteína total aislados de cada biomasa tratada con quinolonas se muestran en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Proteínas aisladas de biomasas de *E. coli* 10536 tratadas con quinolonas.

Tratamiento	Proteínas totales	
	mg	%
^a Blanco	13.63	100
^b Control	16.33	120
OFLO	12.16	89
NAL	15.22	112
CIP	15.27	112
PIR	16.93	124
EDTA (CB)	18.97	139
NOR	20.08	147
ROS	25.81	189

^a Células no tratadas

^b Células con tratamiento enzimático

NAL = ácido nalidíxico, OFLO = ofloxacina, CIP = ciprofloxacina,

EDTA = ácido etilén diamino tetraacético, ROS = rosoxacina,

PIR = ácido piromídico, NOR = norfloxacina

CB = concentración bactericida

La cantidad de proteína aislada de cada biomasa fue diferente. Para establecer los porcentajes de esta biomolécula se consideró como el 100 %, la proteína extraída de las células no tratadas (Blanco).

El tratamiento de sensibilización de la pared celular, que normalmente se aplica para romper bacterias gram-negativas, permitió aislar un 20 % más de proteína, que de las células no sensibilizadas. También se observó, que a la concentración bactericida del EDTA se obtiene un 19 % más de proteína que con el tratamiento normal de EDTA (control), lo cual nos indica que no es necesario emplear un amortiguador y SDS para el aislamiento total de proteínas. Este resultado puede implicar que el EDTA neutralizó algunas metaloproteínas.

En la **Tabla 17**, se puede apreciar y comparar las concentraciones de EDTA empleadas en un aislamiento normal de proteína (control) contra las concentraciones empleadas de quinolonas, sin la adición de EDTA u otro aditivo.

Tabla 17. Concentraciones aplicadas de los antibióticos a la biomasa de *E. coli* 10536

Tratamiento	Concentración Molar ^a
BLANCO	-
CONTROL:	
Ruptura:	
EDTA	1 mM
Tris-HCl	50 mM
SDS	0.1%
NAL	1.968 mM
OFLO	1.389 mM
CIP	0.379 mM
EDTA	1.343 mM
ROS	1.187 mM
PIR	0.806 mM
NOR	0.391 mM

^aConcentración bactericida expresada en moles
 NAL = ácido nalidíxico, OFLO = ofloxacina, CIP = ciprofloxacina
 EDTA = ácido etilen diamino tetraacético, ROS = rosoxicina,
 PIR = ácido piromídico, NOR = norfloxacina.

La sensibilización de las células con cinco quinolonas tales como, PIR, NOR, ROS, NAL y CIP, permitieron extraer entre un 20 % y 12 % más de proteína con respecto al blanco, pero no así con OFLO.

La precipitación de las proteínas con los diferentes porcentajes de sulfato de amonio, en este trabajo no era necesario hacerla, pero permitió comparar cada fracción de cada extracto y establecer la existencia de diferencias entre cada tratamiento **Figura 30**. La mayor cantidad de proteínas aislada de los extractos se obtuvo con un 60 y 80% de saturación de sulfato amonio. Para nuestros fines comparativos, únicamente era necesario realizar una precipitación del 100% con sulfato de amonio de cada extracto. Por esta razón, se sumaron los miligramos de proteína aislados de cada biomasa con cada porcentaje de sulfato de amonio, obteniendo así la cantidad relativa de proteínas totales (**Tabla 16**).

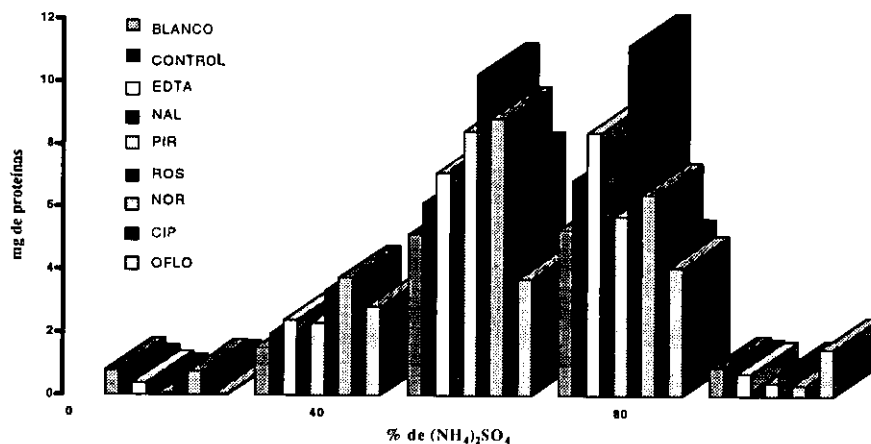


Figura 30 . Comparación de los mg de proteínas de *E. coli* 10536 extraídos por "salting out"

DNA:

El rendimiento en μg de DNA extraído de las biomásas tratadas se presentan en la **Tabla 18**.

Tabla 18. DNA aislado de la biomasa de *E. coli* 10536 tratadas con quinolonas.

Tratamiento	DNA	
	μg	%
Blanco	0.005	0.003
Control	155	100
OFLO	110	71
NAL	143	92
EDTA (CB)	150	97
CIP	156	101
NOR	159	103
PIR	165	106
ROS	180	116

^a Células no tratadas

^b Células con tratamiento enzimático

NAL = ácido nalidíxico, OFLO = ofloxacina, CIP = ciprofloxacina,

EDTA = ácido etileno diamino tetraacético, ROS = rosoxacina,

PIR = ácido pirimidico, NOR = norfloxacina, CB = concentración bactericida.

El DNA obtenido de las células sensibilizadas en condiciones normales de extracción (control) se consideró como el 100% de rendimiento, para poder compararlo con los otros tratamientos. De las células no tratadas (blanco) no se aisló DNA (0 %), lo cual se debió a la hidrólisis del DNA por las nucleasas que son activadas por los cationes divalentes como es el magnesio, al

no usar EDTA para secuestrarlo se activaron estas enzimas y lo degradaron. El empleo de una concentración bactericida (CB) de EDTA no fue suficiente para extraer el DNA. En la **Tabla 19**, se puede comparar la cantidad de EDTA que se aplicó a la biomasa control con la biomasa que se le aplicó una CB del mismo. Al comparar los μg de DNA obtenidos con ambos tratamientos, se considera que las nucleasas de una población de bacterias de 10^{24} CFU/ml, se deben inhibir con una concentración ligeramente superior a 1.34 mM (CB).

Tabla 19. Concentraciones aplicadas de los antibióticos a la biomasa de *E. coli* 10536

Tratamiento	Concentración Molar ^a
BLANCO CONTROL:	-
Ruptura:	
EDTA	1 mM
Tris-HCl	50 mM
SDS	0.1%
Extracción:	
EDTA ^b	20 mM
EDTA ^c	1 mM
NAL	1.968 mM
OFLO	1.389 mM
CIP	0.379 mM
EDTA	1.343 mM
ROS	1.187 mM
PIR	0.806 mM
NOR	0.391 mM

^aConcentración bactericida expresada en moles

^bAmortiguador CTABX

^cAmortiguador TE

NAL = ácido nalidíxico, OFLO = ofloxacina, CIP = ciprofloxacina

EDTA = ácido etilén diamino tetraacético, ROS = rosoxacina,

PIR = ácido piromídico, NOR = norfloxacina.

La cantidad extraída de DNA de las biomasas tratadas con CIP, NOR y PIR varió ligeramente con respecto al control, **Tabla 18**. Pero con OFLO y NAL se aisló un 29 % y un 8 % menos que las células control.

d) Determinación de la capacidad inhibitoria de las quinolonas sobre la actividad de proteínas dependientes de metales y diferentes a las topoisomerasas

Carboxipeptidasa A

La cinética de la hidrólisis del HPLA fue lineal y después de determinarla, se procedió a medir la inhibición de la actividad enzimática por las quinolonas bajo las mismas condiciones, adicionando la enzima como último componente. Las pruebas de inhibición se realizaron con concentraciones muy pequeñas de quinolonas, ya que el empleo de concentraciones mayores impidió la determinación, debido a que las quinolonas tienden a insolubilizarse en la solución amortiguadora de fosfatos a causa del desplazamiento del equilibrio ácido-base hacia la forma ácida que es insoluble en un medio acuoso. Para comparar el efecto inhibitorio de las quinolonas se empleó como referencia el EDTA a la misma concentración. Los resultados se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Efecto inhibitorio de las quinolonas sobre la actividad enzimática de la Carboxipeptidasa A¹.

Inhibidor	(%) ²
NAL	100
PIR	100
ROS	100
NOR	100
CIP	30.93
OFLO	100
EDTA	56.52

¹Enzima de páncreas bovino dependiente de Zn²⁺

² Por ciento de inhibición

Fosfatasa alcalina

La cinética de hidrólisis del 4-nitrofenilfosfato por la fosfatasa alcalina fue lineal. Como inhibidor de referencia se empleó el EDTA a la misma concentración que las quinolonas, los resultados se presentan en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Efecto inhibitorio de las quinolonas sobre la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina¹.

Inhibidor	(%) ²
NAL	100
PIR	100
ROS	100
NOR	100
CIP	100
OFLO	100
EDTA	61.91

¹Enzima dependiente de Zn²⁺ y Mg²⁺

² Por ciento de inhibición

Hemoglobina humana

La cinética de oxidación del guayacol con hemoglobina fue lineal. El guayacol es un metoxifenol que al ser oxidado tiende a dimerisarse con otra molécula de guayacol. El dímero formado absorbe a 470 nm. Como inhibidor de referencia se empleó la 1,10-fenantrolina.

Las concentraciones empleadas de las quinolonas fueron muy bajas, a causa de la insolubilización de las mismas en la solución amortiguadora de fosfatos-citratos a concentraciones mayores se provoca un desplazamiento del equilibrio ácido-base hacia la forma ácida de los antimicrobianos.

En la **Tabla 22** se muestran los resultados del efecto inhibidor.

Tabla 22. Efecto inhibidor de las quinolonas sobre la actividad peroxidasa de la hemoglobina.

Inhibidor	(%) ¹
NAL	0
PIR	0
ROS	0
NOR	0
CIP	0
OFLO	0
EDTA	0
1,10-fenantrolina	85.2

¹por ciento de inhibición

7. Discusión

Con los resultados obtenidos por difracción de rayos X de ROS y PIR, se realizó una comparación de las estructuras cristalinas y se observó que las características conformacionales de los núcleos, de los grupos etilos y carboxílicos son semejantes entre sí y a las observadas en el ácido nalidíxico (Achari y Neidle, 1976; Huber *et al.*, 1980), en el ácido pipemídico (Fonseca, 1986), en el ácido aminooxolínico (Czugler *et al.*, 1976), en el ácido oxolínico (Cygler y Huber, 1985), en la norfloxacin (Wallis *et al.*, 1994) y en la peflacin (Toffoli *et al.*, 1987). Los dos sustituyentes (etilo y pirrolidinil o piperazinil) en las quinolonas presentan libertad de rotación a través de los enlaces covalentes que los unen al núcleo de la molécula, por lo cual pueden presentar diferente orientación. Las diferencias conformacionales más pronunciadas, las presenta el sustituyente de la posición C(7) que dependen de la clase de anillo contenido en cada quinolona, puede ser de silla o sofá.

