

## APLICACIONES DE LA BIOCRISTALOGRAFIA A LAS CIENCIAS MEDICA Y FARMACEUTICA \*

Dr. LUIS MIRAVITLLES MILLE

(Académico Numerario)

Excmo. Sr. Presidente,  
Muy ilustres Académicos,  
Señoras, Señores:

En el momento de empezar a redactar el trabajo de turno para la inauguración del curso 1977 de esta Real Academia, salta rápida y nítidamente a mi imaginación una fría tarde invernal, la del 11 de diciembre de 1955, en la que, cumpliendo los deberes de todo Académico Electo, leía mi discurso de recepción para ingresar en esta Corporación.

En el anfiteatro, en pie y ante la mesa de disección del Maestro Gimbernat, cubierta de laurel, pronuncié el panegírico de mi antecesor en el sillón vacante, D. Enrique Soler Batlle, con voz ronca, manos trémulas y ojos velados por la emoción, ante el recuerdo de la figura señera y venerable del que fue Rector de nuestra Universidad y Vicepresidente de esta egregia Corporación.

Como por arte de magia, desde este acto tan memorable para mí, han transcurrido más de 20 años, y los que entonces figurábamos en la retaguardia del Escalafón, hénos como de improviso en la vanguardia del mismo. La muerte ha arrebatado sin compasión a numerosos y queridísimos compañeros que nos precedían.

Formando parte de la Sección 1.<sup>a</sup> denominada «Ciencias Fundamentales», hemos creído conveniente plantear un tema que quizás a muchos les parecerá que no pertenece a una ciencia fundamental de la medicina.

Hoy día, las ciencias médicas se valen y utilizan todos los medios teóricos y prácticos de la ciencia en general, porque ésta es una e indivisible. Así la Química y la Física son sus más eficaces colaboradoras en los capítulos de la Bioquímica y de la Biofísica. Es precisamente de esta última ciencia de la que hemos extraído las ideas para elaborar este trabajo.

---

\* Sesión inaugural del Curso (30-I-77). Discurso de turno.

Tanto los principios inmediatos que forman los cuerpos orgánicos y organizados, objeto de la Fisiología animal, como los medicamentos objeto de la Farmacología y Farmacodinamia, se presentan generalmente cristalizados. Por esta razón todos ellos presentan un estado físico denominado estado cristalino, situado dentro del estado sólido.

Es por ello por lo que hemos des-gajado de la Biofísica la Biocristalografía, de cuya aplicación a las ciencias médicas y farmacéuticas vamos a ocuparnos.

### 1. Difusión y osmosis: Coloides y Cristaloides

Thomas Graham, químico escocés (1805-1869), profesor de Química en el Instituto de Anderson y posteriormente en la Universidad de Londres, con sus clásicos estudios sobre la difusión de los líquidos, la diálisis de las sustancias en disolución, etc., fue uno de los fundadores de la Química coloidal.

Se llama difusión al acto en virtud del cual las sustancias se mezclan lenta y progresivamente sólo en virtud de sus fuerzas moleculares; este fenómeno se acelera con el aumento de la temperatura. Basta colocar en contacto directo dos líquidos susceptibles de mezclarse, superponiéndolos por orden de densidades, para ver que, a pesar de las diferencias de éstas, los líquidos se van mezclando a través de su superficie de separación hasta resultar un todo homogéneo. Es clásica la expe-

riencia de Graham con tintura de tornasol y ácido sulfúrico. Los casos mejor estudiados por el propio Graham fueron las disoluciones salinas.

Pero cuando la difusión de dos líquidos no se realiza directamente, sino a través de un tabique permeable, entonces el fenómeno se llama ósmosis, y fue descubierto por el Abate Juan Antonio Nollet en 1748. La presencia de dicho tabique modifica notablemente el fenómeno de difusión, de suerte que el líquido que sea más absorbido por el tabique poroso, lo atraviesa en mayor proporción que el otro durante un mismo tiempo. El descubrimiento lo realizó utilizando como líquidos el agua y alcohol, separados por una fina membrana permeable de caucho. La cantidad de alcohol que atravesando la membrana, se difunde en el agua, es mayor que la del agua que pasa a mezclarse con el alcohol. Lo contrario ocurre si se emplea el pergamino como tabique de separación entre los dos líquidos citados.

De lo anteriormente dicho se deduce, que los volúmenes líquidos a uno y otro lado del tabique, variarán en general, en virtud de la ósmosis; aumentando uno y disminuyendo el otro. Este fenómeno se estudia fácilmente con el osmómetro ideado por el médico francés René Dutrochet (1776-1847) que emplea como tabique una membrana de papel pergamino.

Si los líquidos empleados son agua y una disolución salina, es posible demostrar la existencia de la denominada presión osmótica que todos ellos presentan; para ello en el osmómetro se

sustituye la membrana permeable por una membrana hemipermeable o semipermeable, tabique poroso que permite el paso del disolvente y no el del cuerpo disuelto, resultando de este modo una pared en la que chocan las moléculas de éste en su movimiento de traslación.

A pesar de que las cubiertas de las células vegetales y animales son membranas semi-permeables, Pfeffer, médico y biólogo francés, para estudiar los fenómenos de presión osmótica y sus leyes, empleó una membrana artificial, construida precipitando ferrocianuro cúprico gelatinoso en los poros de un vaso poroso, resultado de la reacción de las soluciones de ferrocianuro potásico y sulfato cúprico.

Se llama diálisis la operación que tiene por objeto separar ciertos cuerpos que constituyen una mezcla, valiéndose de la diversa aptitud de aquellos para atravesar las membranas permeables en los fenómenos de ósmosis. Graham divide los cuerpos en dos grandes grupos: cristaloides y coloides. Los primeros son todos los solubles y fácilmente cristalizables (ácidos base, sales, azúcares, etc.) que gozan de la propiedad de pasar fácilmente y con relativa rapidez a través del tabique del osmómetro. Los coloides, por el contrario, pasan muy difícilmente, y dejan de pasar del todo si se hallan mezclados con cristaloides. Son cuerpos coloides los que no cristalizando, forman con el agua disoluciones viscosas como la goma, dextrina, gelatina, cola, etc. Esta operación se realiza con los dializadores. En la

actualidad, continúa teniendo tanta importancia el fenómeno de la diálisis, que es el fundamento de nuevos métodos empleados en Nefrología. Asimismo la ósmosis inversa se utiliza para la desalinización de las aguas haciendo circular el agua salina por presión mecánica, superior a la presión osmótica, entre los compartimentos separados por una membrana, quedando agua depurada en uno de ellos y salina en el otro. El sistema resulta algo costoso por el deterioro progresivo de las membranas y el coste de la energía requerida, proporcional a la cantidad de sales eliminadas.

Los términos *cristaloide* y *coloide* los emplea Graham por la semejanza, el primero con los cristales de sal común y el segundo por la similitud de este grupo de sustancias con la gelatina o cola.

En la actualidad estas denominaciones no son válidas, pues los términos empleados son no cuerpos, sino estados cristalino y amorfo, constituidos por materia cristalina y materia amorfa respectivamente. Así, una sustancia química puede presentarse en las dos formas, como ocurre por ejemplo con el azufre, que se manifiesta en ocho estados alotrópicos diferentes, de los cuales existen dos amorfos y seis cristalinos; y también en el caso de los colágenos, engendradores de cola y gelatina, que presentan algunas propiedades físicas de las que gozan los cristales, lo que ha permitido discutir su estructura y las posibilidades de que sus moléculas sigan unas orientaciones preferentes en las gelatinas. Realmen-

te, lo importante no es solamente la composición química, sino también la distribución de los iones, átomos, moléculas o grupos moleculares.

Por todo ello podemos considerar definitivamente en la actualidad dos tipos de materia o dos estados diferentes de la misma; estos estados son amorfo y cristalino.

## 2. Estados amorfo y cristalino

El estado amorfo es aquel en que los elementos constitutivos de su materia se encuentran mayoritariamente desordenados; en cambio el estado cristalino es aquel cuya materia presenta sus elementos en un cierto orden, lo cual depende de las condiciones físicas y químicas a que ha sido sometida la sustancia.

La materia amorfa puede originarse de dos formas, por fusión y por desecación, que da lugar a su vez a dos tipos, la vítrea y el gel coloidal. En la naturaleza, como ejemplo de materia vítrea por fusión, podemos citar la obsidiana y los vidrios naturales, así como también los vidrios artificiales; todos ellos se producen por el rápido enfriamiento de la materia fundida, y pueden considerarse como el verdadero estado amorfo. Solamente se conocen dos hidrogeles, cuerpos naturales o minerales del segundo tipo, o sea geles coloidales producidos por desecación: el sílicogel que constituye el ópalo, formado por una molécula de sílice y un número variable de moléculas de agua, y el alumogel, que forma parte de la bauxita, constituido por una molécula

de alúmina y varias de agua; como cuerpo orgánico puede citarse la gelatina en sus diversas formas de sol a gel.

El corto número de cuerpos amorfos existentes y su tendencia a pasar a cristalinos, demuestra una mayor estabilidad para este estado; así el vidrio espontáneamente, con el tiempo, puede adoptar estructura cristalina, fenómeno conocido con el nombre de desvitrificación.

Se llama materia cristalina a la materia de la cual están formados los cristales; unas veces, si la materia dispone de las necesarias condiciones de tiempo y espacio y reposo, adquiere la forma de un sólido geométrico de mayor o menor tamaño, limitado por caras más o menos planas, sólido que se denomina cristal; si es visible a simple vista se llama fanerocristal. Pero a veces, sin adoptar formas poliédricas externas, pueden también cristalizar los cuerpos, dando una masa denominada *masa cristalina*, constituida por un gran número de cristales tan pequeños, que el estudio de su cristalinidad sólo puede efectuarse con el microscopio polarizante; a esos cristales no visibles a simple vista, se les denomina criptocristales y al mineral microcristalino; ejemplo típico es el mármol de Carrara o mármol sacaroideo, llamado así por su semejanza con el azúcar ordinario, que también es una masa cristalina.

El estado más perfecto de los sólidos es el cristalino, y tanto los fanerocristales como los criptocristales son distintas expresiones del estado cristalino

con las propiedades comunes de la materia cristalina. Los primeros constituyen la forma más perfecta del estado cristalino.