Afortunadamente, la planaridad y rigidez del núcleo de las quinolonas evitan la existencia de diferentes conformaciones para la actividad antibacteriana, pero contribuyen a la estabilidad de los complejos metálicos quinolona-metal a través de la conjugación por resonancia entre el anillo aromático del núcleo y el oxígeno del carbonilo en C(4), como se puede apreciar en la **Figura 31** y que se comprueba mediante las pequeñas variaciones observadas en la longitud de enlace del C=O de las quinolonas al complejarse con metales por ejemplo, la distancia C=O del ác. nalidíxico es de 1.25 y la del nalidixato de calcio es de 1.26, en el complejo Cu(Phen)(Nal)(H₂O)NO₃.3H₂O (Mendoza-Díaz *et al.*, 1989) es de 1.28, el enlace C=O de la cinoxacina es de 1.25 y en el complejo Cu(phen)(Cnx)(H₂O)]NO₃ (Mendoza-Díaz *et al.*, 1993) es de 1.27. La distancia C=O también, se vio influenciada por el tipo de hibridación del metal complejado al ligante.

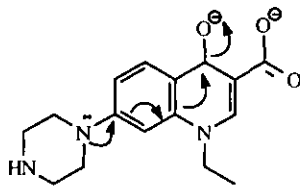


Figura 31. Efecto resonante que contribuye a la estabilización de los complejos metálicos

La reactividad del grupo carboxílico de las quinolonas en un medio acuoso frente a metales, se confirmó a través de las reacciones ácido-base con sales metálicas de Ca^{2+} y Mg^{2+} , a través de las reacciones ácido-base en un gel de alcohol polivinílico, mediante los cristales obtenidos en las pruebas de cocrystalización empleando la técnica de la gota colgante y con las estructuras cristalinas de los complejos quinolona-metal resueltas hasta el momento por difracción de rayos X tales como: cinoxacina-Cu(II) (Ruiz, *et al.*, 1997, cinoxacina-Ni(II) (Ruiz, *et al.*, 1997), $[\text{Cu}(\text{Phe})(\text{Nal})-(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Mendoza-Díaz, 1988, 1987), $[\text{Cu}(\text{Phe})(\text{cinoxacina})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Mendoza-Diaz *et al.*, 1993), nalidixato de calcio y norfloxacinato de manganeso (Hernández-Quiroz, *et al.*, en prensa).

Las cocrystalizaciones del ácido nalidíxico con los cuatro nucleósidos y el nucleótido citidilato, posiblemente no se llevaron a cabo, debido a la reacción de protonación ácido-base del anión nalidixato que se vio favorecida por la naturaleza del medio acuoso. En la reacción ácido-base, la sal de sodio del ácido nalidíxico es una base fuerte que compitió por los iones hidrógeno del medio o de los ácidos débiles próticos que actúan como sustancias amortiguadoras del medio. Al protonarse el grupo carboxilato del ácido nalidíxico lo insolubilizó en agua, lo cual posiblemente contribuyó a su cristalización. Es importante considerar este comportamiento químico ácido-base de las quinolonas ya que en el organismo humano se tienen valores de pH que van de 2 a 7.5 y muchos procesos biológicos son dependientes del pH, los cuales podrían

ser alterados por las quinolonas debido a que pueden actuar como ácidos o como bases dependiendo del pH en el que se encuentren. Además, es importante tener presente que la base conjugada de las quinolonas es una base fuerte que puede reaccionar con protones de cadenas laterales de residuos de proteínas, con hidrógenos ácidos de moléculas pequeñas, con cationes y/o centros deficientes de electrones.

Como se observa en la **Figura 12**, todas las quinolonas presentan el grupo carboxílico y ceto, lo cual sugiere que todas ellas tienen la capacidad de quelar metales y que depende de la acidez del hidrógeno del grupo carboxílico en las seis quinolonas. Este grupo se encuentra principalmente influenciado por el efecto inductivo del sustituyente del N(1) del núcleo, que dependiendo de su naturaleza química contribuirá a la conjugación del par de electrones de no enlace del nitrógeno con el doble enlace en C(2)-C(3) y el grupo carboxílico. En las seis quinolonas los sustituyentes de la posición 1 del núcleo son electrodonadores como por ejemplo NAL, PIR, ROS y NOR presentan un etilo, CIP un ciclopropilo y OFLO un anillo no aromático, son cadenas hidrocarbonadas que deben disminuir levemente la acidez de este hidrógeno, experimentalmente se podría comprobar midiendo la constante de ionización del ácido, en la literatura se describen algunos valores (Okabayashi, 1992). Por otro lado, dichas moléculas no presentan efectos estéricos que impidan la quelación del metal.

Para correlacionar la estructura y la capacidad quelante de estos antimicrobianos con su actividad bactericida se expusieron células de *E. coli* 10536 a las seis quinolonas a su concentración bactericida. A las biomasas empleadas en este estudio se les realizó cuenta de células viables antes y después de cada tratamiento, aplicándoles posteriormente un análisis estadístico, que permitió comprobar el efecto bactericida del EDTA y de las quinolonas, el cual se debió a ellos y no a las condiciones experimentales. La comparación del ABC de las diferentes concentraciones de cada antibiótico permitió apreciar un comportamiento

dependiente de la concentración, es decir a mayor concentración del antibiótico menor fue la vialidad. Es importante tener presente, que los valores obtenidos son una medida relativa de la sensibilidad de la *E. coli* 10536 hacia las quinolonas y el EDTA y que la sensibilidad *in vitro* de la población de 10^{24} CFU/ml no es predecible para la susceptibilidad *in vivo*. Además, las CB de las quinolonas obtenidas para esta población, difieren demasiado de las MIC descritas en la literatura (**Tabla 23**), debido al tamaño del inóculo, a las condiciones empleadas, a la interferencia de metabolitos y de subproductos bacterianos formados durante el desarrollo de la biomasa y principalmente a que no existe una farmacocinética en un sistema cerrado.

Tabla 23. Comparación de la MIC con la CB sobre inóculos diferentes ($\mu\text{g/ml}$)

Organismo (inóculo)	NAL	CIP	OFLO	NOR	ROS	PIR
<i>E. coli</i> KL16 ¹ (1×10^6 cfu/ml)	3.13	0.0125	0.10	0.10	-----	-----
<i>E. coli</i> CS109 ² (1×10^6 cfu/ml)	3.13	0.013	0.05	0.05	0.10	12.5
<i>E. coli</i> 10536 (1×10^{24} cfu/ml)	1000	250	1000	250	750	500

*MIC concentración mínima inhibitoria

¹ Hosaka *et al.*, 1992

² Hirai *et al.*, 1986.

Con la información que se tiene hasta el momento de la capacidad quelante de las quinolonas hacia los metales Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Al^{3+} , se consideró una posible actividad quelante semejante sobre los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} que neutralizan y estabilizan a los lipopolisacáridos de la membrana externa de la pared celular de las bacterias. Como se puede observar en las **Figuras 22-27**, las quinolonas en algunos casos produjeron rupturas severas de la pared celular y en otros fueron ligeras y semejantes al producido por el EDTA. Estas observaciones permiten proponer una reactividad química de las quinolonas sobre los cationes de esta estructura biológica ya que en la evaluación del efecto quelante de estos antibióticos se realizó la comparación con el conocido agente quelante EDTA (Control), cuyo efecto sobre la pared de la *E. coli* W3110 ha sido valorado por medio de microscopía electrónica. El EDTA ocasionó pequeñas rupturas que provocaron una despolarización de la membrana externa con

la consecuente liberación de los LPS (Leive, 1965, 1968, 1974, Ferris y Beveridge, 1986; Beveridge, 1989).

Las diferencias en las rupturas de la pared celular (**Figuras 22-27**) y en la efectividad máxima de las quinolonas (**Figura 21**) se pueden atribuir a la hidrofobicidad y al carácter iónico de estas moléculas. Las propiedades fisico-químicas, como la solubilidad y la lipofilia de estos compuestos dependen de su patrón de sustitución. En este trabajo, no se determinó experimentalmente el coeficiente de partición (n-octanol/agua) pero en la **Tabla 6** se puede apreciar la influencia de los sustituyentes en la solubilidad de cada una de ellas en dos disolventes orgánicos, la cual, puede orientarnos sobre la hidrofobicidad de estas quinolonas y de acuerdo a ellas presentan el siguiente orden decreciente NAL≈PIR>ROS>NOR>CIP>OFLO, además las tres primeras son quinolonas ácidas y las otras tres son anfotéricas. Los principales responsables de las propiedades hidrofóbicas son los sustituyentes de las posiciones 1, 6 y 7, por su naturaleza química y el responsable de su carácter anfotérico es el segundo átomo de nitrógeno del anillo piperazinilo. Las rupturas más severas fueron ocasionadas por dos quinolonas ácidas e hidrofóbicas (NAL y PIR) y una quinolona anfotérica e hidrofílica (OFLO). ROS, CIP, y NOR generaron rupturas menos severas que NAL,PIR y OFLO pero más severas a las producidas por el EDTA. Las rupturas en la pared celular sugieren una actividad quelante, sin embargo, es notorio que el carácter anfotérico de las quinolonas como en CIP, NOR y OFLO mejora la actividad de estos antibióticos, que a su vez es modulada por sus parámetros fisicoquímicos como son su pKa, solubilidad y lipofilia.

Otro punto a considerar en esta valoración son los tres mecanismo propuestos, que explican como las quinolonas pueden penetrar al interior de las células 1) proteínas de membrana hidrofílicas llamadas "porinas", 2) por difusión pasiva y por 3) desplazamiento de cationes divalentes con desestabilización de la membrana, desconociéndose el mecanismo por el cual

se realiza cada proceso (Chopra, 1988; Chapman y Georgopapadaku, 1988; Diver, 1988). La evidencia microscópica del daño de la pared celular y las estructuras de los complejos metálicos de las quinolonas apoyan el tercer mecanismo.

Como se menciona en los antecedentes, la pared celular es un componente funcional y estructuralmente vital para la célula debido a que regula la entrada de nutrientes, la salida de productos metabólicos y además, las protege de las condiciones adversas del medio ambiente. Por lo tanto, se debe tener presente que al sufrir daño, las células están expuestas a ser destruidas con mayor facilidad por los diferentes mecanismos de protección del organismo humano cuando son administradas.

Estas observaciones junto con los estudios de complejos quinolona-metal, conducen a proponer como grupos farmacofóricos de esta clase de antibióticos al grupo carboxílico en C(3) y al grupo carbonilo en C(4) característicos de todas las quinolonas. Esta proposición se ve apoyada por las transformaciones químicas descritas en la literatura realizadas a estos grupos funcionales (**Figura 32**).

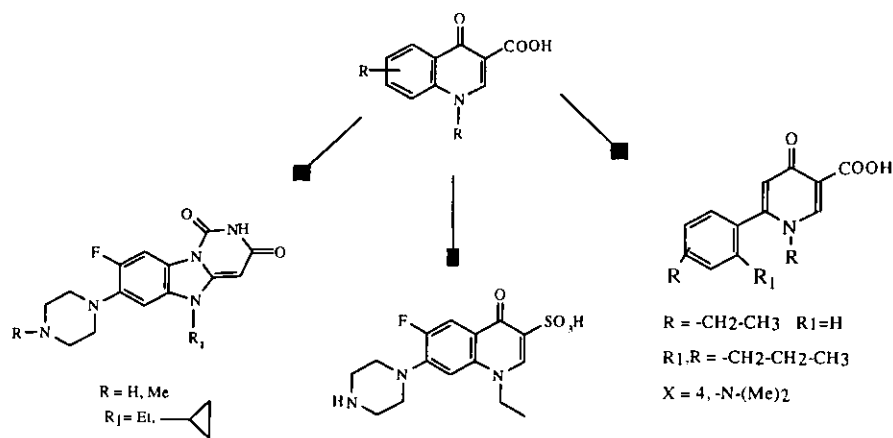
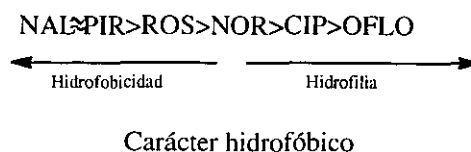


Figura 32. Modificación del grupo -COOH

Se ha observado que la sustitución del grupo carboxílico por un grupo sulfónico o la eliminación de estos grupos producen una disminución significativa de la actividad

antibacteriana *in vitro* y de su capacidad inhibitoria sobre la actividad de la enzima girasa, pruebas comúnmente empleadas para determinar y comparar la efectividad antibiótica de las quinolonas. También se encuentran descritos algunos ejemplos de quinolonas monocíclicas que apoyan la importancia de estos grupos funcionales para la actividad, a pesar de que carecen del anillo aromático conservan ambas actividades, la bactericida y la inhibitoria, siendo más potentes que el ácido nalidíxico (Georgopapadakou *et al.*, 1985; Choung *et al.*, 1988; Hubschwerlen *et al.*, 1992).

En relación a las proteínas aisladas de las células pretratadas, se observó una disminución de la proteína aislada con NAL, OFLO y CIP que se puede atribuir a una agregación de las mismas por el carácter iónico de estos tratamientos. Las proteínas agregadas no precipitan con sulfato de amonio para ser aisladas. La disminución fue más notoria con OFLO, que es una quinolona anfotérica e hidrofílica, es decir, puede reaccionar tanto en sitios catiónicos como aniónicos de la célula. Tal vez esta reactividad generó precipitación intracelular de biomoléculas como son DNA y proteínas, cuya insolubilidad impidió aislar mayor cantidad de proteína soluble. En las cantidades aisladas también se puede apreciar la influencia hidrofílica e hidrofóbica de las quinolonas sobre las proteínas, a mayor carácter hidrofílico (OFLO) e hidrofóbico (NAL) menor cantidad de proteínas, a un carácter hidrofílico intermedio como lo presenta NOR se obtiene mayor cantidad de proteína que de las células control. También se observó que con un carácter ácido e hidrofobicidad intermedia como en ROS se obtiene mayor cantidad de proteína:



El aislamiento del DNA de las células pretratadas con quinolonas se atribuyó a las propiedades iónicas de estos antibióticos. Se observó, que el EDTA a su CB y con las concentraciones normales para el aislamiento de DNA (CONTROL), actuó secuestrando los iones magnesio, cofactor indispensable para activar a las nucleasas que degradan al DNA. Comparando las cantidades aisladas con EDTA y con quinolonas a su CB se visualiza el efecto quelante de estos antibióticos ya que de células sin pretratar bajo las mismas condiciones de aislamiento y sin EDTA no se obtuvo DNA. Tal vez, reaccionaron formando complejos metálicos de quinolona-magnesio o de nucleasa-magnesio-quinolona que favorecieron el aislamiento del DNA. También se observó diferencias en las cantidades aisladas que se pueden atribuir a la hidrofobicidad de estas moléculas. A mayor carácter hidrofóbico e hidrofílico se obtuvo menor cantidad de DNA. Se aisló mayor cantidad de DNA a una hidrofobicidad intermedia como es en el caso de ROS y PIR.

De las pruebas de inhibición de la actividad enzimática de la carboxipeptidasa A, se determinó que los antibióticos NAL, PIR, ROS, NOR y OFLO tienen la capacidad de inhibir la actividad hidrolítica de la enzima en un 100 % en contraste con el EDTA y la CIP que la inhibieron parcialmente. La inhibición parcial de la actividad con EDTA se puede deber a la concentración empleada, ya que normalmente se recomienda una concentración de 1 mM para inhibir la cantidad de enzima empleada en este trabajo. La inhibición de la actividad de la enzima con CIP, bajo las condiciones aplicadas al EDTA y a las otras quinolonas, no se observó inhibición. Sin embargo, para descartar la posibilidad de inhibición se recurrió a incubar la enzima con la quinolona por 30 minutos adicionando el sustrato al final, esta modificación al método permitió determinar que CIP inhibe en un 31 % la actividad de la enzima.

La inhibición parcial de la enzima por CIP se puede deber al grupo ciclopropilo de la posición 1 en la molécula. Comparando las estructuras de CIP y NOR se tiene que este sustituyente es la única diferencia entre ellas y que se caracteriza por ser más voluminoso que el grupo etilo. Se podría pensar desde el punto de vista estructural que su volumen y libre rotación podrían impedir una inhibición rápida de la actividad de esta enzima. Sin embargo, al considerar la estructura tricíclicas de la ofloxacina y su efectividad máxima de inhibición en las condiciones normales del método, se puede observar la importancia de la planaridad de un grupo voluminoso para que se realice la acción inhibitoria y su contribución a las propiedades hidrofílicas de la molécula.

El EDTA también es un inhibidor efectivo de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, sin embargo, la concentración empleada no fue suficiente para inhibir la cantidad de enzima empleada en este trabajo. Las seis quinolonas inhibieron en un 100 % la actividad de la enzima a concentraciones más bajas que las empleadas normalmente de EDTA (1 mM).

En estas pruebas de inhibición de la actividad enzimática de la carboxipeptidasa A y fosfatasa alcalina no se pudieron probar concentraciones mayores de las quinolonas debido a que tienden a insolubilizarse en las soluciones amortiguadoras de Tris-HCl y fosfatos, debido a que la forma aniónica de las quinolonas se protona con los hidrógenos del medio favoreciendo la forma ácida de estos antibióticos..

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demuestra que las quinolonas son excelentes inhibidores de dos enzimas diferentes a las topoisomerasas del DNA. La inhibición de la actividad enzimática de estas dos enzimas por esta clase de antibióticos, posiblemente se pueda deber a sus propiedades quelantes, a reacciones con grupos aminos de residuos de aminoácidos o reacciones de equilibrio ácido-base.

Por otro lado, se comprobó que las quinolonas no inhiben la actividad peroxidasa de las hemoglobina, posiblemente se debió al pH ácido del medio que impidió la participación de estos antimicrobianos en la reacción por radicales libres. Comprobándose además que las quinolonas tienen que estar en su forma iónica y en pH ligeramente básico para poder reaccionar con el hierro.

8. Conclusiones

1. La cristalización de los ácidos carboxílicos de quinolona depende de las condiciones aplicadas.
2. Comparando las estructuras de difracción de rayos X de rosoxacina y del ácido piromídico presentados en este trabajo, con las estructuras descritas en la literatura del ácido nalidíxico (Achari y Neidle, 1976; Huber et al, 1980), del ácido pipemídico (Fonseca, 1986), ácido aminooxolínico (Czugler *et al.*, 1976), ácido oxolínico (Cygler y Huber, 1985), norfloxacin (Wallis *et al.*, 1994) y peflacina (Toffoli *et al.*, 1987) en el estado sólido cristalino, se concluyó lo siguiente:

Los núcleos de las quinolonas son planos. Presentan dos sustituyentes: Un grupo etilo que adquiere una conformación perpendicular al núcleo. Un sustituyente en 6 que puede ser un metilo, un anillo pirrolidinilo, un anillo piperazinilo ó piperidinilo el cual puede adquirir una conformación de media silla, de silla o presentar planaridad si es aromático. Ambos sustituyentes deben presentar rotación libre en solución.

El grupo carboxílico en las quinolonas en el estado sólido cristalino forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo en C(4).

3. Las quinolonas como ácidos carboxílicos, no tienden a co-cristalizar con nucleósidos ni nucleótidos en medio acuoso, debido a reacciones de equilibrio ácido-base.
4. Las quinolonas son agentes quelantes de iones divalentes. Las sales de sodio o potasio de los ácidos carboxílicos de las quinolonas reaccionan con los metales divalentes a temperatura ambiente, formando complejos insolubles en agua y en disolventes orgánicos de polaridad intermedia.
5. Se aportan dos novedosas estructuras de dos complejos metálicos: nalidixato de calcio y norfloxacinato de manganeso.
6. Las quinolonas reaccionan con cationes divalentes (Ca^{2+} y Mn^{2+}) en una relación estequiométrica 2:1 respectivamente. La unión de los ligantes al catión se realiza en forma

bidentada y β por medio de los oxígenos del grupo carboxilato en C(3) y del carbonilo en C(4).

7. La geometría de coordinación del calcio y del magnesio es octahédrica y hexahédrica. Como consecuencia de la coordinación del metal, los complejos tienden a polimerarse.

8. La conformación de los ligantes en los complejos de Ca^{2+} y Mn^{2+} , es semejante a la observada en las quinolonas. Esto sugiere que la conformación de las quinolonas no debe influir en la acción antimicrobiana y que la acción antimicrobiana de estos compuestos se debe principalmente al grupo ceto en C(4), al grupo carboxílico en C(3) y a las propiedades fisicoquímicas de las mismas.

9. Por medio de las estructuras cristalinas se reafirma que el grupo quelante de los metales es el grupo carboxílico y el grupo C=O es el grupo estabilizante.

10. Las quinolonas desestabilizan a la pared celular produciendo severas rupturas de su pared celular por la modificación de su carga. .

11. A través de las cantidades aisladas de proteína y DNA de las células pretratadas se observó la influencia de las estructuras de las quinolonas.

12. La sensibilización de las bacterias se debe a la desestabilización de los componentes de la pared celular por las quinolonas ocasionada tal vez, por la modificación de las cargas de la pared celular.

13. El aislamiento del DNA, posiblemente se debió a la acción quelante de las quinolonas sobre las nucleasas, que son enzimas dependientes de metal.

14. Las quinolonas inhibieron la acción enzimática de dos enzimas dependientes de metales divalentes: fosfatasa alcalina y carboxipeptidasa A.