Actualmente es importante el estudio del crecimiento de los cristales sintéticos, ya por agotarse los grandes ejemplares naturales, ya por presentar los cristales reales propios de la naturaleza ciertas deficiencias, tales como defectos puntuales, disoluciones, máculas, etc. que convierten a los cristales obtenidos artificialmente en cristales casi ideales y del tamaño deseado.

Así en joyería se sintetizan esmeraldas muy difíciles de distinguir de las naturales del Brasil. Se obtenían, asimismo, grandes cristales de sal de Seignette (tartrato sódico potásico) para sustituir piezas de cristal de roca de las que resultaban el piezocuarzo en la producción de los ultrasonidos, tan importantes hoy en día en Medicina y Farmacia; también resultan perfectos y adecuados algunos cristales de fluoruro de litio usados en las técnicas de los rayos laser.

La materia cristalina viene definida por las propiedades, homogeneidad, anisotropía y simetría cristalina; faltándole alguna de las tres, ya no es materia cristalina. Esto se traduce en una periodicidad especial de orientación de motivos, según la cual resultan los diversos grupos en los que se presenta esta materia.

Utilizando la propiedad física de la acción de los rayos X, sobre la materia, si ésta es cristalina, se producirá un espectro de difracción de puntos, rayas o bandas, que es lo que en resumen de-

fine esta materia, pues si es amorfa entonces presentará una banda continua de absorción.

### 3. Métodos de estudio de la materia cristalina

La acción de agentes físicos sobre la materia cristalina o la aparición de fenómenos físicos en ella, es la que se denomina Cristalofísica, y, según que el agente sea electricidad, magnetismo, calor, etc., se constituyen las ramas de Cristalolectricidad, Cristalomagnetismo, Cristalotermia, etc.

Así por ejemplo, el efecto mecánico de tracción o compresión sobre un cristal de cuarzo, en ciertas direcciones, produce un campo eléctrico, y a la inversa. La acción de un campo eléctrico sobre un cuarzo engendra su acortamiento o alargamiento en ciertas direcciones, con producción de ondas ultrasonoras. En el primer caso, el fenómeno se denomina piezoelectricidad, en el segundo, electrostricción, fundamento de los ultrasonidos.

Indicamos ya que la Biofísica estudia la acción de los agentes físicos sobre los seres vivos, tejidos, células, o sobre los principios inmediatos que son sus especies químicas naturales.

Con estos antecedentes, podemos definir la Biocristalografía como la aplicación a la materia viva de los conceptos que sobre la materia cristalina y la Cristalofísica hemos establecido.

De esta manera entra de lleno en Biocristalografía el estudio de los seres vivos, constituidos por virus, caso particular de macromoléculas químicas y

una serie de principios inmediatos, anabólicos y catabólicos que presentan los organismos, como colágenos, proteínas, antibióticos, vitaminas, hormonas, etc. y cuyo estudio biocristalográfico permite conocer su estructura.

Este concepto permite aplicar al conocimiento de la materia viva todos los métodos físicos que emplea la Biofísica para el estudio de la materia cristalina. Es lógico pensar que como en cualquier especie química, debe seguirse el estudio completo por las técnicas físico-químicas y químicas, tanto por medio de los análisis inmediato, elemental y funcional como por medios técnicos, de espectroscopía (infrarrojo o ultravioleta), espectrografía de masas, resonancia magnética nuclear, efecto Mossbauer, etc.

Pero las técnicas más comúnmente empleadas en el estudio de la materia cristalina para la determinación de su estructura, son la goniometría, microscopía con luz natural y polarizada, microscopía electrónica, difracción de rayos X, difracción de electrones y neutrones, etc.

La goniometría, fundada en el estudio de los elementos reales de los cristales, fue una técnica de gran difusión en la época de los grandes mineralogistas, que permitía diagnosticar una especie mineralógica con la medida de determinados ángulos diedros de un cristal; hoy en día también puede, en determinados casos, ayudar al estudio morfológico de cristales, estudio aunque no indispensable, todavía útil.

Continúa como instrumento indispensable el microscopio polarizante,

actuando con luz natural y luz polarizada, tanto como ortoscopio como conoscopio para el estudio de las propiedades ópticas de los cristales, tales que relieve, extinciones, ángulos de extinción, índices de refracción, defectos de cristalización, figuras de interferencia, signo óptico, etc.

Estos métodos ópticos permitieron describir la naturaleza cristalina no solamente de numerosas masas de naturaleza inorgánica, sino que se describieron ciertas propiedades anisótropas en tejidos orgánicos, presentándose por ejemplo figuras de interferencia conosópicas en las preparaciones de granos de almidón y en las secciones de tejidos óseos.

La microscopía electrónica sustituye a la microscopía óptica, en el caso de macromoléculas, virus, fibras, etc., permitiendo apreciar y estudiar la distribución, empaquetado e incluso el tamaño de las subunidades de este tipo de moléculas. También se utilizan para observar defectos en cristales no macromoleculares.

En la actualidad, el método más extendido y más útil para el estudio de la materia cristalina, es el de difracción de rayos X, cuyo conocimiento y aplicaciones estableceremos más adelante, estableciendo previamente unas nociones de difusión y difracción de electrones y neutrones.

#### 4. Difracción de electrones y neutrones

En 1927, se confirma la predicción de Luis Víctor de Broglie, físico fran-

cés nacido en 1892, profesor de la Sorbona y Premio Nobel de Física en 1929. Según esta predicción, un haz de partículas en movimiento se comporta como un tren de ondas, en el cual la longitud de onda está ligada a la cantidad de movimiento. La experiencia fue realizada por Clinton Joseph Davison, físico norteamericano nacido en 1881, Premio Nobel en 1937, con G. P. Thompson por su descubrimiento de la difracción de electrones, logrando difractar un haz de electrones en el níquel.

El haz de electrones es muy sensible a las bruscas variaciones de potencial eléctrico, a las cuales está sometido al atravesar un medio material.

Este haz está sujeto, entre muchas otras interacciones, a una difusión coherente por parte del medio de difusión, que se transforma en difracción si el medio es periódico. El poder de difusión de los átomos es mucho más importante para los electrones que para los rayos X y los neutrones.

Una fracción condensable de la energía del haz incidente, se encuentra en las líneas difundidas o difractadas; es a consecuencia de ello que la detección de estos fenómenos en los electrones es más sensible que en los rayos X y neutrones, así por ejemplo, en la detección por película fotográfica, los tiempos de exposición son alrededor de mil veces más pequeños que los necesarios en rayos X.

En resumen, podemos decir que los electrones son fuertemente absorbidos por el material interaccionado y que lo

son mucho menos que los rayos X y que los neutrones, lo cual condiciona completamente las técnicas experimentales.

Por otro lado, entre la intensidad del haz difractado de electrones y el factor de estructura, existe una relación mucho más compleja que en la difracción de rayos X.

El que se obtenga una fuerte intensidad difractada, no permite la utilización de la «teoría cinética» para desarrollar los modelos matemáticos necesarios con el fin de establecer las relaciones e interpretación del fenómeno, sino que es necesario recurrir a la teoría dinámica.

A pesar de ser un método más moderno que el de difracción de rayos X, es un método utilizado únicamente en algunos casos, como en fibras naturales y artificiales, arcillas, gases, etc.

Si pasámos al caso de difracción de neutrones, es preciso disponer de una fuente de emisión, una pila nuclear, donde se produce un flujo de neutrones térmicos a partir de partículas de alta energía, que provienen de reacciones nucleares. Este flujo sale de la pila por un colimador destinado a aislar un haz paralelo. La sección del colimador ha de ser importante a fin de obtener un flujo de neutrones suficientemente intenso. Es preciso utilizar como en el caso de difracción de rayos X, un monocromador que generalmente es un cristal.

Es necesario trabajar con cristales de mayor tamaño que en el caso de difracción de rayos X, lo cual comporta generalmente ciertas desventajas, ya

que es difícil obtener macrocristales de una sustancia con los menores defectos posibles. Los dispositivos experimentales utilizados son, con las salvedades expuestas, semejantes a los empleados en la difracción de rayos X.

La utilización en la práctica de la difracción de neutrones queda limitada básicamente por la costosísima tecnología que comporta; existen dos o tres centros en América y otro par de ellos en Europa que se dedican a esta actividad científica, aplicable única y exclusivamente a casos que no pueden resolverse ni por difracción de electrones o de rayos X.

### 5. Difracción de rayos X

El estudio de los cristales fue desde un principio objeto puramente filosófico y naturalista, fruto de la observación directa, a la que se dedicaron con profusión los antiguos filósofos y naturalistas griegos, romanos, árabes, etc., como Dioscórides, Plinio, Gerber, hasta llegar a los mineralogistas franceses, ingleses y alemanes de los siglos XVIII y XIX.

Estos utilizaron el raciocinio y las leyes matemáticas, culminando con la ley fundamental, aunque empírica, de la racionalidad de los índices de las caras de los cristales, formulada por el Abate Renato Justo Haüy (1743-1822), profesor de Humanidades de la Sorbona y considerado como fundador de la Cristalografía científica. A éste le sigue una pléyade de otros tantos ilustres mineralogistas, como Miller, Levy, Des Clouceaux, Romé de l'Isle,

Delafosse, Senarmon, Weiss, etc., que relacionan íntimamente la Cristalografía con la Mineralogía.

Al producirse, por Wilhem Conrad Roentgen (1845-1923), profesor de Física de Munich, el descubrimiento de los rayos X en 1895 (llamados así por no conocerse entonces su naturaleza y propiedades), al aplicar su acción tanto sobre los cuerpos químicos, naturales o minerales, como sobre los cuerpos químicos artificiales producidos por síntesis, se originó una profunda transformación en los métodos de estudio de las especies químicas, y cuyo desarrollo, en honor a su descubridor, podemos denominar Roentgen-Cristalografía.

Los rayos X se propagan en línea recta, con una velocidad igual a la de la luz, considerándose desde un punto de vista clásico, como radiaciones electromagnéticas de acuerdo con la teoría de Maxwell (1831-1879), escocés, profesor de Física del King's College. Su longitud de onda es del orden del Angström ( $A = 10^{-8}$  cm) y cubren la porción de espectro electromagnético comprendido entre el ultravioleta y los rayos gamma.