14. Las quinolonas no son inhibidores de la actividad peroxidasa de la hemoglobina.

9. Perspectivas generales de estudio.

- Con la técnica de evaporación lenta, se intentará la cristalización de los complejos metálicos de Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , con mezclas ternarias de disolventes, empleando uno de mayor densidad y que sea soluble en agua para evitar la precipitación de los mismos.
- Con la técnica de gel, se probarán otros polímeros de mayor pureza cuya funcionalidad no interfiera con la de las quinolonas, que permitan crecer cristales de mejor calidad y adecuados para difracción de rayos X, de los complejos no obtenidos en este trabajo.
- Determinar el coeficiente de partición de este grupo de quinolonas mediante el método de contracorriente.
- Mediante absorción atómica se determinará la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) en los extractos de proteínas para confirmar o descartar un comportamiento de agente quelante de las quinolonas.
- Analizar el DNA extraído para determinar los posibles daños causados por este tipo de antibióticos, mediante electroforesis utilizando bromuro de etidium como agente de tinción y descartar la intercalación de las quinolonas entre los pares de bases.

10. Apéndice

Tabla 1A. Datos de los cristales y experimentales de los ácidos carboxílicos de quinolona (ROS, PIR) resueltas en este trabajo y las descritas en la literatura (NAL, NOR)^{1,2}

	NAL ¹	ROS ²	PIR ³	NOR ⁴
Fórmula	C ₁₂ H ₁₂ O ₃ N ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₃ N ₂	C ₁₄ H ₁₆ O ₃ N ₄	C ₁₆ H ₂₂ Cl ₂ FO ₄ N ₃ Con 2HCL. H ₂ O
Peso fórmula	232	294.309	288.3	410.27
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 ₁ /c Z=4	P1 Z=2	P $\bar{1}$ Z=2	P 2 ₁ /c Z=4
A	8.921 (1) Å	8.153 (1) Å	7.135 (1) Å	8.536 (2) Å
B	13.156 (2) Å	8.960 (1) Å	10.159 (2) Å	14.379 (3) Å
C	9.369 (1) Å	10.433 (1) Å	10.210 (2) Å	14.985 (4) Å
α	90.0	73.570 (9)°	103.27 (1)°	90.0
β	100.04 (2)°	82.869 (9)°	109.42 (1)°	93.40 (2)°
γ	90.0	74.410 (7)°	92.66 (1)°	90.0
V	1082.7 Å ³	703.3(1) Å ³	673.3 (2) Å ³	1836.0 (7) Å ³
Dx g/cm ³	1.41	1.390	1.422	1.484
Radiación	CuK α	CuK α	MoK α	MoK α
	$\lambda = 1.5418$ Å	$\lambda = 1.5418$ Å	$\lambda = 0.71073$ Å	$\lambda = 0.71069$ Å
T	293 °K	293 °K	293 °K	293 °K
Cristales	Incoloros, prisma	Incoloro, prisma	Amarillo, prisma	-
F(000)	488	308	304	856
R	0.039	0.049	0.064	0.039
ω R	-	0.052	0.058	0.041
No. de Reflexiones capturadas	1284	3472	3321	2620
No de reflexiones refinadas	797	404	3074	1747
Goodness of fit	-	1.08	1.07	-
Densidad residual mínima	-	-0.29 e/ Å ⁻³	0.19 eÅ ⁻³	- 0.23
Densidad residual máxima	-	0.26 e/ Å ⁻³	0.18 eÅ ⁻³	0.23
Difractómetro	4 círculos	P4 Siemens	P4 Simens	Enraf-Nonius CAD4-F
Programa del sistema	MULTAN	SHELXTL-plus versión PC	SHELXTL-plus Versión PC	SHELXS-86
Método de solución de la estructura	Métodos directos	Métodos directos	Métodos directos	Métodos directos
Método de refinamiento	Bloque diagonal mínimos cuadrados	Matriz completa (SHELXL-90)	Matriz completa (SHELXL-90)	Matriz completa (SHELXL-76)
			Mínimos cuadrados	Mínimos cuadrados

¹ Achari y Neidle, 1976, Huber et al, 1980

² Hernández-Quiroz *et al.*, 1998.

³ Hernández-Quiroz *et al.*, 1999.

⁴ Wallis et al, 1994.

NAL = ác. nalidíxico, ROS = rosoxacina, PIR = ác. Piromídico, NOR = norfloxacin.

Tabla 2A. Coordenadas atómicas ($\times 10^3$) y factores de temperatura isotrópico equivalente ($\times 10^3$)(\AA^2)^a de la rosoxacina.

Atomo	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	<i>U</i> _{eq}
O(1a)	1365(5)	6952(5)	-1771(5)	84(2)
O(2a)	293(5)	7976(5)	-67(5)	85(2)
O(3a)	3675(5)	4311(4)	-1460(3)	67(2)
N(1a)	3340(4)	4158(4)	2595(4)	43(2)
N(2a)	9378(5)	-3778(5)	5282(4)	58(2)
C(2a)	2428(6)	5304(5)	1663(5)	50(2)
C(3a)	2404(6)	5505(5)	360(5)	50(2)
C(4a)	3559(6)	4266(5)	-221(4)	42(2)
C(4aa)	4631(6)	2986(5)	714(4)	40(2)
C(5a)	5829(6)	1749(5)	259(5)	46(2)
C(6a)	6847(5)	521(6)	1118(5)	49(2)
C(7a)	6634(5)	362(5)	2513(4)	37(2)
C(8a)	5547(5)	1582(5)	2997(5)	38(2)
C(8aa)	4564(6)	2904(5)	2007(5)	45(2)
C(9a)	1246(6)	6870(6)	-476(6)	52(2)
C(10a)	3217(6)	4036(6)	3923(5)	62(2)
C(11a)	4494(9)	4673(7)	4431(6)	103(4)
C(12a)	7638(6)	-1028(5)	3484(5)	43(2)
C(13a)	8428(6)	-923(5)	4447(5)	55(2)
C(14a)	9345(6)	-2288(6)	5422(4)	54(2)
C(15a)	8673(7)	-3857(5)	4343(5)	59(2)
C(16a)	7795(6)	-2555(6)	3352(5)	55(2)
O(1b)	2544(5)	-633(5)	13344(4)	75(2)
O(2b)	3620(5)	-1559(5)	11581(4)	73(2)
O(3b)	328(5)	2033(4)	12997(3)	60(2)
N(1b)	483(5)	2285(4)	9064(3)	44(2)
N(2b)	-5553(5)	10105(5)	6234(4)	59(2)
C(2b)	1527(6)	950(5)	9864(5)	50(2)
C(3b)	1422(6)	877(5)	11247(5)	45(2)
C(4b)	342(6)	2016(6)	11782(5)	52(2)
C(4bb)	-803(6)	3380(5)	10865(4)	41(2)
C(5b)	-1965(6)	4567(5)	11306(4)	46(2)
C(6b)	-2927(6)	5890(5)	10434(4)	44(2)
C(7b)	-2807(6)	5931(5)	9082(4)	42(2)
C(8b)	-1647(6)	4746(6)	8620(4)	47(2)
C(8bb)	-623(5)	3459(5)	9438(4)	30(2)
C(9b)	2617(8)	-631(7)	12074(6)	67(3)
C(10b)	789(7)	2253(6)	7518(4)	60(2)
C(11b)	-628(7)	1747(7)	7101(5)	72(3)
C(12b)	-3776(5)	7378(5)	8133(4)	41(2)
C(13b)	-4547(5)	7231(6)	7009(4)	43(2)
C(14b)	-5371(6)	8627(7)	6193(5)	57(2)
C(15b)	-4743(7)	10226(7)	7312(5)	70(3)
C(16b)	-3862(8)	8919(6)	8199(5)	65(3)

$$^a U_{eq} = (1/3) \sum_i \sum_j U_{ij} (a_i^* a_j^*) (a_i a_j)$$

Tabla 3A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace de rosoxacina

O(1a)-C(9a)	1.325 (8)	O(1b)-C(9b)	1.319 (8)
O(2a)-C(9a)	1.229 (7)	O(2b)-C(9b)	1.182 (7)
O(3a)-C(4a)	1.275 (6)	O(3b)-C(4b)	1.270 (7)
N(1a)-C(2a)	1.326 (5)	N(1b)-C(2b)	1.384 (5)
N(1a)-C(8aa)	1.507 (6)	N(1b)-C(8b)	1.306 (5)
N(1a)-C(10a)	1.351 (7)	N(1b)-C(10b)	1.609 (6)
N(2a)-C(14a)	1.376 (8)	N(2b)-C(14b)	1.305 (8)
N(2a)-C(15a)	1.224(8)	N(2b)-C(15b)	1.416 (8)
C(2a)-C(3a)	1.321 (8)	C(2b)-C(3b)	1.419 (7)
C(3a)-C(4a)	1.471 (7)	C(3b)-C(4b)	1.359 (7)
C(3a)-C(9a)	1.459(6)	C(3b)-C(9b)	1.536 (7)
C(4a)-C(4aa)	1.439(6)	C(4b)-C(4bb)	1.492 (6)
C(4aa)-C(5a)	1.418(6)	C(4bb)-C(5b)	1.366 (6)
C(4aa)-C(8aa)	1.324(7)	C(4bb)-C(8bb)	1.461 (6)
C(5a)-C(6a)	1.356 (6)	C(5b)-C(6b)	1.384 (5)
C(6a)-C(7a)	1.415 (7)	C(6b)-C(7b)	1.392 (7)
C(7a)-C(8a)	1.385 (6)	C(7b)-C(8b)	1.375 (6)
C(7a)-C(12a)	1.480 (5)	C(7b)-C(12b)	1.484 (5)
C(8a)-C(8aa)	1.455 (6)	C(8b)-C(8bb)	1.364 (5)
C(10a)-C(11a)	1.522(10)	C(10b)-C(11b)	1.499 (9)
C(12a)-C(13a)	1.296(8)	C(12b)-C(13b)	1.449 (7)
C(12a)-C(16a)	1.384(8)	C(12b)-C(16b)	1.384 (8)
C(13a)-C(14a)	1.443(6)	C(13b)-C(14b)	1.352 (6)
C(15a)-C(16a)	1.413(6)	C(15b)-C(16b)	1.358 (7)
C(2a)-N(1a)-C(8aa)	111.4(4)*	C(2b)-N(1b)-C(8bb)	127.7(4)*
C(2a)-N(1a)-C(10a)	126.9(4)*	C(2b)-N(1b)-C(10b)	110.8(4)*
C(8aa)-N(1a)-C(10a)	121.6(3)	C(8bb)-N(1b)-C(10b)	121.5(3)
C(14a)-N(2a)-C(15a)	118.7(4)	C(14b)-N(2b)-C(15b)	113.3(4)
N(1a)-C(2a)-C(3a)	131.7(5)*	N(1b)-C(2b)-C(3b)	116.0(4)*
C(2a)-C(3a)-C(4a)	117.4(4)	C(2b)-C(3b)-C(4b)	122.9(4)
C(2a)-C(3a)-C(9a)	121.9(5)	C(2b)-C(3b)-C(9b)	113.3(4)
C(4a)-C(3a)-C(9a)	120.6(5)	C(4b)-C(3b)-C(9b)	123.7(5)
O(3a)-C(4a)-C(3a)	124.1(4)	O(3b)-C(4b)-C(3b)	123.6(4)
O(3a)-C(4a)-C(4aa)	120.9(4)	O(3b)-C(4b)-C(4bb)	118.4(4)
C(3a)-C(4a)-C(4aa)	114.9(4)	C(3b)-C(4b)-C(4bb)	117.8(5)
C(4a)-C(4aa)-C(5a)	119.8(4)	C(4b)-C(4bb)-C(5b)	122.5(4)
C(4a)-C(4aa)-C(8aa)	122.8(4)	C(4b)-C(4bb)-C(8bb)	118.1(4)
C(5a)-C(4aa)-C(8aa)	117.3(4)	C(5b)-C(4bb)-C(8bb)	119.4(4)
C(4aa)-C(5a)-C(6a)	121.1(5)	C(4bb)-C(5b)-C(6b)	122.0(4)
C(5a)-C(6a)-C(7a)	120.7(4)	C(5b)-C(6b)-C(7b)	118.4(4)
C(6a)-C(7a)-C(8a)	119.8(4)	C(6b)-C(7b)-C(8b)	120.2(4)
C(6a)-C(7a)-C(12a)	122.0(4)	C(6b)-C(7b)-C(12b)	118.7(4)
C(8a)-C(7a)-C(12a)	118.0(4)	C(8b)-C(7b)-C(12b)	120.6(4)
C(7a)-C(8a)-C(8aa)	115.9(4)	N(1b)-C(8bb)-C(4bb)	117.3(3)
N(1a)-C(8aa)-C(4aa)	121.7(4)	N(1b)-C(8bb)-C(8b)	126.0(4)
N(1a)-C(8aa)-C(8a)	113.7(4)	C(4bb)-C(8bb)-C(8b)	116.7(4)
C(4aa)-C(8aa)-C(8a)	124.6(4)	C(7b)-C(8b)-C(8bb)	123.0(4)
O(1a)-C(9a)-O(2a)	119.5(4)	O(1b)-C(9b)-O(2b)	124.8(5)
O(1a)-C(9a)-C(3a)	116.2(5)	O(1b)-C(9b)-C(3b)	111.9(5)
O(2a)-C(9a)-C(3a)	124.1(6)	O(2b)-C(9b)-C(3b)	122.7(5)
N(1a)-C(10a)-C(11a)	116.0(4)	N(1b)-C(10b)-C(11b)	110.2(4)