Modernamente, al igual que las demás radiaciones, pueden considerarse los rayos X, según la teoría cuántica de Planck, como cantidades discretas (no continuas) de energía, es decir como quantum de luz, constituyendo los fotones, que pueden definirse como la cantidad de energía necesaria para arrancar un electrón de un átomo.

Los rayos X se producen en tubos al vacío, donde un haz de electrones

Muchas afecciones rebeldes  
ocultan una base alérgica

## GAMMA GLOBULINA HUBBER ANTIALERGICA

Frasco con tapón perforable conteniendo 500 mg de globulina gamma con poder histaminopéxico, en forma liofilizada. Adjunto ampolla con disolvente especial. Se acompaña jeringuilla y aguja estériles, para un solo uso. P.V.P. 731,20 Pts.

### Posología

Como norma, salvo mejor criterio médico, la dosificación será (siempre por rigurosa vía intramuscular profunda):

Niños: 500 mg (1 vial) cada 8-10 días. Adultos: 500 mg (1 vial) cada 4-6 días

### Incompatibilidades

No existen incompatibilidades conocidas a la terapéutica con **GAMMA GLOBULINA HUBBER ANTIALERGICA**.

### Efectos secundarios

Puede dar lugar, en pacientes sensibles y en raras ocasiones, a un ligero dolor local que cede espontáneamente. También se han presentado, de forma esporádica, ligeras reacciones febriles de corta duración.

**Contraindicaciones:** No existen.

**Combate los fenómenos de hipersensibilidad  
en todos los niveles orgánicos**

LABORATORIOS HUBBER, S. A.

LABORATORIOS HUBBER, S. A. - LABORATORIOS HUBBER, S. A. - LABORATORIOS HUBBER, S. A.  
LABORATORIOS HUBBER, S. A. - LABORATORIOS HUBBER, S. A. - LABORATORIOS HUBBER, S. A.

# BIO-HUBBER

**Comprimidos  
(SIMPLE y FUERTE)**

**Jarabe**

## PRESENTACION Y FORMULA

### BIO - HUBBER SIMPLE:

Tubo con 20 comprimidos, conteniendo cada comp.:

Clorhidrato de estreptomina . . . . .	25 mg
Ftalilsulfacetamida . . . . .	100 mg
2 - sulfanilamidopirimidina . . . . .	75 mg
Sulfamerazina . . . . .	75 mg
Ftalilsulfatazol . . . . .	100 mg
Excipiente . . . . .	c.s.
P.V.P.: 49,90 Ptas.	

### BIO - HUBBER FUERTE:

Tubo con 10 comprimidos, conteniendo cada comp.:

Neomicina base (sulfato) . . . . .	25 mg
Estreptomina base (sulfato) . . . . .	50 mg
Bacitracina . . . . .	1.000 U.I.
2 - sulfanilamidopirimidina . . . . .	30 mg
Vitamina K hidrosoluble . . . . .	20 mg
Pectina . . . . .	50 mg
Niacinamida . . . . .	20 mg
Excipiente . . . . .	c.s.
P.V.P.: 61,40 Ptas.	

### BIO - HUBBER JARABE:

Frasco con 60 c.c. conteniendo:

Estreptomina base (sulfato) . . . . .	1,00 g
Neomicina base (sulfato) . . . . .	0,30 g
2 - sulfanilamidopirimidina . . . . .	0,30 g
Pectina . . . . .	0,26 g
Vitamina K hidrosoluble . . . . .	0,40 g
Niacinamida . . . . .	0,40 g
Excipiente, c.s.h. 60 c.c.	
P.V.P.: 61,— Ptas.	

## INDICACIONES

Colitis ulcerosa crónica. Enteritis regional. Disentería bacilar. Infecciones de la mucosa intestinal, superficiales y profundas. Diarreas infantiles. Trastornos nutritivos infecciosos de causa conocida o desconocida y, en general, todos los procesos infeccivos del tracto gastrointestinal y como tratamiento pre y post - operatorio en los gastrectomizados y cirugía del colon.

## DOSIFICACION

Bio - Hubber Simple: 1/2 comprimido cada 3 horas para los lactantes.  
Bio - Hubber Fuerte: 1/2 a 1 comprimido cada 4-6 horas, según edad y criterio facultativo.  
Bio - Hubber Jarabe: Lactantes, 1 cucharadita de las de café cada 6 horas.  
Niños de 2 a 5 años: 1 cucharadita de las de café cada 4 horas.  
Niños de 5 a 10 años: 1 cucharadita de las de café cada 3 horas.

**CONTRAINDICACIONES:** Alergia conocida a alguno de los componentes de su fórmula.

**INCOMPATIBILIDADES:** Con el ácido paraaminobenzóico y sus derivados y con acidificantes tales como el cloruro amónico.

**EFFECTOS SECUNDARIOS:** No se han descrito.



**LABORATORIOS HUBBER, S. A.**

Fábrica y Laboratorios de Productos Biológicos y Farmacéuticos  
Berlín, 38-48 - Teléf. \*321 72 00 - BARCELONA-15 (España)

procedentes del cátodo (rayos catódicos) acelerados por una diferencia de potencial de algunas decenas de kilowatios, choca con una pieza de metal anticátodo situado en el ánodo, la cual emite rayos X bajo el efecto de este bombardeo electrónico. La diferencia de potencial se establece entre el filamento que emite los electrones y el anticátodo. La intensidad de la corriente es tal que la energía transportada por unidad de tiempo es del orden del kilowatio. Sólo una pequeña parte de energía electrónica se transforma en radiación X, el resto se disipa bajo la forma de calor en el ánodo. Es por consecuencia indispensable refrigerar enérgicamente el ánodo por una corriente de agua. El haz de rayos X sale lateralmente del tubo por una ventana lo más transparente posible, generalmente de mica o berilio.

Los espectros de rayos X, emitidos por el metal anódico, dependen de la naturaleza de este metal y lo constituyen la superposición de dos tipos de emisión, la radiación blanca o fondo blanco, que constituyen el espectro continuo y las radiaciones características que forman el espectro discontinuo. Los metales más corrientemente empleados como anticátodos son molibdeno, hierro y cobre.

El origen de la radiación blanca no es sencillo, pudiéndose pensar que al producirse el frenado de los electrones procedentes del cátodo, por la pared metálica del anticátodo, los rayos X emitidos son blancos en su mayor parte.

La emisión de *rayos característicos*, así denominados por ser característi-

cos de la naturaleza del metal, es un fenómeno cuyo fundamento físico es más sencillo.

Bajo el impacto de los electrones, los átomos del metal del anticátodo pierden un electrón de una capa electrónica interna, encontrándose así en un estado elevado de energía, produciéndose entonces, muy rápidamente, una restauración parcial del desgaste causado al átomo por el paso de un electrón de la capa superficial, hacia el hueco de la capa interna; la transición va acompañada de la emisión de un fotón.

Cuando un haz de rayos X atraviesa un medio material pueden producirse los siguientes efectos: refracción, reflexión y difusión.

Como ocurre en un haz luminoso, un haz de rayos X paralelos (onda plana) sufre refracción, es decir, cambia de dirección, al pasar de un medio a otro. Cada medio se caracteriza por su índice de refracción, que es función de la longitud de onda (dispersión).

Para los rayos X el índice es inferior a uno, por lo que puede considerarse un fenómeno de poca importancia en la práctica, por lo que se prescinde de él.

Los rayos X sufren también, una reflexión en forma de difusión, pues los núcleos de los electrones son puestos en vibración obligada bajo la acción del campo eléctrico de los rayos X. De hecho, emiten una radiación de la misma longitud de onda en el espacio que los rodea.

La diferencia de fase entre la radiación incidente y los rayos difusos es

generalmente constante, de aquí el nombre de difusión coherente, dado a este fenómeno (la denominada difusión de Lord Rayleigh), base de la difracción de los rayos X por los cristales.

A esta descripción clásica puede seguirle un razonamiento cuántico, según el cual un fotón X es absorbido y devuelto rápidamente por un átomo con la misma energía, después de una demora de  $T/2$  (difusión elástica).

Contrariamente a la difusión coherente, existe la difusión incoherente producida por el efecto Compton, denominada también difusión Compton y que se realiza simultáneamente con la anterior. Esta difusión se produce con un cambio de longitud de onda, lo que impide las interferencias de las radiaciones difundidas con las radiaciones incidentes. El efecto Compton es relativamente débil, no actuando en los fenómenos de difracción. Contribuye simplemente a producir un espectro continuo.

También tiene lugar un efecto de fluorescencia produciendo igualmente una difusión incoherente, dando un espectro continuo perjudicial en la interpretación de las películas de difracción. Puede ocurrir también la absorción, término que expresa un conjunto complejo de fenómenos, que pueden transformar la energía de los fotones absorbidos en energía térmica o química, fenómeno que debe tenerse en cuenta por su cuantía.

Además de los fenómenos anteriores, debemos tener presente que las interferencias están siempre en la pro-

pagación de un haz de rayos X, produciendo aumento o anulación de su intensidad según sus diferencias de fase.

Para una sustancia determinada, el coeficiente de absorción disminuye regularmente con la longitud de onda; los fotones más energéticos presentan la tendencia a ser menos absorbidos. Los rayos X utilizados en radiología médica deben ser muy penetrantes para responder a su objetivo. Por tanto son principalmente rayos blancos del espectro continuo, obtenidos en los tubos de rayos X, trabajando a alta tensión. El hecho de ser fácilmente absorbidos por espesores mucho más finos, convierte a los rayos X de los tubos radiocristalográficos en más peligrosos, por lo que obliga al operador a tomar las precauciones necesarias para no exponerse a su acción.

Todas estas consideraciones sobre la naturaleza y propiedades de los rayos X, que hemos expuesto, habían sido ya demostradas prácticamente antes de 1912, excepto el fenómeno de su difracción, ya perfectamente conocido en el caso de las ondas luminosas y que faltaba demostrar experimentalmente para aclarar la misma naturaleza electromagnética de los rayos X.

La propagación de la luz obedece al principio general que rige todos los fenómenos físicos, de la mínima acción o del mínimo esfuerzo, según el cual la luz se propaga de un punto a otro por el camino más corto.

Pero la validez de este principio queda limitada, cuando se estudia el movimiento ondulatorio y se observa que no se propaga en línea recta, como

ocurre con el fenómeno de la difracción de la luz, según la cual, cuando los rayos luminosos pasan por una finísima rendija con orificios de muy pequeño diámetro, o pasan rasantes por los bien delineados bordes de una pantalla opaca, se comportan como manantiales luminosos, que envían luz en todas direcciones; o también la presencia de un pequeño obstáculo interpuesto hacen que las ondas bordean el obstáculo, dando la sensación de que el movimiento ondulatorio no se ha propagado en línea recta; la causa de todo ello son los fenómenos de interferencia que se originan.

La condición esencial para que se produzca este fenómeno es que la magnitud del obstáculo o rendija interpuesta y la de la longitud de onda del movimiento que lo atraviesa, sean del mismo orden. Por esta razón, la luz es detenida totalmente por obstáculos del tamaño de un milímetro, y sólo en el caso en que el obstáculo o rendija sea de orden de la milimicra, que corresponde al orden de magnitud de las longitudes de onda de los diversos colores, se podrá producir la difracción de la luz.

Para realizar experimentalmente la difracción de la luz se emplean las craticulas o redcillas de difracción, que son un conjunto alternado de pequeñas aperturas y pequeños intervalos opacos yuxtapuestos regularmente; puede haber craticulas de refracción, constituidas por una placa de vidrio plano, en una de cuyas caras se trazan, con un diamante, un número considerable

de líneas paralelas sumamente próximas y equidistantes unas de otras. Hay craticulas rectilíneas y circulares cuyo número varía de 200 a 4.000 por milímetro, y cuya magnitud constituye la constante de la red; son muy corrientes las craticulas de celuloide. También las hay que actúan por reflexión, constituidas por placas de metal bruñido convenientemente rayadas.

Se comprende, pues, que con estas redes así construidas fue imposible demostrar experimentalmente la difracción de los rayos X, por tener éstos sus longitudes de onda del orden del Angstrom, muy inferior a la constante de las craticulas o redes de que se disponía para realizar experiencias en los laboratorios.

En 1912 es cuando el nombre de dos científicos cristalógrafos aparece enlazado, a través del tiempo, en una fecunda idea, que dio el empuje que actualmente tiene la ciencia cristalográfica. Por una parte Bravais (1811-1863), profesor de Física de la escuela politécnica de París, había sugerido una teoría geométrica, la llamada Teoría Reticular de Bravais, sobre la distribución de la materia cristalina, en los vértices de las redes, por él deducidas geométricamente, sin que esta teoría se hubiera confirmado experimentalmente hasta entonces.

Por otro lado, muchos años después, Max von Laue, físico alemán, conocedor de esta teoría de Bravais y de las dificultades que existían para demostrar experimentalmente los fenómenos de interferencia y de difracción de los

rayos X, mediante las cratículas o recedillas de refracción, hasta entonces conocidas, ideó su teoría denominada Teoría de Laue, según la cual, si las redes ideadas por Bravais eran ciertas y si la materia cristalina estaba distribuida periódicamente en los nudos de estas redes, los cristales deberían ser unas magníficas redes de difracción para los rayos X, pues las distancias interatómicas, eran del orden de magnitud de  $\lambda$ , como les ocurría exactamente a las longitudes de onda de los rayos X.

La parte experimental estuvo a cargo de los físicos alemanes Friedrich y Knipping que, haciendo incidir un haz de rayos X sobre cristales de blenda, lograron obtener un espectro de difracción cuya simetría estaba de acuerdo con la simetría de distribución de los átomos de zinc en la blenda. Esta teoría de Laue y estos hechos experimentales demostraron plenamente y a la vez, la exacta naturaleza de ondas electromagnéticas de los rayos X y la confirmación de la teoría reticular de Bravais.

Posteriormente Sir William Henry Bragg (1862-1942), profesor de Física de la Universidad de Londres, Premio Nobel en 1915, simplifica extraordinariamente las ecuaciones de Laue, haciéndolas más accesibles a una representación concreta, de forma que consideraba que las familias de planos reticulares de las redes de Bravais actuaban como espejos frente a los rayos X, reduciendo las tres ecuaciones de Laue a una sola, conocida como la ecuación de Bragg.

## 6. Determinación de estructuras cristalinas por difracción de rayos X

La difracción de rayos X en monocristales comporta dos elementos diferentes, la distribución geométrica de los máximos de difracción y las intensidades de dichos máximos. La distribución geométrica está condicionada por la ecuación de Bragg y permite deducir la simetría espacial de un monocristal, así como los parámetros de las celdas elementales y por lo tanto el sistema cristalino. Por otra parte, las intensidades de los máximos de difracción están relacionadas con el denominado «Factor de estructura» y con la «Densidad Electrónica».

Podemos considerar los átomos constituyentes del cristal como difusores esféricos, que dan lugar a una difusión de rayos X de una amplitud que depende de la naturaleza de dichos átomos; pero sabemos que, en verdad, lo que difunde los rayos X son los electrones, por lo que el átomo difunde los rayos X proporcionalmente al número de sus electrones. Aquí podemos ver la relación entre densidad electrónica e intensidad; cuando esta densidad electrónica se considera en un punto determinado, aparece el factor de estructura que es el número ficticio de electrones que le corresponden a este punto.

Estos conceptos, suficientemente desarrollados, dan lugar a que a partir de las intensidades difractadas se puedan determinar las densidades electrónicas en cualquier punto de la celda elemental, valores que nos permiten identifi-

car y conocer las coordenadas exactas de los átomos de una sustancia. Este conocimiento es el que normalmente se denomina «Determinación de una estructura».

Esta determinación estructural presenta tres problemas básicos:

1) Obtención de cristales únicos suficientemente perfectos y de tamaño adecuado para que permitan realizar la difracción de rayos X.

2) Medida exacta de las intensidades difractadas en cada punto del espectro de difracción.

3) Imposibilidad experimental de la determinación de las fases de los haces difractados que se denomina «Problema de las fases».

En relación con el primer apartado, el estudio teórico de los cristales, tanto geométrico como físico, nos conduce al «cristal ideal», que evidentemente no existe. En realidad, tanto a los cristales naturales como a los artificiales se les denomina «cristales reales».

Entre «cristal real» y «cristal ideal» existen una serie de diferencias que vienen determinadas por lo que llamamos «defectos o imperfecciones cristalinas» que pueden hacer aparecer un cierto número de propiedades características, como son propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, químicas, etc.

El estudio de estas propiedades y sus relaciones con las imperfecciones forman tradicionalmente parte de la Física del estado sólido. Los principales defectos podemos clasificarlos en cinco tipos:

A) Defectos en la posición de los átomos (defectos de Frenkel, de Schotky).

B) Cristales no estequiométricos.

C) Defectos de la naturaleza de los átomos.

D) Desorden, y

E) Dislocaciones.

Todos estos fenómenos deben tenerse en cuenta por su influencia en la difracción de rayos X.

En cuanto al segundo apartado, se puede indicar que se utilizan métodos y técnicas que permiten tener en cuenta los diferentes aspectos de la difracción que nos pueden interesar en cada caso.

Generalmente, para medir las intensidades se utilizan contadores muy precisos, así como radiación X, obtenida a través de un monocromador para precisar su exacta longitud de onda. El funcionamiento de estos complejos sistemas mecánicos generalmente se completa por medio de pequeños ordenadores «on-line».

El tercer punto es la clave de la resolución estructural, ya que existe una imposibilidad experimental en la determinación de las fases de las intensidades de los haces de rayos X difractados; sabemos que desarrollando la densidad electrónica de cada punto de la celda elemental  $\rho(xyz)$  en series de Fourier, los coeficientes de dicha serie se pueden relacionar con la intensidad difractada en cada punto por la siguiente expresión:

$$I \sim F \cdot F' = |F| \exp i \phi \cdot |F| \exp i \phi$$

Por lo tanto, el conocimiento de la fase  $\phi$  de cada intensidad difractada, es indispensable para desarrollar las series de Fourier, necesarias para calcular la densidad electrónica.

Por el contrario, si conocemos las coordenadas  $xyz$ , de un cierto número de átomos, conoceremos la densidad electrónica en cada punto, o sea la función  $\rho(xyz)$ , a partir de la cual y por medio de una síntesis de Fourier inversa podemos determinar directamente los factores de estructura.

Esta es la base de los métodos clásicos de determinación estructural denominados «Trial and error methods» en los cuales debe suponerse «a priori» una determinada estructura a partir de la cual se calculan sus factores de estructura, «cálculos» que deben coincidir con los obtenidos experimentalmente. Si no coincidieran y fueran relativamente próximos, aplicando procedimientos matemáticos de aproximaciones sucesivas, pueden llegar a hacerlos modificando ligeramente la estructura prevista inicialmente.

Este fue el método utilizado en la resolución de las primeras estructuras hasta 1935, en que A. L. Patterson estableció las bases de los denominados «métodos de Patterson», en los que por medio de razonamientos matemáticos se establecieron relaciones entre la densidad electrónica en el espacio directo y en el recíproco. Ello permite aplicar el concepto de convolución, así como el de transformada de Fourier, siendo en resumen simplemente la función Patterson la transformada de Fourier, de los cuadrados de los

módulos de los factores de estructura que son proporcionales a las intensidades observadas.

La aplicación de la función de Patterson permite obtener mapas de vectores que representan las distancias interatómicas cuya interpretación da lugar a la posibilidad de conocer la estructura.

Existen muchas modificaciones y formas de trabajar con la función de Patterson (secciones de Harker, métodos de superposición, funciones mínimas, etc.). Para la resolución de estructuras de sustancias que posean un átomo de densidad electrónica muy elevada se utiliza el método del «átomo pesado»; este método resuelve con mayor facilidad la función de Patterson y sobre todo da a conocer las coordenadas del átomo, o átomos pesados, permitiendo a partir de éstas determinar las coordenadas de los restantes átomos ligeros.