C(7a)-C(12a)-C(13a)	124.6(5)	C(7b)-C(12b)-C(13b)	120.6(5)
C(7a)-C(12a)-C(16a)	118.7(5)	C(7b)-C(12b)-C(16b)	122.4(5)
C(13a)-C(12a)-C(16a)	116.7(4)	C(13b)-C(12b)-C(16b)	116.8(4)
C(12a)-C(13a)-C(14a)	124.2(5)	C(12b)-C(13b)-C(14b)	115.7(5)
N(2a)-C(14a)-C(13a)	116.4(5)*	N(2b)-C(14b)-C(13b)	130.2(6)*
N(2a)-C(15a)-C(16a)	126.7(5)	N(2b)-C(15b)-C(16b)	122.5(6)
C(12a)-C(16a)-C(15a)	117.1(5)	C(12b)-C(16b)-C(15b)	121.4(6)

* La diferencia entre los ángulos de enlace de las moléculas A y B son mayores a 10°

Tabla 4A. Puentes de hidrógeno e interacciones intermoleculares C-H...O menores de 3.4 Å en la rosoxacina

Donador...Aceptor	Distancia	Distancia	Angulo (°)
	D...A	H...A	D-H...A
O(1a)-HO(2a)...O(3a)	2.563(5)	1.767(3)	133.3(3)
O(1b)-HO(2b)...O(3b)	2.541(5)	1.665(3)	143.9(3)
C(2a)-H(2a)...O(2a)	2.848(6)	2.481(4)	102.6(3)
C(2a)-H(2a)...O(2b) ^a	3.187(7)	2.856(5)	101.4(3)
C(2b)-H(2b)...O(2b)	2.756(5)	2.454(4)	97.97(3)
C(2b)-H(2b)...O(2a) ^c	3.072(7)	2.741(5)	100.98(3)
C(5a)-H(5a)...O(3a)	2.804(5)	2.506(3)	97.90(3)
C(5b)-H(5b)...O(3b)	2.833(5)	2.538(3)	97.8(3)
C(8a)-H(8a)...N(2b) ^b	3.363(6)	2.541(4)	143.7(3)
C(13a)-H(13a)...O(3b) ^c	3.334(6)	2.681(4)	126.85(3)
C(13b)-H(13b)...O(3a) ^f	3.254(6)	2.697(4)	117.56(3)
C(14a)-H(14a)...O(1a) ^d	3.353(7)	2.453(5)	155.93(3)

Posiciones equivalentes:

- a) x, +y+1, +z-1
- b) x+1, +y-1, +z
- c) x+1, +y, +z-1
- d) x+1, +y-1, +z+1
- e) x, +y-1, +z+1
- f) x-1, +y, +z+1

Tabla 5A. Coordenadas atómicas y factores de temperatura isotrópico equivalente ($\times 10^3$)(\AA^2)^a del ácido piromídico.

Atomo	x	y	z	U_{eq}
O(1)	4153(5)	1541(3)	7116(3)	68(1)
O(2)	4723(5)	3136(3)	9122(3)	70(1)
O(3)	2915(4)	2110(2)	4717(3)	60(1)
N(1)	1978(4)	6719(3)	4710(3)	41(1)
N(3)	1289(4)	5050(3)	2420(3)	47(1)
N(8)	2996(4)	6072(2)	6848(2)	42(1)
N(14)	972(4)	7314(3)	2573(3)	47(1)
C(2)	1435(5)	6349(3)	3266(3)	42(1)
C(4)	1814(5)	4133(3)	3130(3)	45(1)
C(5)	2972(5)	3331(3)	5378(3)	43(1)
C(6)	3575(5)	3779(3)	6915(3)	43(1)
C(7)	3549(5)	5108(3)	7560(3)	45(1)
C(9)	2441(5)	4374(3)	4629(3)	39(1)
C(10)	2458(5)	5735(3)	5359(3)	37(1)
C(11)	4206(6)	2820(3)	7830(4)	53(2)
C(12)	2934(5)	7484(3)	7645(3)	48(1)
C(13)	4847(6)	8394(3)	8050(4)	65(2)
C(15)	379(6)	7080(3)	1007(3)	53(1)
C(16)	629(7)	8494(4)	826(4)	62(2)
C(17)	202(7)	9389(3)	2059(4)	64(2)
C(18)	1093(86)	8758(3)	3300(3)	53(1)

$$^a U_{eq} = (1/3) \sum_i \sum_j U_{ij} (a_i^* a_j^*) (a_i \cdot a_j)$$

Tabla 6A. Puentes de hidrógeno e interacciones intermoleculares C-H...O y C-H...N menores de 3.4 Å en el ácido piromídico

Donador...Aceptor	Distancia	Distancia	Angulo (°)
	D...A	H...A	D-H...A
O(1)-H(1)...O(3)	2.524 (3)	1.68 (3)	160.4 (3)
C(7)-H(7)...O(2)	2.827 (3)	2.500 (2)	100.5 (1)
C(7)-H(7)...O(2) ^a	3.227 (3)	2.354 (2)	156.3 (1)
C(10)-H(10b)...O(2) ^a	3.386 (3)	2.725 (2)	125.6 (1)
C(11)-H(11b)...N(1)	3.329 (3)	2.884 (2)	109.5 (2)
C(15)-H(15b)...O(3) ^b	3.364 (3)	2.635 (1)	133.1 (2)
C(16)-H(16a)...O(3) ^b	3.384 (3)	2.910 (2)	112.4 (2)

Posiciones equivalentes:

a) $-x + 1, -y + 1, -z + 2$

b) $x, +y + 1, +z$

Tabla 7A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace del ácido piromídico.

O(1)-C(11)	1.327(4)	C(4)-N(3)	1.302(4)
O(2)-C(11)	1.205(4)	C(5)-C(9)	1.437(5)
O(3)-C(5)	1.260(4)	C(6)-C(5)	1.436(4)
N(1)-C(10)	1.319(4)	C(6)-C(11)	1.485(5)
N(3)-C(2)	1.380(4)	C(7)-C(6)	1.363(4)
N(8)-C(7)	1.347(4)	C(9)-C(4)	1.402(4)
N(8)-C(10)	1.392(4)	C(9)-C(10)	1.410(4)
N(8)-C(12)	1.489(4)	C(12)-C(13)	1.490(5)
N(14)-C(2)	1.328(4)	C(15)-C(16)	1.499(5)
N(14)-C(15)	1.469(4)	C(16)-C(17)	1.503(6)
N(14)-C(18)	1.468(4)	C(17)-C(18)	1.515(5)
C(2)-N(1)	1.348(4)		
O(1)-C(11)-C(6)	114.9(3)	C(4)-N(3)-C(2)	114.7(3)
O(1)-C(11)-O(2)	120.7(4)	C(4)-C(9)-C(10)	114.2(3)
O(2)-C(11)-C(6)	124.4(3)	C(5)-C(6)-C(11)	121.4(3)
O(3)-C(5)-C(6)	122.8(3)	C(5)-C(9)-C(10)	122.0(3)
O(3)-C(5)-C(9)	121.7(3)	C(5)-C(9)-C(4)	123.8(3)
N(3)-C(2)-N(1)	126.3(3)	C(6)-C(5)-C(9)	115.5(3)
N(8)-C(7)-C(6)	124.3(3)	C(7)-C(6)-C(5)	119.8(3)
N(8)-C(10)-C(9)	118.7(3)	C(7)-C(6)-C(11)	118.7(3)
N(8)-C(10)-N(1)	117.6(2)	C(7)-N(8)-C(10)	119.6(2)
N(8)-C(12)-C(13)	112.3(3)	C(7)-N(8)-C(12)	120.3(2)
N(14)-C(2)-N(1)	117.7(3)	C(9)-C(4)-N(3)	125.2(3)
N(14)-C(2)-N(3)	116.0(3)	C(9)-C(10)-N(1)	123.7(3)
N(14)-C(15)-C(16)	103.0(2)	C(10)-N(8)-C(12)	120.1(3)
N(14)-C(18)-C(17)	102.9(2)	C(15)-N(14)-C(18)	112.1(3)
C(2)-N(1)-C(10)	115.8(2)	C(15)-C(16)-C(17)	104.5(3)
C(2)-N(14)-C(15)	124.3(3)	C(16)-C(17)-C(18)	104.3(3)
C(2)-N(14)-C(18)	123.5(3)		

Tabla 8A. Datos del cristal y experimentales del complejo (NAL⁻)₂Ca²⁺

	(NAL ⁻) ₂ Ca ²⁺
Fórmula	C ₂₄ H ₂₂ O ₆ N ₄ Ca.3H ₂ O
Peso fórmula	556.6
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P $\bar{1}$ Z=2
<i>A</i>	8.841 (1) Å
<i>B</i>	10.906 (2) Å
<i>C</i>	13.961 (2) Å
α	76.25 (1)°
β	79.66 (1)°
γ	83.34 (1)°
<i>V</i>	1282.6 (4) Å ³
<i>D</i> _x g/cm ³	1.441
Radiación	MoK α
T	291 °K
Cristales	Incoloros, prisma
<i>F</i> (000)	584
<i>R</i>	0.0434
<i>WR</i>	0.049
No. de Reflexiones capturadas	4843
No de reflexiones refinadas	3540
Goodness of fit	1.14
Densidad residual mínima	-0.24 e Å ³
Densidad residual máxima	0.25 e Å ³
Difractómetro	Siemens P4
Programa del sistema	Siemens SHELXTL PLUS (versión PC)
Método de solución de la estructura	Métodos directos
Método de refinamiento	Matriz completa, mínimos cuadrados

Tabla 9A. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y factores de temperatura isotrópico equivalente ($\times 10^3$)(\AA^2)^a del nalidixato de calcio.