Otro método para resolver el problema de las fases es el método de las «sustituciones isomorfas», habitualmente utilizado para determinar las estructuras de las grandes moléculas.

Actualmente los métodos de resolución estructural más avanzados son los denominados «directos», que permiten deducir por medios matemáticos las fases de los haces difractados en contraposición a los métodos clásicos o indirectos que determinan la fase, una vez conocida una estructura aproximada.

El desarrollo de los métodos directos es relativamente reciente y arranca de las desigualdades de Harker y

Kasper (1948), de Hauptman y Karle (1950) y de la expresión de Sayre (1951).

La rápida evolución de la informática y de los poderosos métodos de que puede disponer el cálculo, han logrado que hoy en día se haya impuesto este tipo de métodos, permitiendo una casi total automatización de las resoluciones estructurales para compuestos cuyas moléculas sean de tamaño medio.

Además, al ser procedimientos predominantemente matemáticos, permiten que no haya que introducir demasiados elementos de juicio e interpretación, lo cual les hace idealmente programables en los ordenadores.

Hemos explicado ya que la fase y la amplitud de las ondas difractadas son independientes, por lo que es difícil relacionarlas y por lo tanto parece teóricamente imposible realizar un cálculo de este tipo; pero simplemente basándonos en tres consideraciones físicas expresadas matemáticamente y utilizándolas correctamente, es suficiente para resolver este problema. Las tres consideraciones son las siguientes:

- a) La densidad electrónica es siempre positiva.
- b) Los átomos son aproximadamente esféricos y están fijos.
- c) Existe igual probabilidad de que un átomo ocupe una posición u otra dentro de la celda elemental.

La utilización sistemática y práctica de los métodos directos no fue posible hasta la introducción del sistema deno-

minado «Adición simbólica» de Karle y Karle en 1966. Es a partir de aquí cuando comienzan a utilizarse sistemáticamente.

De todas formas no es hasta 1968, en que fue introducido el sistema de «multisolución» por Woolfson para estructuras centro-simétricas y posteriormente por Germain y Woolfson para estructuras no centradas, que se obtienen resultados espectaculares.

Es en este momento (1969-70) cuando se inicia de forma masiva la resolución de gran número de estructuras cristalinas, y se convierte en un elemento indispensable en toda investigación, química, biológica, etc.

## 7. Estructuras cristalinas de sustancias biológicas

Se comprende que, dado el infinito número de sustancias que intervienen en los mecanismos biológicos, no será posible hacer un estudio meticuloso y detallado del conjunto de las mismas. Sin embargo, se han seleccionado grupos significativos y orientados al desarrollo actual de esta parte de la Cristalografía Estructural, impulsora de la Biología.

Escogeremos aquellos cuerpos orgánicos cuyas estructuras, al ser resueltas, han permitido el estudio práctico de numerosos problemas fisiológicos y de síntesis.

En realidad, la determinación de la estructura de estos compuestos ha condicionado fundamentalmente el desarrollo de la Bioquímica, de la Fisiología, de la Farmacología, etc., de tal

forma que no es posible aclarar la mayoría de los procesos fisiológicos sin que la estructura de sus protagonistas haya sido determinada.

Sin el conocimiento a nivel molecular de la distribución geométrica de las sustancias que intervienen en dichos procesos, se comprende la imposibilidad de razonar la marcha interna de las reacciones bioquímicas que tienen efecto en los seres vivos.

Tanto es así que sin la ayuda del «Bisturí físico-químico», que ha permitido la «disección» de la íntima estructura de dichas sustancias, no hubiera sido posible conocer diferencias estructurales tales como distancias intramoleculares, distancias intermoleculares, ángulos de enlace, ángulos de torsión, tipos de enlace, etc., que condicionan totalmente el comportamiento reaccional en los procesos metabólicos.

Los mismos condicionantes pueden considerarse en la intervención de los medicamentos en los procesos vitales, por lo que en su síntesis y aplicaciones también dependen de su estructura. Todo ello en la práctica de obtención de nuevos medicamentos es muy importante, porque al plantear su síntesis de acuerdo con los principios fundamentales de la Farmacodinamia y de la Farmacología, puede suceder que el cuerpo resultante no responda a las predicciones deseadas debido a condicionantes estructurales.

Dada la complejidad de las determinaciones a efectuar, se comprende que la resolución de una estructura es fruto de un variado grupo de médicos, farmacéuticos, cristalógrafos, bio-

químicos, biofísicos, ingenieros, etc., lo cual explica que actualmente los premios Nobel de Medicina, Bioquímica, Biofísica, etc. se concedan a equipos multidisciplinarios en los que intervienen todo tipo de especialistas.

La resolución de estructuras macromoleculares no es fruto de un trabajo fácil y de corta duración, sino el resultado elaborado por equipos complejos a lo largo de muchos años de labor, y con planes de largo alcance. Así por ejemplo, para obtener la estructura de la «insulina» han sido precisos más de veinte años de experiencias por un equipo dirigido por Dorothy Crowfoot Hodgkin, trabajo por el cual le fue concedido el premio Nobel.

Aún hay más; así en el caso de la «Ribonucleasa», no es uno solo el que intenta obtener la estructura, sino que son varios los equipos que persiguen su determinación (Kantha, Carlisle, etcétera).

De lo dicho anteriormente se comprende que el desarrollo de este tipo de investigación no es rentable a corto plazo, y únicamente las sociedades o naciones de gran poder económico puedan lanzarse a programar una investigación de esta naturaleza, o bien las que por su gran tradición científica intentan seguir manteniéndola a pesar de sus graves dificultades económicas. En el primer caso podemos citar los Estados Unidos, Unión Soviética y Alemania, y en el segundo Gran Bretaña y los países europeos de gran índice científico.

Los compuestos orgánicos que nos interesa reseñar podemos agruparlos en

función de su peso molecular y tamaño, sin tener en cuenta ni su función química ni sus propiedades biológicas, formando así tres grupos de límites imprecisos tales que moléculas pequeñas, medianas y grandes o macromoléculas.

En el primer grupo de pequeñas moléculas de bajo peso molecular, la resolución de su estructura es básica en el desarrollo de la química teórica y en el estudio de los métodos que han permitido resolver las estructuras de los otros grupos; comprende principalmente los aminoácidos, que son los «ladrillos» del edificio molecular de las proteínas.

En el segundo grupo, de peso molecular intermedio, podemos situar algunas sustancias de gran interés, como pueden ser: antibióticos, alcaloides, etcétera.

En el tercer y último grupo, formado por las sustancias de elevado peso molecular o macromoléculas, podemos considerar las siguientes: proteínas globulares, virus, fibras, proteínas fibrosas, ácidos nucleicos y nucleoproteínas.

Vamos a estudiar a continuación los cuerpos orgánicos correspondientes al segundo grupo de peso molecular intermedio.

A) *Antibióticos*. Los primeros antibióticos caracterizados definitivamente desde el punto de vista cristalográfico, fueron el cloramfenicol (Chloromycetin) y el Bromanfenicol (Bromomycetin) que son isomorfos y cuyas estructuras fueron determinadas en 1952 por J. Dunitz. Este autor ha estu-

diado también la Aureomicina y la Terramicina; aunque parece que por sus grupos funcionales, deberían presentar notables diferencias, sin embargo, pertenecen al mismo grupo espacial, tienen la misma densidad y la misma celda elemental, e incluso parece razonable sospechar que poseen una estructura cristalina muy similar.

Ante la imposibilidad de discutir y comentar todos los estudios efectuados sobre los restantes antibióticos, tomaremos como ejemplo la Penicilina, cuyas diferentes sales fueron cristalizadas en 1943, concentrándose el estudio analítico en la Bencil-Penicilina sódica, potásica y rubídica.

Crowfoot D., Bunn C. W., etc., en 1949 determinaron por el método Patterson la estructura aproximada de dichas sales, viéndose que las de sodio, potasio y rubidio cristalizaban, la primera en el sistema monoclinico y las otras dos en el rómbico. Sus grupos espaciales son el  $P_2$  y el  $P_{2,2,2}$ , para la potásica y rubídica, y mientras que la sódica tiene dos moléculas por celda elemental, las otras dos tienen cuatro moléculas por celda.

Los estudios químicos anteriores habían sugerido tres tipos de estructuras: a) tipo «oxazolona»; b) tipo «beta-lactámica», y c) tipo «tricíclica». En el trabajo de Crowfoot y otros en 1949, se confirma claramente que las tres penicilinas citadas presentan estructuras Beta-lactámicas.

La misma autora Dorothy Crowfoot Hodgkin en 1961 conjuntamente con A. Maslen publica la estructura

cristalográfica de la Cefalosporidina C, a la vez que la estructura aproximada obtenida por medios químicos. Debido a que tanto la Bencilpenicilina como la Cefalosporidina tienen estructura de tipo Beta-lactámico, pueden estudiarse conjuntamente.