Atomo	x	y	Z	Ueq
Ca	2041(1)	9456(1)	4311(1)	31(1)
O(1w)	2315(3)	9025(3)	6050(2)	56(1)
O(2w)	4778(3)	8631(3)	4392(2)	65(1)
O(3w)	4651(3)	7944(3)	7166(2)	58(1)
O(1)	3667(2)	9973(2)	2765(2)	48(1)
O(2)	4614(3)	10627(3)	1181(2)	56(1)
O(3)	453(2)	9916(2)	2963(1)	38(1)
N(1)	1531(3)	8613(2)	377(2)	36(1)
C(2)	2572(3)	9167(3)	695(2)	37(1)
C(3)	2317(3)	9580(3)	1572(2)	33(1)
C(4)	828(3)	9506(3)	2177(2)	32(1)
C(5)	-1794(3)	8782(3)	2334(2)	39(1)
C(6)	-2801(3)	8206(3)	1980(2)	43(1)
C(7)	-2309(3)	7742(3)	1111(2)	43(1)
N(8)	-902(3)	7872(3)	596(2)	41(1)
C(9)	76(3)	8460(3)	938(2)	33(1)
C(10)	-298(3)	8924(3)	1815(2)	33(1)
C(11)	3639(3)	10108(3)	1848(2)	37(1)
C(12)	1968(4)	8140(3)	-553(2)	44(1)
C(13)	2514(5)	6768(4)	-364(3)	68(2)
C(14)	-3387(4)	7101(4)	711(3)	60(1)
O(1a)	415(2)	11233(2)	4780(1)	36(1)
O(2a)	2802(2)	11762(2)	4476(2)	45(1)
O(3a)	-1734(2)	12530(2)	5972(2)	40(1)
N(1a)	1781(3)	14688(2)	5919(2)	40(1)
C(2a)	2014(3)	13749(3)	5421(2)	37(1)
C(3a)	923(3)	12945(3)	5417(2)	31(1)
C(4a)	-605(3)	13114(2)	5963(2)	32(1)
C(5a)	-2178(4)	14292(3)	7172(2)	44(1)
C(6a)	-2328(4)	15238(3)	7685(3)	54(1)
C(7a)	-1097(4)	15966(3)	7591(3)	50(1)
N(8a)	244(3)	15768(3)	7030(2)	47(1)
C(9a)	384(3)	14845(3)	6525(2)	37(1)
C(10a)	-790(3)	14074(3)	6556(2)	34(1)
C(11a)	1409(3)	11924(3)	4847(2)	32(1)
C(12a)	3032(4)	15535(3)	5833(3)	50(1)
C(13a)	3995(5)	15041(4)	6638(4)	77(2)
C(14a)	-1225(6)	17017(4)	8130(3)	74(2)

$$^a U_{eq} = (1/3) \sum_i \sum_j U_{ij} (a_i^* a_j^*) (a_i a_j).$$

Tabla 10A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace del nalidixato de calcio.

Ca-O(1w)	2.412(3)	Ca-O(3)	2.470(2)
Ca-O(2w)	2.494(3)	Ca-O(1a)	2.423(2)
Ca-O(1)	2.354(2)	Ca-O(2a)	2.749(3)
O(1)-C(11)	1.257(4)	O(1a)-C(11a)	1.251(4)
O(2)-C(11)	1.227(3)	O(2a)-C(11a)	1.257(3)
O(3)-C(4)	1.258(4)	O(3a)-C(4a)	1.242(4)
N(1)-C(2)	1.346(4)	N(1a)-C(2a)	1.346(4)
N(1)-C(9)	1.386(3)	N(1a)-C(9a)	1.384(4)
N(1)-C(12)	1.482(4)	N(1a)-C(12a)	1.493(5)
C(2)-C(3)	1.376(4)	C(2a)-C(3a)	1.378(4)
C(3)-C(4)	1.431(3)	C(3a)-C(4a)	1.442(3)
C(3)-C(11)	1.506(4)	C(3a)-C(11a)	1.499(4)
C(4)-C(10)	1.458(4)	C(4a)-C(10a)	1.461(4)
C(5)-C(6)	1.366(5)	C(5a)-C(6a)	1.372(6)
C(5)-C(10)	1.396(4)	C(5a)-C(10a)	1.397(4)
C(6)-C(7)	1.403(5)	C(6a)-C(7a)	1.390(6)
C(7)-N(8)	1.325(4)	C(7a)-N(8a)	1.325(4)
C(7)-C(14)	1.498(6)	C(7a)-C(14a)	1.497(6)
N(8)-C(9)	1.345(4)	N(8a)-C(9a)	1.341(4)
C(9)-C(10)	1.407(4)	C(9a)-C(10a)	1.398(4)
C(12)-C(13)	1.494(5)	C(12a)-C(13a)	1.492(6)
O(1)-Ca-O(1w)	136.5(1)	O(3)-Ca-O(1w)	151.8(1)
O(1a)-Ca-O(1w)	81.0(1)	O(3)-Ca-O(2w)	133.1(1)
O(1)-Ca-O(2w)	66.9(1)	O(1w)-Ca-O(2w)	74.0(1)
O(1a)-Ca-O(2w)	135.2(1)	O(2a)-Ca-O(1w)	78.6(1)
O(1w)-Ca-C(11a)	75.4(1)	O(2a)-Ca-O(2w)	88.7(1)
O(2w)-Ca-C(11a)	111.2(1)	O(1)-Ca-O(1a)	114.2(1)
O(1)-Ca-O(3)	71.3(1)	O(3)-Ca-O(1a)	81.4(1)
O(3)-Ca-O(2a)	106.0(1)	O(1a)-Ca-O(2a)	49.7(1)
O(1)-Ca-O(2a)	82.1(1)	O(1a)-Ca-C(11a)	24.8(1)
O(1)-Ca-C(11a)	101.4(1)	O(3)-Ca-C(11a)	96.8(1)
O(2a)-Ca-C(11a)	25.3(1)	Ca-O(3)-C(4)	123.2(2)
Ca-O(1)-C(11)	139.9(2)	Ca-O(1a)-C(11a)	100.8(2)
Ca-O(2a)-C(11a)	85.4(2)	Ca-C(11a)-O(2a)	69.3(2)
Ca-C(11a)-C(3a)	163.0(2)	Ca-C(11a)-O(1a)	54.4(1)
C(2)-N(1)-C(9)	119.7(2)	C(2a)-N(1a)-C(9a)	119.5(3)
C(9)-N(1)-C(12)	120.6(3)	C(9a)-N(1a)-C(12a)	120.3(3)
C(2)-C(3)-C(4)	119.5(3)	C(2a)-C(3a)-C(4a)	119.1(3)
C(4)-C(3)-C(11)	122.8(3)	C(4a)-C(3a)-C(11a)	123.5(3)
O(3)-C(4)-C(10)	120.1(2)	O(3a)-C(4a)-C(10a)	118.8(2)
C(6)-C(5)-C(10)	119.6(3)	C(6a)-C(5a)-C(10a)	119.5(3)
C(6)-C(7)-N(8)	122.4(3)	C(6a)-C(7a)-N(8a)	122.2(3)
N(8)-C(7)-C(14)	116.9(3)	N(8a)-C(7a)-C(14a)	116.6(4)
N(1)-C(9)-N(8)	117.1(3)	N(1a)-C(9a)-N(8a)	116.6(3)
N(8)-C(9)-C(10)	123.9(2)	N(8a)-C(9a)-C(10a)	124.4(3)
C(4)-C(10)-C(9)	121.7(2)	C(4a)-C(10a)-C(9a)	122.4(2)
O(1)-C(11)-O(2)	124.2(3)	O(1a)-C(11a)-O(2a)	122.0(3)
O(2)-C(11)-C(3)	119.1(3)	O(2a)-C(11a)-C(3a)	119.4(3)
C(2)-N(1)-C(12)	119.6(2)	C(2a)-N(1a)-C(12a)	120.2(2)
N(1)-C(2)-C(3)	124.5(2)	N(1a)-C(2a)-C(3a)	124.9(3)
C(2)-C(3)-C(11)	117.7(2)	C(2a)-C(3a)-C(11a)	117.4(2)
O(3)-C(4)-C(3)	124.5(3)	O(3a)-C(4a)-C(3a)	126.5(3)
C(3)-C(4)-C(10)	115.4(3)	C(3a)-C(4a)-C(10a)	114.7(3)

C(5)-C(6)-C(7)	119.5(3)	C(5a)-C(6a)-C(7a)	119.8(3)
C(6)-C(7)-C(14)	120.6(3)	C(6a)-C(7a)-C(14a)	121.2(3)
C(7)-N(8)-C(9)	117.8(3)	C(7a)-N(8a)-C(9a)	117.9(3)
N(1)-C(9)-C(10)	119.0(3)	N(1a)-C(9a)-C(10a)	119.0(3)
C(4)-C(10)-C(5)	121.6(3)	C(4a)-C(10a)-C(5a)	121.3(3)
C(5)-C(10)-C(9)	116.7(3)	C(5a)-C(10a)-C(9a)	116.2(3)
O(1)-C(11)-C(3)	116.7(2)	O(1a)-C(11a)-C(3a)	118.6(2)
N(1)-C(12)-C(13)	112.7(3)	N(1a)-C(12a)-C(13a)	111.0(3)

Tabla 11A. Puentes de hidrógeno y principales interacciones intramoleculares C-H \cdots O y C-H \cdots N menores de 3.4 Å del (NAL \cdots) $_2$ Ca $^{2+}$

Donador \cdots Aceptor	Distancia		Angulo (°)
	D \cdots A (Å)	H \cdots A (Å)	
O(1w)-H(1wb) \cdots O(3w)	2.792(4)	1.917(4)	166.56(4)
O(2w)-H(2wb) \cdots O(1)	2.679(4)	2.202(5)	124.33(4)
O(3w)-H(3wb) \cdots O(1) ^b	2.902(3)	2.147(4)	165.05(5)
C(13)-H(13b) \cdots N(8)	3.294(5)	2.829(2)	110.77(3)
C(2a)-H(2a) \cdots O(2a)	2.758(4)	2.398(3)	102.91(2)
C(13a)-H(13ac) \cdots N(8a)	3.298(5)	2.846(3)	109.87(3)

Tabla 11B. Puentes de hidrógeno y principales interacciones intermoleculares C-H \cdots O y C-H \cdots N menores de 3.4 Å del (NAL \cdots) $_2$ Ca $^{2+}$

Donador \cdots Aceptor	Distancia		Angulo (°)
	D \cdots A (Å)	H \cdots A (Å)	
O(1w)-H(1wa) \cdots O(3) ^a	2.847(3)	2.123(4)	157.7(5)
O(2w)-H(2wa) \cdots O(2a) ^b	2.815(4)	1.949(5)	173.1(4)
O(3w)-H(3wb) \cdots O(2) ^b	3.264(5)	2.475(5)	154.5(4)
O(3w)-H(3wa) \cdots O(2a) ^b	2.902(3)	2.147(4)	165.1(5)
C(6)-H(6) \cdots O(1) ^d	3.615(4)	2.927(2)	131.9(2)
C(2)-H(2) \cdots O(2) ^c	3.256(3)	2.381(2)	156.8(2)
C(12)-H(12a) \cdots O(2) ^c	3.336(4)	2.479(3)	147.2(2)
C(13a)-H(13w) \cdots O(3w) ^e	3.550(6)	2.858(3)	129.9(3)
C(14)-H(14c) \cdots O(2) ^f	3.400(4)	2.510(2)	154.7(2)

Posiciones equivalentes:

(a) $-x, -y+2, -z+1$

(b) $-x+1, -y+2, -z+1$

(c) $-x+1, -y+2, -z$

(d) $x-1, +y, +z$

(e) $x, +y, +z, -1$

(f) $-x, -y+2, -z$

Tabla 12A. Datos del cristal y experimentales del complejo (NOR⁻)₂Mn²⁺

	(NOR ⁻) ₂ Mn ²⁺
Fórmula	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₂ N ₆ F ₂ Mn
Peso fórmula	847.6
Sistema cristalino	Monoclinico
Grupo espacial	C 2/c, Z = 4
<i>a</i>	14.911(4) Å
<i>b</i>	23.460(4) Å
<i>c</i>	14.536(3) Å
β	105.33 (2)°
<i>V</i>	4903.8 (17) Å ³
<i>D_x</i> g/cm ³	1.148
Radiación	MoK α
T	293 °K
Cristales	amarillos
<i>F</i> (000)	1748
<i>R</i>	0.1624
<i>wR</i>	0.203
No. de reflexiones capturadas	4231
No de reflexiones refinadas	1325
Goodness of fit	2.49
Densidad residual mínima	0.72 eÅ ⁻³
Densidad residual máxima	-0.66 eÅ ⁻³
Difractómetro	Siemens P4/PC
Programa del sistema	SIR92*
Método de solución de la estructura	Métodos directos
Método de refinamiento	Matriz completa, mínimos cuadrados

* (Altomare et al, 1994)

Tabla 13A. Coordenadas atómicas y factores de temperatura isotrópico equivalente ($\times 10^3$)(\AA^2)^a para (NORF)₂Mn²⁺.

	x	y	z	U(eq)
Mn	0	1815(2)	2500	59(3)
O(1)	-1373(13)	17554(6)	1558(15)	93(9)
O(2)	-2637(16)	1389(7)	622(18)	104(11)
O(3)	299(12)	1128(6)	1595(14)	81(9)
O(4)	535(18)	2480(8)	1721(15)	125(12)
O(5)	1834(31)	2218(21)	604(33)	270(20)
O(6)	4060(34)	1117(22)	5979(35)	289(21)
N(1)	-1558(16)	-201(8)	666(22)	101(14)
C(2)	-1884(21)	339(9)	767(21)	80(13)
C(3)	-1275(19)	800(9)	1068(21)	64(12)
C(4)	-346(20)	728(9)	1320(24)	87(15)
C(4a)	37(19)	168(9)	1237(19)	61(12)
C(5)	982(19)	34(9)	1529(20)	63(12)
C(6)	1282(19)	-483(11)	1453(26)	90(16)
C(7)	719(23)	-963(9)	1155(23)	82(15)
C(8)	-221(21)	-872(9)	915(20)	69(13)
C(8a)	-602(20)	-299(9)	900(20)	67(12)
C(9)	-1812(25)	1357(11)	1059(27)	88(16)
C(10)	-2214(22)	-651(11)	150(29)	160(26)
C(11)	-2430(41)	-1015(25)	950(33)	274(35)
N(12)	1126(29)	-1480(8)	1047(17)	96(12)
C(13)	1700(23)	-1723(11)	1937(28)	116(18)
C(14)	2305(21)	-2227(11)	1728(25)	104(16)
N(15)	1628(16)	-2695(8)	1240(17)	65(10)
C(16)	993(23)	-2451(9)	359(20)	83(14)
C(17)	497(22)	-1905(10)	574(24)	109(16)

Tabla 14A. Longitudes (Å) y ángulos (°) de enlace para (NORF)₂Mn²⁺

Mn-O(1)	2.1145(18)	N(15)-C(16)	1.491(33)
Mn-O(3)	2.199(19)	F(1)-C(6)	1.324(33)
Mn-O(4)	2.197(23)	C(2)-C(3)	1.406(34)
Mn-O(1a)	2.145(18)	C(3)-C(4)	1.347(40)
Mn-O(3a)	2.199(19)	C(3)-C(9)	1.529(38)
Mn-O(4a)	2.197(23)	C(4)-C(4a)	1.4451(3)
O(1)-C(9)	1.254(34)	C(4a)-C(5)	1.402(33)
O(2)-C(9)	1.229(40)	C(4a)-C(8a)	1.448(34)
O(3)-C(4)	1.327(29)	C(5)-C(6)	1.308(35)
N(1)-C(2)	1.380(31)	C(6)-C(7)	1.402(36)
N(1)-C(8a)	1.395(37)	C(7)-C(8)	1.369(45)
N(1)-C(10)	1.498(36)	C(8)-C(8a)	1.459(33)
N(12)-C(7)	1.385(34)	C(10)-C(11)	1.543(69)
N(12)-C(13)	1.464(40)	C(13)-C(14)	1.564(45)
N(12)-C(17)	1.417(35)	C(16)-C(17)	1.551(40)
N(15)-C(14)	1.534(33)		
O(1)-Mn-O(3)	83.1(7)	C(2a)-C(3a)-C(2aa)	130.0(93)
O(1)-Mn-O(4)	97.7(8)	C(2)-C(3)-C(4)	121.5(22)
O(3)-Mn-O(4)	93.1(8)	C(2)-C(3)-C(9)	111.1(25)
O(1)-Mn-O(1a)	172.3(8)	C(2)-N(1)-C(10)	119.9(22)
O(3)-Mn-O(1a)	91.3(7)	C(3)-C(4)-C(4a)	119.4(21)
O(4)-Mn-O(1a)	87.8(8)	C(4)-C(3)-C(9)	127.5(22)
O(1)-Mn-O(3a)	91.3(7)	C(4a)-C(5)-C(6)	121.5(22)
O(3)-Mn-O(3a)	85.7(10)	C(4)-C(4a)-C(5)	124.5(22)
O(4)-Mn-O(3a)	170.8(7)	C(4)C(4a)-C(8a)	118.3(24)
O(1a)-Mn-O(3a)	83.1(7)	C(4a)-C(8a)-C(5)	119.1(18)
O(1)-Mn-O(4a)	87.8(8)	C(4a)-C(8a)-C(8)	118.3(25)
O(3)-Mn-O(4a)	170.8(7)	C(5)-C(6)-C(4a)	122.1(19)
O(4)-Mn-O(4a)	89.6(12)	C(5)-C(6)-C(7)	125.5(26)
O(1a)-Mn-O(4a)	97.7(8)	C(5)-C(4a)-C(8a)	117.0(21)
O(3a)-Mn-O(4a)	93.1(8)	C(6)-C(7)-C(8)	116.3(23)
Mn-O(1)-C(9)	133.1(18)	C(6)-C(7)-N(12)	119.6(29)
Mn-O(3)-C(4)	116.9(19)	C(7)-C(8)-C(8a)	121.0(23)
N(1)-C(10)-C(8a)	121.5(18)	C(7)-N(12)-C(13)	114.3(24)
N(1)-C(2)-C(3)	121.5(26)	C(7)-N(12)-C(17)	114.7(26)
N(1)-C(10)-C(11)	104.5(32)	C(8)-C(7)-N(12)	123.8(23)
N(1)-C(8a)-C(4a)	119.8(21)	C(8)-N(1)-C(10)	119.8(22)
N(1)-C(8a)-C(8)	121.6(22)	C(9)-C(3)-O(1)	115.4(19)
F(1)-C(6)-C(5)	115.2(23)	C(13)-N(12)-C(17)	108.2(21)
O(1)-C(9)-O(2)	123.4(27)	C(13)-C(14)-N(15)	106.8(23)
O(1)-C(9)-C(3)	115.9(27)	C(14)-N(15)-C(16)	108.2(19)
O(2)-C(9)-C(3)	120.6(23)	N(15)-C(16)-C(17)	111.9(23)
O(3)-C(4)-C(4a)	113.3(24)	N(12)-C(17)-C(16)	112.9(25)
O(3)-C(4)-C(3)	127.2(21)	N(12)-C(13)-C(14)	110.7(30)
C(1a)-C(2a)-C(3a)	129.4(60)		

11. Bibliografía

- Achari A. and Neidle S., *Acta Crystallogr.*, **1976**, B32, 600.
- Anaya-Velázquez F., Padilla-Vaca F., AriasNegrete S. and Mendoza-Díaz, *Trans of the royal Soc. of Tropical Medicine and Hygiene*, **1989**, 83, 344.
- Anderson V. E., Gootz T. D., Osheroff N., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 17879.
- Barba-Behrens N. and Mendoza-Diaz G., *Inorg. Chim. Acta.*, **1986**, 125, 21.
- Barton N., *et. al.* , *Chem. Abstr.*, **1961**, 55, 7442e.
- Brown P. O. and Cozzarelli, N. R., *Science*, **1979**, 206, 1081.
- Chapman J. S., and Georgopapadakou N. H., *Antimicrob. Agentes. Chemother.*, **1988**, 32, 438.
- Chen C. R., Malik M., Snyder M. and Drlica K., *J. Mol. Biol.*, **1996**, 258(4), 627
- Choung Un Kim and Bing-yu Luh, *Heterocycles*, **1988**, 27, 1119.
- Christ W., Lehnert T., Ulbrich B., *Rev. Infect. Dis.*, **1988**, 10, suppl. 1, S141.
- Chopra I., *Parasitol.*, **1988**, 96, 525.
- Chu D. T. W., Hallas R., Clement J. J., Alder L., McDonald E., Plattner, J. J., *Drugs Exp. Clin. Res.* **1992**, 18, 275.
- Coleman J. E., *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1992**, 21, 441.
- Cremer D. and Pople J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 1354.
- Cozzarelli, N. R., *Science*, **1980**, 207, 953.
- Cull Millard and McHenry S. Charles, *Methods in Enzymology*, **1990**, 182, 147
- Cygler M., Hubber C. P., *Acta Crystallogr.*, **1985**, C41, 1052.
- Czugler M., Argay G., Frank J., Mészáros Z., Kutschabsky L., and Reck G., *Acta Crystallogr.*, **1976**, B32, 3124.
- Diver J. *Quinolones Bulletin*, **1988**, 4, 25.
- Djurdjevic P. T., Jelikic-Stankov M. and Tankov D., *Anal. Chim. Acta.*, **1995**, 300, 253.