La resolución de estructuras cristalinicas de antibióticos de tipo Beta-lactámico con un grado suficiente de precisión, ha permitido a R. W. Sweet realizar un completo estudio de las pequeñas diferencias estructurales que entre ellas existen, y relacionarlas con sus actividades biológicas específicas. Para conseguir tal fin, este autor se basa únicamente en aquellas determinaciones estructurales que le ofrecen las máximas garantías de precisión; podemos citar las más importantes:

- Penicilina (V), Abrahamsson 1963
- Ampicilina (trihidrato), James 1968
- Acido 6-Amino penicilínico (6Apa), Diamond 1963
- Penicilina (G), Crowfoot 1949, Pitt 1952, Vaciago 1960
- Fenoximetil-penicilina, Cooper 1969
- 6 (N-bencil Formanido penicilina), Hunt y Rogers 1964
- Hetaciclina, Hardcastle 1966
- Hidrocloridrato no hidratado de la Cefaloridina, Sweet y Dhal 1970
- Cefalosporidina, C. Sweet y Dhal 1970
- Cefaloglicina, C. Sweet y Dhal 1970
- Acido 7-bromo-acetamido-cefalosporínico (7 Br Ac-Aca), Gorgoutas 1976

Una parte muy importante del estudio de R. M. Sweet es la compara-

ción de las propiedades estructurales de estos antibióticos Beta-lactámicos con otras sustancias del mismo tipo, pero inactivas. Existen cuatro derivados Beta-lactámicos cuyas determinaciones estructurales ofrecen garantías y reúnen la condición de no ser biológicamente activos; éstos son:

- $\alpha$ -fenoxi-etil penicilina (an-pen), Simon y Dhal, 1970
- Fenoxi-metil  $\Delta^2$  acetoxil-cefalosporina (2-ceplan), Sweet y Dhal, 1970 (Syn-cepln), Kaljani y Hodgkin, 1970
- Compuesto sintético Beta-lactámico-tiazolidina (Syn-pen), Gorgoutas, 1970

Todas las comparaciones posibles entre las distintas configuraciones moleculares, distancias y ángulos de enlace, con las diferentes acciones y mecanismos bioquímicos que tienen lugar durante los procesos de acción de estos derivados Beta-lactámicos, permiten llegar a las conclusiones generales siguientes: que la enzima peptido-glicina transpeptidasa bacteriana es poco selectiva, en cuanto a los requerimientos necesarios para reconocer su sustrato; que la penicilina y la cefalosporidina son estereoquímicamente semejantes, aunque no en sus conformaciones detalladas ni en sus dimensiones, pero que el enlace N-CO de su anillo Beta-lactámico tiene un carácter amido inferior que el anillo Beta-lactámico de las sustancias de este tipo, que no tienen acción biológica y que la capacidad de este tipo de compuestos para

interaccionar con las enzimas del proceso de la transpeptidación, que es la clave de su acción antibacteriana, viene condicionada también por esta capacidad de que rápidamente puedan romper el enlace N-CO de los anillos Beta-lactámicos activos.

También son básicas las consideraciones que permiten discutir la permeabilidad de este tipo de derivados para llegar a los lugares en donde se debe producir su actividad.

Cooper y colaboradores demostraron, en 1969, que la conformación molecular de los cristales de fenoxilpenicilina, establecida por difracción de rayos X, era similar a la conformación que presentaba una vez disuelta. Al ser esta sustancia parecida en configuración a la de las penicilinas y a la de los derivados de las cefalosporinas, podría indicarnos que también presenta en solución análoga configuración que en forma sólida cristalina. Podría todo ello explicarse suponiendo que el anillo betalactámico es lo suficientemente rígido como para conservar la misma conformación en estado sólido que en disolución.

Generalizando estos conceptos, una de las principales objeciones que puede hacerse a los intentos de relacionar la estructura cristalina con la actividad biológica, es la variación de la conformación de la sustancia activa en solución, en relación con la estructura cristalina obtenida en estado sólido; siendo éste uno de los aspectos más interesantes a tener en cuenta en todo intento de relación entre estructura cristalina y actividad biológica.

B) *Alcaloides*. Para la descripción de los principales alcaloides, cuya estructura cristalina ha sido estudiada, nos basaremos en la clasificación utilizada por A. L. Mathieson (1967) y que expondremos a continuación.

1) Alcaloides con anillo indol.

Los alcaloides que poseen en su constitución anillo indólico, forman uno de los grupos de productos naturales más estudiados por difracción de rayos X, presentando en su conjunto las estructuras más interesantes y variadas.

Podemos considerarlas agrupadas en tres subtipos:

- a) monoindólico,
- b) bi-indólico, y
- c) dímero.

1 a) Una de las primeras estructuras determinadas de este grupo fue la de la estricnina (1951) en la cual se confirma la configuración en forma de «doble bote» para dos de sus anillos, así como ligeras deformaciones en los restantes anillos. Dentro de este grupo es interesante citar: Clevamina, Ibogaína, Aspidospermina, Ekitamina, Vobasina, etc.

Como resultado interesante de estos estudios, podemos citar los obtenidos por Camerman y Trotter en 1965, que establecen la relación estereoquímica entre la Aspidospermina, la Iboga y los alcaloides de la Vinca, en los cuales se ha reconocido como último producto de degradación la Catarantina.

1 b) En este grupo, una de las estructuras estudiadas y de conformación

compleja es la Vincristina, aislada de la Vinca Rosea, y determinada su estructura por Lipscomb en 1966. La Vincristina está formada por una molécula de Cleavamina y una unidad de Aspidospermina.

1 c) La primera estructura en este grupo fue determinada por T. A. Hamor en 1962, del alcaloide Calicantina, en cuya forma espacial demuestra su acentuada naturaleza dimérica.

## 2) Alcaloides diterpénicos.

Sólo ha sido determinada la estructura de un pequeño grupo de estos alcaloides, siendo el más importante la Lycotomina, al cual pertenecen los alcaloides de los géneros Aconitum y Delphinium. Ha sido estudiada también la estructura de la D (hidroximetil) Aconinona, que presenta una configuración prácticamente idéntica a la Lycoctonina. La Heteratisina presenta un anillo central de siete elementos mientras que, con las pequeñas variaciones los restantes grupos de las moléculas son similares a los alcaloides anteriores.

## 3) Alcaloides de la Eritrina.

Han sido estudiados varios alcaloides de este grupo del Curare: la Eritralina en forma de bromhidrato, la Dihidro beta-eritroidina y la ochotensina, que es un alcaloide de la *Coridalis ochotensis*. La relación entre las dos primeras es evidente, su conformación molecular era discutida y hasta la determinación de la estructura no fue conocida con exactitud. La conformación esquemática de ambas moléculas es semejante, pero tiene un doble enlace diferentemente situado.

Precisamente las controversias surgidas tienen como origen la interpretación de los estudios llevados a cabo mediante dispersión rotatoria, de forma que los resultados obtenidos por difracción hacen que pueda ponerse en duda la aplicabilidad de tal método en moléculas de este tipo.

## 4) Alcaloides de la Ormosia Panamensis.

Aunque de este grupo solamente han sido determinadas dos estructuras, presentan considerable interés, ya que los estudios por difracción de rayos X y por métodos químicos, han permitido conocer, por extrapolación estructural, las bases de otras estructuras de alcaloides de este grupo.

Estas dos estructuras, además, representan a todas aquellas que tienen dificultades en la investigación química cuando el esquema molecular es saturado, y presentan muchos centros de asimetría, que son subsidiarios de los grupos químicos.

Estos dos alcaloides son la Jamina y la Panamina, cuyas estructuras han sido propuestas y resueltas por Karle y Karle en 1964 y 1969, utilizando parcialmente métodos directos.

## 5) Alcaloides de las Himantandraceas.

De la especie de la Calbulimina se han aislado bastantes alcaloides; de ellos han sido estudiados la Himbacina por medios químicos, siendo estos estudios la llave de los restantes derivados.

## 6) Alcaloides Quinozilidínicos.

El primer alcaloide determinado de esta constitución fue la Annotinina en

forma de bromhidrato. Recientemente se ha descubierto y estudiado un grupo de alcaloides que proceden de las Litraceas. El más interesante es la Lythrina, habiéndose determinado la estructura de su éter metílico, en el cual el sistema quinolizidina está claramente enlazado a un sistema bifenílo. El estudio del difracción en la región de los 250 m $\mu$  ha permitido definir la Lytenina tomando como referencia el sentido de giro del grupo bifenílo.

#### 7) Alcaloides de Senecio.

Estos alcaloides poseen en general la propiedad de atacar al hígado y son combinaciones de ésteres de la Pirrolizidina con diácidos o con uno o dos monoácidos. El miembro más importante del grupo es la Jacobina; también se ha estudiado la Retusamina, que es un constituyente de la Crotalaria retusa, y se ha determinado asimismo la estructura de la Senkirkina, alcaloide de la Senecio Kirkii.

#### 8) Morfina y Codeína.

La estructura de la Morfina fue determinada en forma de hidrato por Mackay y D. C. Hodgkin en 1955, y la Codeína lo fue en forma de bromhidrato por Lindsey y Barnes, también en 1955. Ambas estructuras han sido revisadas y afinadas posteriormente por Kartha, Ahmed y Barnes (1962). Los resultados de estas determinaciones han sido ampliamente discutidos y difundidos en todos sus aspectos y, principalmente, desde el punto de vista de su conformación por J. Donahue y Sharma en 1964.

9) Entre otros alcaloides interesantes podemos citar la Quinina, cuya es-

tructura ha sido estudiada en forma de los isomorfos, sulfato y seleniato en 1955, utilizando una proyección bidimensional de Patterson.

A pesar de que solamente hemos citado un reducido número de antibióticos y alcaloides, cuyas estructuras cristalinas han podido ser determinadas, la cantidad de especies químicas naturales es tan asombrosamente elevada y de composición química tan compleja, que todavía queda un enorme e interesante campo de trabajo para su investigación estructural.

#### C) Sustancias cristalinas macromoleculares.

Con este grupo de macromoléculas, podemos constituir varios subgrupos que iremos exponiendo a continuación.

##### a) Proteínas Globulares.

Las proteínas globulares dan lugar, en general, a buenos diagramas de difracción de rayos X, comparables a los de sustancias de mucho menor peso molecular; de todas formas, para obtener los diagramas de estas proteínas con intensidades de difracción apreciables, el tiempo de exposición debe ser evidentemente mucho más elevado que en las sustancias de menor peso molecular. Ello es debido a que los cristales proteínicos están formados por un ordenamiento atómico compacto y tridimensional.

Estas proteínas globulares contienen siempre diferentes cantidades de solvente, que pueden variar desde agua a diferentes mezclas hidroalcohólicas; tanto los diferentes elementos como su cantidad afectan de forma directa al tamaño de la celda elemental, y también al valor de las intensidades difractadas.

Estas intensidades pueden medirse en aire seco y en contacto con sus líquidos madres; la idea original de Bernal estriba en especificar la humedad en cada medida, variándola.

Los tamaños de las celdas unidad, tienden a decrecer alrededor de un 10 % al pasar de la forma húmeda a la seca; en general, la calidad de los máximos de difracción en forma seca es muy inferior a la obtenida en forma más o menos hidratada, debido a que se produce un colapso parcial del perfecto empaquetamiento de la macromolécula. Es de gran utilidad comparar los datos de las celdas elementales obtenidas en macromoléculas, ya por medio de microfotografías, procedentes del microscopio electrónico, ya por difracción de rayos X.

Podemos considerar como términos extremos de la escala de tamaños de la celda elemental, desde la correspondiente a la Ribonucleasa, hasta la del virus del mosaico del nabo, y entre las cuales se mueven los tamaños de las demás. Así la celda elemental de la Ribonucleasa presenta asimismo los valores a 30, 9 Å, b = 30, 8 Å, c = 54, 1 Å de grupo espacial  $P_{21}$ , determinada en

atmósfera seca. La celda elemental del virus del mosaico del nabo que pertenece al sistema cúbico, presenta para cada una de sus constantes, el valor 728 Å.

El número de reflexiones obtenidas por difracción de rayos X es función del volumen de la celda elemental y comporta que en las macromoléculas haya que medir y tratar un enorme número de reflexiones.

El peso molecular de las moléculas proteínicas en el cristal únicamente puede fijarse si se conoce el número de moléculas asociadas a cada celda elemental. El número de unidades asimétricas por celda elemental se obtiene directamente del grupo espacial, y los pesos moleculares calculados deben ser submúltiplos de los pesos moleculares calculados en solución.

La Hemoglobina, por ejemplo, cristaliza en el grupo espacial C2, el cual requiere cuatro unidades asimétricas por celda en posición general, pero el peso molecular determinado por presión osmótica es de 68.000; y se aproxima al calculado por difracción si consideramos únicamente dos moléculas por celda unidad. Ello nos indica que la molécula de Hemoglobina está constituida por dos unidades asimétricas idénticas entre sí, de peso molecular 34.000.

Algo similar ocurre en la insulina-zinc romboédrica; su peso molecular calculado requiere considerar tres unidades asimétricas por celda

elemental (12.000) y el peso molecular en solución neutra es de 48.000. Este valor se ha comprobado al disolver la insulina en solución de pH bajo, siendo entonces su peso molecular del orden de 12.000 por unidad asimétrica, incluyendo la celda elemental cuatro unidades asimétricas, ya que esta insulina es rómbica.

El principal inconveniente en la determinación estructural de proteínas globulares es la ausencia de átomos pesados necesarios para utilizar el «método del átomo pesado» o el «método de las sustituciones isomorfas».

La hemoglobina por ejemplo, contiene un átomo pesado, el hierro, pero su fórmula empírica es  $C_{738}H_{1166}O_{208}N_{208}S_2Fe$ , y por lo tanto en su función Patterson no pueden encontrarse los vectores Fe-Fe necesarios para la interpretación en los mapas de densidad Patterson.

Evidentemente, esto implica el que sea necesario utilizar otros derivados con átomos pesados, para llevar a cabo una síntesis diferencial de Patterson. Todo ello hizo que Kendrew y colaboradores en 1958 encaminaran todos sus esfuerzos a obtener derivados con átomos pesados; para ello prepararon una serie de reactivos capaces de introducir átomos pesados, como mercurio, plata, oro, yodo, etc.

El mercurio, por medio del P-Cloro benzoato de mercurio, fue introducido en la hemoglobina de caballo; el yodo en forma de yodofenol y el

uranio en forma de complejo de la Ribonucleasa, etc.

En muchas proteínas globulares los máximos de difracción se concentran en el centro del diagrama, debido al rápido incremento del ángulo de Bragg; es este especialmente el caso de los cristales húmedos.

Ello hace que el número de reflexiones que pueden medirse sea pequeño y que además los límites de cada reflexión sean poco precisos, lo que comporta una gran imprecisión en los mapas de densidad electrónica.

Para la mayoría de proteínas estudiadas y debido a todas las dificultades explicadas, no ha sido posible llegar a identificar las coordenadas de los átomos en sus mapas de densidad electrónica.

Podemos enumerar varios problemas que aumentan, si cabe, las dificultades que se hallan para la determinación estructural de este tipo de proteínas, como son el desorden, y su sensibilidad a la temperatura y a las propias radiaciones X.

- a) La ribonucleasa, enzima purificada del páncreas, cristaliza en diversas formas, tal como demostró D. Harker en 1956; la forma estudiada por Carlisle también en 1956, pertenece al grupo espacial  $P_{21}$  y por lo tanto es monoclinica, el valor de Z es igual a dos, y sus dimensiones varían con la humedad; en forma seca  $a = 30, 90 \text{ \AA}$ ,  $b = 30, 90 \text{ \AA}$   $c = 54 \text{ \AA}$  siendo  $\beta = 106^\circ$ , mien-

tras que en forma húmeda  $a = 29, 1 \text{ \AA}$ ,  $b = 30, 08 \text{ \AA}$ ,  $c = 51, 03 \text{ \AA}$  y  $\beta = 114^\circ$  por ser sus pesos moleculares 15.000 y 13.400 respectivamente.

Sus diagramas de rayos X presentan grandes diferencias en función de los tiempos de exposición. Otra característica de estos diagramas es la intensidad de las reflexiones, siguiendo una serie de anillos alrededor de su centro; estas fluctuaciones son alternativas en cuanto a intensidad y aparecen a 5, 10, 15  $\text{\AA}$ , etc., indicándonos que los átomos se sitúan a ciertas distancias preferentes, aunque sin embargo no nos indican direcciones preferenciales.

La interpretación de los máximos de densidad electrónica ha dado lugar a diferentes modelos estructurales (Magdorff, Crick y Luzzati, Carlisle y Kartha).

b) La Insulina también cristaliza en varias formas; su solución ácida es rómbica, de grupo espacial  $P2_12_12_1$  y el tamaño de celda es de  $44 \times 51 \times 30 \text{ \AA}$ , dando diagramas de rayos X relativamente buenos.

La primera síntesis tridimensional de Patterson fue realizada por Low, utilizando el sistema electromecánico (X-RAC), obteniéndose en su proyección una red realmente ordenada y la sección de  $Z = 1/2$  mostrando una fuerte distribución en cadenas moleculares y paralelas.

Saenger, en 1953, completa estos estudios demostrando que la estructura de la Insulina está formada por dos cadenas polipeptídicas, quedando una cantidad de máximos residuales en el diagrama, que hacían dudar de su interpretación. Lindley y Rollet en 1955 y de nuevo Saenger en 1956 encuentran que de tres enlaces S-S, dos están situados entre las cadenas denominadas A y B, y el tercer enlace está situado en la cadena A.

Finalmente es D. Hocgkin con su equipo quien resuelve definitivamente la estructura, lo que le valió recientemente la concesión del premio Nobel.

c) La Mioglobina es también una proteína de peso molecular relativamente bajo después de purificada, cristaliza muy bien, y sus derivados con átomos pesados han sido estudiados por Kendrew y colaboradores en 1958; la preparación de los primeros derivados con átomos pesados fue de Perutz, que ha sido uno de los pioneros en el estudio de todas las Hemoglobinas.

La forma más conocida ha sido la monoclinica de grupo espacial  $P2_1$  y de parámetros  $64 \times 32 \times 34 \text{ \AA}$  y  $\beta = 105^\circ$ ; la posición de los átomos pesados fue determinada por el Método de Patterson, logrando asignar las fases de 400 reflexiones. Kendrew, en 1959, con estos datos, obtuvo unos mapas de densidad electrónica que permitieron «a grosso modo» suponer el esquema de la

estructura de las cadenas proteínicas.

d) Desde el punto de vista cristalográfico las proteínas más estudiadas han sido evidentemente las proteínas del grupo de la Hemoglobina. Perutz y colaboradores han trabajado largo tiempo para lograr establecer unos modelos que aunque imprecisos, fueran aceptables.

Las hemoglobinas más estudiadas proceden de las glándulas de mamíferos: caballo, carnero, hamster y hombre, y siendo todas ellas similares en cuanto a peso molecular, volumen de la celda elemental, etc. El valor de los parámetros de la celda elemental es función directa de la tensión de vapor a que puede encontrarse sometida la proteína. Esta propiedad ha permitido obtener diagramas de difracción de rayos X a diferentes tensiones de vapor y, por medio de un ingenioso mecanismo, asignar fases a las reflexiones obtenidas, permitiendo de esta forma conseguir mapas de densidad electrónica, pero cuya interpretación es muy difícil debido al grosor de estas proteínas.

e) Otras proteínas globulares han sido estudiadas desde el punto de vista cristalográfico, entre ellas la Lisozima, el polipéptido Gramicidina-S (Soviet Gramicidin, preparado del *Bacillus brevis*) y Mioglobinas, Quimotripsina, Pepsinas, etc.

f) Han sido igualmente estudia-

dos en estos últimos veinte años, numerosos virus, utilizando las técnicas cristalográficas de difracción de rayos X. Estos estudios han estado condicionados preferentemente por las técnicas de separación, aislamiento, crecimiento, y demás técnicas biológicas que permiten obtener cristales de virus.

Las partículas víricas pueden presentarse en formas poliédricas casi esféricas o en forma alargada; los virus de forma alargada no son verdaderos cristales y es muy lógico clasificarlas dentro del grupo de macromoléculas fibrosas.

Los virus están formados por proteínas y ácido nucleico; sorprendentemente, el peso absoluto del ácido nucleico que contienen las partículas víricas es muy parecido ( $3,10^{-18}$  gramos), en todas las diferentes especies, razas y cepas, mientras que el peso total de la partícula vírica puede llegar a ser 100 veces superior de una especie respecto a otra. Esto demuestra que la variación básica entre las diferentes especies se encuentra en la proteína, mientras que el ácido nucleico es muy parecido y sólo esencial para la multiplicación del virus.

Los virus en los cuales ha sido posible el estudio cristalográfico proceden en su mayoría de especies vegetales, debido a que las técnicas biológicas han permitido manejarlos con más facilidad que los virus originados en especies animales.

El virus de la necrosis del tabaco, que fue estudiado por difracción de

rayos X, en primer lugar D. Crawford Hodgkin en 1951, pertenece al sistema triclinico con una celda elemental de  $179 \times 219 \times 143 \text{ \AA}$  y de ángulos próximos a  $90^\circ$ ; el tamaño medido por microscopía electrónica es muy parecido al determinado por difracción de rayos X (alrededor de  $240 \text{ \AA}$  de diámetro).