Dobson R. A., O'Connor J. R., Poulin S. A., Kundsinn R. B., Smith T. F. and Came P. E., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1980**, 18, 738.

Drlica K., Zhao X., *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, **1997**, 61(3), 377.

Easmon C.S.F., *Quinolones Bulletin*, De. P. Shah. Frankfurt., **1988**, 4, 9

Einspahr H. and Bugg C. E., *Acta Crystallogr.*, **1981**, B37, 1044.

Elverse J., Johnson C. M. and Marini A. M., *Methods in enzymology*, **1994**, 231, 547.

Fan Jun-Yao, Sun Daekyu, Yu Hongtao, Kerwin M. S., and Hurley H. L., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 408.

Ferris G. F. and Beveridge T. J., *Can. J. Microbiol.*, **1986**, 32, 52.

Ferris G. F. and Beveridge T. J., *Can. J. Microbiol.*, **1986**, 32, 594.

Fishers E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1894**, 27, 2985.

Fonseca I., Martínez-Carrera S. and García-Blanco S., *Acta Crystallogr.*, **1986**, C42, 1618.

García-Rodríguez J. A., Antimicrobianos. En: Pumarola A, Rodríguez-Torres A., García-Rodríguez J.A., Piédrola-Angulo G., eds. *Microbiología y Parasitología Médica*. Barcelona, Salvat, **1987**, 120.

Garen A. and Levinthal C., *Biochim et Biophys. Acta*, **1960**, 38, 470.

Gellert M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A., *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **1976**, 73, 3872.

Gellert M., *Annv. Rev. Biochem.*, **1981**, 50, 879.

Georgopapadakou N. H., Dix B. A., Angehrn P., Wick A. and Olsen G., 25th ICAAC, **1985**, 129.

Haase D. A., Ndinga-Achola J. O., Nash R. A., D'Costa L. J., Hazlett D., Lubwama S., Nsanze H. and Ronald A. R., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1986**, 30, 39.

Handsfield H. H., Judson F. N. and Holmes K. K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1981**, 20, 625

Heinz K. Henisch, (1988) en: *Crystals in gels and Liesegang rings*, Cambridge-University Press, p 29.

Hernández-Quiroz T., Hernández-Ortega S. y Soriano-García M., *Anal. Sci.*, **1998**, 14, 637

Hernández-Quiroz T., Hernández-Ortega S. y Soriano-García M., *Anal. Sci.*, **1999**, 15, 105.

- Hirai K., H. Aoyama, T. Irikura, Sh. Iyobe, and S. Mitsuhashi., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, **1986**, 29, 535.
- Höffken G., Borner K., Glatzel P. D., Koeppe P. and Lode H., *Eur. J. Clin. Microbiol.* **1985**, 4, 345.
- Hooper D. C., and J. S. Wolfson., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1985**, 28, 716.
- Hosaka M., T. Yasue, H. Fukuda., H. Tomizawa, H. Oayama and K. Hirai., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, **1992**, 36, 2108.
- Huber C. P., Gowda D.S.S., and Acharya, K. R., *Acta Crystallogr.*, **1980**, B36, 497.
- Hubschwerlen C., Pflieger P., Specklin L. J., Gubernator K., Gmunder H., Angehrn P. and Kompis Y., *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 1385.
- Ingham B., Brentnall D. W., Dale E. A. and McFadzean J. A., *Toxicol. Lett.*, **1977**, 1, 21
- Irvin R. T., MacAlister T. J. and Costerton J. W., *J. Bacteriol.*, **1981**, 145, 1397.
- Issopoulos B. P., *Analyst*, **1989**, 114, 627.
- Jancarik J. and Kim S. H., *J. Appl. Cryst.*, **1991**, 24, 409.
- James, A. M. In "Microbial Cell Surface Analysis: Structural and Physicochemical methods", Mozes N., Handley P. S., Busscher H. J., Rouxher P. G., Eds., VCH Publishers, New York, **1991**, p 221.
- Karipides A., Miller C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 1494.
- Karipides A., McKinney C. and Peiffer K., *Acta Crystallogr.*, **1988**, C44, 46.
- Kennedy F. J., Cabral M.S., Joaquim M.,(eds), *Recovery Processes for Biological Materials*, John Wiley and Sons, N.Y., **1993**,
- Kim E. E. and Wickoff H. W., *J. Mol. Biol.*, **1991**, 218, 449.
- Kitzes-Cohen, A., *Quinolones Bulletin*, De. P. Shah. Frankfurt., **1987**, 3, 11.
- Koga H., Itoh A., Murayama S., Suzue S., Irikura T., *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 1358.
- Leshner G. Y. and Gruett M. D., Belg. Pat. 612258, July 3, **1962**.
- Leive L., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1965**, 21, 290.
- Leive L., *J. Biol. Chem.*, **1968**, 243, 2373.
- Leive L., *Ann. N. Y. Acad Sci.*, **1974**, 235, 109.

- Leshner G. Y., et al., *J. med. Pharm. Chem.*, **1962**, 5, 1063.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265.
- McClure O. W., Neurath H. and Walsh A. K., *Biochemistry*, **1964**, 3, 1897.
- McPherson A. (1982) en: Preparation and Analysis of protein crystals, p. 241, John Wiley and Sons, Nueva York.
- McGuirk P. R., Jefson R. M., Mann D. D., Elliot C. N., Chang P., Cisek P. E., Cornell P. C., Gootz D. T., Haskell L. S., Hindahl S. M., Lafleur J. L., Rosenfeld J. M., Shryock R. T., Silvia M. A., and Weber H. F., *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 611.
- Mendoza-Díaz G., Martínez-Aguilera, L. M. R., Pérez-Alonso R., Solans X., Moreno-Esparza R., *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, 138, 41.
- Mendoza-Díaz G., Pannell K. H., *Inorg. Chim. Acta*, **1988**, 152, 77.
- Mendoza-Díaz G. and Ireta Moreno J., *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, 54, 235.
- Mendoza-Díaz G., Martínez-Aguilera R. L. M., Moreno-Esparza R., Pannell Keith H, and Cervantes-Lee F., *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, 50, 65.
- Nakano M., Yamamoto M. and Arita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, 26, 1505.
- Nix D. E., Wilton J. H., Ronald B., Distlerath L., Williams V. C. and Norman A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, 34, 432.
- Okabayashi Y., F. Hayashi, Y. Terui and T. Kitagawa., *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40, 692.
- Palú, G. et. al., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 9671.
- Palumbo M., Gatto B., and Zagotto G., *Trends in Microbiology*, **1993**, 1, 232.
- Peterson G. L., *Anal. Biochem.*, **1979**, 100, 201.
- Permana, P. A., Snapka R. M., Shen L. L., Chu D. T. W., Clement J. J., Plattner J. J., *Biochemistry*, **1994**, 33, 11333.
- Preheim L. C., Cuevas T. A., Roccaforte J. S., Mellencamp M. A. and Bittner M. J., *Lancet*, **1986**, ii, 48.
- Price J. R., *Austr. J. Sci. Res.*, **1949**, 272.
- Ramírez-Ramírez N., Mendoza-Díaz G., Gutiérrez Corona F., Pedraza Reyes M., *Journal of Biocommunication*, **1998**, 3, 188.
- Ross L. D. and Riley M., Ch., *Int. J. Pharm.*, **1993**, 93, 121.

Ruiz M., Ortiz R., Perelló L., Latorre J. and Server-Carrió J., *J. Inorg. Biochem.*, **1997**, 65, 87

Sánchez J. P., Bridges J. A., Bucsh R., Domagala M. J., Gogliotti D. R., Hagen E. S., Heifetz L. C., Joannides T. E., Sesnie C. J., Shapiro A. M. and Szotek L. D., *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 361.

Schwartz J. H. and Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1961**, 47, 1996.

Sheldrick, G. M. SHELXTL/PC. User manual. Release 4.21. Siemens Analytical X-Ray Instruments Inc. Madison Wisconsin, USA. **1990**.

Shen L. L., Mitscher A. L., Sharma N. P., O'Donnell J. T., Chu D. T. W., Cooper S. C., Rosen T. and Pernet G. A., *Biochemistry*, **1989**, 28, 3886.

Shimada J., Shiba K., Oguma T., Miwa H., Yoshimura Y., Nishikawa T., Okabayashi Y., Kitagawa T. and Yamamoto D., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 36, 1219.

Shimizu M., Nakamura S., Takase Y., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1970**, 117.

Snyder M., and Drlica K., *J. Mol. Biol.*, **1979**, 131, 287.

Swanson, B. N., V. K., Boppana, P. H. Vlasses, H. H. Rotmensch, and R. K. Ferguson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1983**, 23, 284

Tallarida R. J. and Murray R. B., **1981**, Manual of Pharmacologic Calculations, Ed. Springer-Verlag, N.Y.

Tanaka M., Kurata T., Fujisawa Ch., Ohsima Y., Aoki H., Okazaki O. and Hokusui H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, 37, 2173.

Tappel L. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1953**, 44, 387

Tatsumi H., Senda H., Yatera S., Takemoto Y., Yamayoshi M. and Ohnishi K., *J. Toxicol. Sci.*, **1978**, 3, 357.

Thorsteinsson, S. B., T. Bergan, S. Oddsdottir, R. Rohwedder, and R. Holm. Chemotherapy (basel), **1986**, 32, 408.

Toffoli Par P. and Rodier N., Ceolin R., Blain Y., *Acta Crystallogr.*, **1987**, C43, 1745.

Tsuji A., Sato H., Kume Y., Tamai I., Okezaki E. Nogata O. and Kato H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, 32, 190.

Vallee B. L. and Neurath H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 5006.

Wallis S. C., Gahan L. R. Charles B. C. and Hambley T. W., *Aus. J. Chem.*, **1994**, 47, 799.

Wentland M. P. and Cornett J. B., *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1985**, 20, 145.

Wise R., Andrews J. M. Edwards L. J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1983**, 23, 559.

Wolfson J. S. and Hooper D. C., *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1985**, 28, 581.