El virus del tomate fue examinado por primera vez por Bernal, Frankuchen y Riley, demostrando a los rayos X su perfecta cristalización, en forma de cubo y dodecaedro pentagonal; los primeros estudios indican que pertenece a una red cúbica centrada en el interior de lado igual a  $394 \text{ \AA}$ . Posteriormente Carlisle estudió también grandes cristales del mismo virus, de aproximadamente  $0,5 \text{ mm}$  de lado, en forma dodecaédrica; los parámetros determinados fueron de  $386 \text{ \AA}$  en forma húmeda y de  $314 \text{ \AA}$  en forma seca. Estos resultados confirmaron los obtenidos por microscopía electrónica. Kasper, en 1956, determinó el grupo espacial, que es el I 23 (número 197 en las tablas internacionales); en este grupo espacial, las «moléculas» en la célula unidad están relacionadas por ejes binarios y ternarios.

Los últimos estudios de este virus sugieren una disposición semejante a la de los virus de la necrosis del tabaco.

Es de gran interés el virus de la Poliomieltis, que ha sido estudiado por difracción de rayos X. Cristaliza en el sistema rómbico y sus pa-

rámetros son  $a = 353 \text{ \AA}$ ,  $b = 378 \text{ \AA}$ ,  $c = 320 \text{ \AA}$  presentando una celda pseudocúbica. Las reflexiones medidas y sus extinciones hacen suponer que poseen una red centrada en el interior; estos estudios fueron iniciados por Klug en 1959.

#### b) *Sustancias macromoleculares fibrosas*

Los polímeros fibrosos presentan problemas de diferente tipo a los que presentaban las sustancias cuyos cristales podían considerarse como monocristalinos. De todas formas, la información que se obtiene por difracción de rayos X varía según el tipo de fibra y puede ir desde unos simples polímeros lineales, hasta los ácidos nucleicos.

Los polímeros lineales pueden proceder de procesos de síntesis y por lo tanto de composición química determinada, o bien pueden originarse en el campo biológico. En el primer caso, son generalmente isótropos cuando se examinan con luz polarizada. Para algunas propiedades mecánicas presentan anisotropía. En el segundo caso pueden ser isótropos como el caucho, o anisótropos como los pelos, plumas, cutículas, etc.

En los diagramas de difracción de rayos X en cristales orgánicos o inorgánicos, con unidades monoméricas definidas, se requiere que el cristal gire u oscile para poder calcular la red cristalina; la difracción en los polímeros lineales produce

efectos diferentes y no es necesaria la rotación u oscilación frente a los rayos X.

Las fibras naturales pueden tener diferente comportamiento frente a los rayos X, dependiendo de su tratamiento y propiedades mecánicas, térmicas, etc. Estos defectos podríamos resumirlos de la siguiente forma:

1. Cuando el material es isótropo, pueden observarse dos efectos: el primero es la presencia de ligeros halos difusos concéntricos, con el haz directo y que son muy similares a los que presentan los «cristales líquidos», y el segundo, estos mismos halos difusos, rodeando a finos anillos de difracción similares a los que se producen en los diagramas de polvo cristalino.

2. Cuando el material fibroso es anisótropo, los diagramas de rayos X presentan ya máximos de difracción más o menos limitados y definidos, aunque evidentemente con gran cantidad de radiación difusa y presentando según su grado de perfección igualmente anillos de difracción, e incluso algunas veces halos difusos.

La interpretación de estos efectos de forma simple es sencilla, pero si queremos medir las intensidades difractadas y obtener conclusiones estructurales comparables a las que se obtienen en monocristales, el problema se torna de difícil solución, y

de un poder de resolución muy inferior al que se consigue en dichos cristales.

Además, en los casos más favorables, la mayoría de las reflexiones medidas se encuentran situadas en la región central del diagrama, o sea a bajos ángulos de Bragg, y en consecuencia son siempre muy pocas las reflexiones que finalmente pueden medirse con cierta precisión.

Existe evidentemente el mismo problema para establecer la celda elemental y asignar índices a las reflexiones; y debido a que éstas, en general, son muy escasas, nunca tendremos la absoluta seguridad sobre la validez de los valores obtenidos para dicha celda elemental.

Como ya hemos expuesto, el método de Patterson permite calcular las fases de los haces difractados; en este caso, si las fibras contienen un pequeño número de átomos pesados, el método puede ser considerado como válido para estudiar las características de los vectores interatómicos y establecer un modelo estructural.

#### a) *Proteínas fibrosas*

La materia constituyente de las plantas está formada, básicamente por un conjunto de polisacáridos, mientras que en los animales, los constituyentes básicos son las proteínas fibrosas.

Podemos considerar en este apartado algunos materiales de este tipo

que pueden considerarse interesantes, como por ejemplo, tendones, uñas, lana, pezuña, cuernos, etc. La actividad química y la insolubilidad de estos materiales han sido estudiados a fondo, tanto por métodos químicos como físicos y en particular utilizando la difracción de rayos X. No está realmente clara, en estas proteínas fibrosas, su composición, y ni tan siquiera la distribución de sus aminoácidos. Por ejemplo, el colágeno está formado aproximadamente por un 23 % de cistina y cisteína, un 29,1 % de prolina e hidroxiprolina, 27,1 % de glicina, un 9,5 % de alanina, y un 3,4 % de serina, mientras que otras proteínas fibrosas contienen un porcentaje totalmente diferente de estos aminoácidos.

El profesor W. T. Atsbury, director del Departamento de Estructuras Biomoleculares de la Universidad de Leeds, en Inglaterra, puede considerarse como el iniciador de los estudios por difracción de rayos X en las proteínas fibrosas; sus primeros trabajos de importancia en este campo se remontan al 1940, en los que intenta clasificar estas proteínas.

Se aplica la denominación de Queratina a todas aquellas proteínas fibrosas cuyos diagramas de rayos X son semejantes al de la Queratina de la lana, a pesar de que su composición química sea muy diferente. Por estas razones Atsbury, en 1947, clasificó estas fibras en dos tipos:  $\alpha$ -Queratina y  $\beta$ -Queratina, según

sus característicos diagramas de rayos X. Para ello se basa en las reflexiones fuertes, obtenidas por difracción de rayos X en sus respectivos espaciados reticulares. Así la  $\gamma$ -Queratina presenta sus reflexiones más fuertes a 9,8 Å y 0,1 Å, mientras que la  $\beta$ -Queratina lo hace a 9,7 Å a 4,66 Å, y a 3,33 Å. Por ejemplo, la Miosina en solución pertenece al grupo de las  $\alpha$ -Queratina; cambiando las condiciones físico-químicas pueden llegar a obtenerse diagramas típicos de la  $\beta$ -Queratina. La Epidermina normalmente da lugar a un diagrama tipo  $\gamma$ , pero en etanol se obtiene el de tipo  $\beta$ . El fibrinógeno, cuando precipita y se orienta, da lugar a diagramas de tipo  $\beta$ , así como la *Flagella vulgaris*.

Un modelo estructural para la  $\beta$ -Queratina ha sido posteriormente modificado por Meyer y Mark, Pauling y Corey, etc.

De la misma forma Atsbury propuso el modelo de la  $\alpha$ -Queratina, que fue ampliamente discutido alrededor de los años 50 y 60; trabajaron sobre ello Huggins, Taylor, Zattu y Mizushima, pero fueron de nuevo Pauling y Corey quienes propusieron el modelo de la  $\alpha$ -Queratina; a este modelo se le denominó  $\alpha$ -Helix, en el cual los aminoácidos componentes se distribuyen más o menos simétricamente a lo largo de un eje helicoidal. De la misma forma estos autores propusieron el modelo  $\alpha$ -Helix, del cual no existen pruebas demasiado convincentes por difracción de rayos X.

b) *Acidos nucleicos*  
y *nucleoproteínas*

Los ácidos nucleicos constituyen la mayor parte de los núcleos de las células de los animales y de las plantas, y también están presentes en el citoplasma de algunas células, particularmente en las hepáticas. Su peso molecular llega a ser del orden de  $10^5$  a  $10^7$ ; su hidrólisis da lugar a bases derivadas de la purina y de la pirimidona, azúcares y ácido fosfórico. Los azúcares componentes pueden ser la Ribosa o la D-2-deoxirribosa, según proceden de ácidos ribonucleicos (R.N.A.) o ácidos desoxirribonucleicos (D.N.A.), aunque en realidad éstos son polinucleótidos.

Estos azúcares componentes de los ácidos nucleicos no son idénticos en todos ellos.

En el estudio de los ácidos nucleicos generalmente se utilizan los procedentes del Timo, o sea el ácido timonucleico, que es el D.N.A.

Atsbury y colaboradores, en 1947, estudiaron por difracción de rayos X la sal sódica del ácido timonucleico, proponiendo un modelo estructural que consideran un apilamiento de los nucleótidos en forma de columna, basado en las fuertes reflexiones obtenidas a 3,4 Å

Finberg modifica el modelo de Atsbury y posteriormente Pauling y Corey sugieren un nuevo modelo de triple hélix que presenta serios inconvenientes cuando se procede a

su comprobación por rayos X. Teniendo en cuenta estas dificultades Watson y Crick (1953) sugieren otro modelo de doble hélix, siguiendo el mismo eje pero en sentidos opuestos.

\* \* \*

Esta rápida revisión no tiene más objetivo que presentar el estado actual de una de tantas partes de la ciencia como es la Biocristalografía aplicada al desarrollo de la Medicina.

Habréis podido observar que a pesar de los grandes avances que se han producido tanto en las concepciones teóricas como en los métodos prácticos, en la gran diversidad y perfección de los aparatos científicos dotados de los últimos modelos de computadoras, de los numerosos equipos de hombres de ciencia de gran capacidad intelectual dedicados al estudio de las estructuras de las grandes moléculas que constituyen los materiales del mundo biológico, estamos todavía en los primeros balbuceos.

Es de esperar que en un próximo futuro, estos y otros hombres de ciencia puedan sorprender el secreto estructural de estas macromoléculas que tan celosamente esconden en su seno. Estamos seguros de que su descubrimiento constituirá un gran paso para la Biología, la Fisiología, la Bioquímica en sus aplicaciones médicas, y en definitiva para el bienestar del hombre. He dicho.