

22
26j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE BASES
NITROGENADAS DESACOPLANTES EN LA
FOTOSINTESIS"

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO

Presenta:

Beatriz King Díaz

México, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES 1987
FAC. DE QUIMICA



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 está 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.

INDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES	
- Fotosíntesis	6
- Morfología del Cloroplasto	7
- Flujo de Electrones en la Fotosíntesis	8
- Acoplamiento del Transporte de Electrones a la Síntesis de ATP	15
i) Hipótesis Químico-osmótica	16
ii) Hipótesis de Williams	19
- Relaciones Estructura-Actividad	24
- Parámetros Hidrofóbicos.	25
- Parámetros Electrónicos	27
- Parámetros Estéricos	27
MATERIAL Y METODOS	30
RESULTADOS Y DISCUSION	31
GRAFICAS Y TABLAS	53
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA	71
AGRADECIMIENTOS	74

ABREVIATURAS

ADP , ATP

CFI

DAD

DEMB

DCMU

DCIP

FS I

FS II

h_v

μM

MV

NADPH

P ó Pi

rpm

t. e⁻.

t. e⁻. b.

Adenosín Di y Trifosfato.

Factor de Acoplamiento de la enzima ATP-sintetasa.

DiaminoduroI.

Dibromometil-isopropil-p-benzoquinona.

Diclorofenil-dimetilurea.

Diclorofenol Indofenol.

Fotosistema I

Fotosistema II

Fotón de luz

micro molar

Metilviológeno.

Nicotín adenín dinucleótido reducido.

Fosfato inorgánico.

Revoluciones por minuto.

Transporte de electrónes.

Transporte de electrones basal.

INTRODUCCION

En el presente trabajo, se estudio el efecto desacoplante sobre la fotosíntesis de algunas aminas alifáticas y compuestos nitrogenados, relacionando la actividad desacoplante de los compuestos con su pK_b y el logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$). El objetivo fue el de encontrar una relación estructura-actividad de los compuestos así como el de tener mayor información acerca del mecanismo de desacoplamiento, proceso inverso al acoplamiento, este último proceso existe entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP.

El trabajo se basó en la teoría de Mitchell la cuál sugiere que los desacoplantes son protonóforos, es decir, actúan acarreando protones a través de la membrana tilacoidal y en combinación con la teoría de Williams que sugiere protones anhidros que se encuentran en la fase membranaral del tilacoide de donde son extraídos por los desacoplantes.

Los resultados de desacoplamiento obtenidos, medidos como incremento de la velocidad del transporte de electrones basal al incrementar las concentraciones de los compuestos desacoplantes, indican que el desacoplamiento no guarda ninguna relación con la basicidad, ya que se tienen compuestos muy básicos (triethylamina, etilamina, etc.) y no básicos (amidas) con mínimas potencias desacoplantes e iguales, lo que nos sugiere que en el desacoplamiento no es necesaria la protonación de los desacoplantes, por lo que éstos no actúan sólo como protonóforos.

Por otro lado, tampoco los logaritmos de los coeficientes de reparto guardan una correlación con las actividades fotosintéticas medidas como velocidad del flujo de electrones en pre-

sencia del compuesto nitrogenado, debido a que encontramos compuestos muy solubles en agua o compuestos muy solubles en lípidos con máxima potencia y con valores semejantes como desacoplantes. Estos resultados sugieren que no todos los compuestos nitrogenados actúan como acarreadores de protones a través de la membrana, lo que no está de acuerdo con la hipótesis de Mitchell. Por otro lado los datos de pKb no guardan correlación alguna con el desacoplamiento de los compuestos nitrogenados ensayados, por consiguiente se sugiere que no actúan como protonóforos, es decir, acarreadores de protones a través de la membrana. Por último al realizar una correlación tipo Hansch, no se encontró una relación estructura-actividad en los compuestos.

ANTECEDENTES

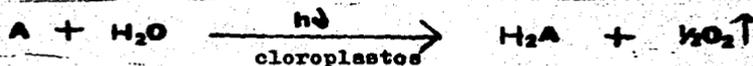
- Fotosíntesis.

La fotosíntesis se define como la utilización de la energía de la luz solar por los cloroplastos de las plantas para ser convertida en energía química.

En 1937 Robert Hill intentó estudiar las reacciones de la fotosíntesis trabajando con cloroplastos aislados, en lugar de plantas intactas y descubrió que los cloroplastos eran capaces de producir oxígeno fotoquímicamente en presencia de un agente oxidante apropiado, como el oxalato-férrico-potásico. En esta reacción el ión férrico sustituye al CO_2 como agente oxidante durante la fotólisis del agua.



En los cloroplastos aislados, el oxígeno se desprende estequiométricamente a la cantidad del agente reductor añadido. Esta reacción se conoce como reacción de Hill en concordancia con la siguiente ecuación:



en donde A representa un aceptor de hidrógenos y H_2A es su forma reducida. También a "A" se le ha llamado reactivo de Hill, por lo tanto el oxalato-férrico-potásico se conoce como reactivo de Hill.

- Morfología del Cloroplasto.

Se ha encontrado que la forma de los cloroplastos es diversa, dependiendo de la planta en estudio ya que puede tener tanto forma ovalada como esférica y su tamaño puede variar de 5 a 10 μ (.24).

Los cloroplastos son los organelos de la célula que dan el característico color verde a las plantas; son estructuras complejas, separadas del citoplasma de la célula por una doble membrana. Dentro de los cloroplastos hay una elaborada red de membranas plegadas llamadas lamelas; a su vez las lamelas forman estructuras llamadas grana, la cuál está separada por un material conocido como estroma, dicho estroma contiene granes de almidón, grasa, ribosomas, ácido desoxirribenucleico (DNA) y fundamentalmente las enzimas del ciclo de Galvín.

La grana parece estar constituida por densos sacos membranosos apilados llamados tilacoides, en la membrana de los tilacoides se encuentran localizados los pigmentos fotosintéticos y el sistema transportador de electrones. Se pueden distinguir dos tipos de cloroplastos (figura 1); de clase I con doble membrana externa y de clase II sin doble membrana externa, por lo cuál puede contar únicamente con los tilacoides que pueden estar apilados o no.

En el mecanismo general de la fotosíntesis se han diferenciado dos fases fundamentales; una oscura y otra luminosa. La primera (34) consiste en el denominado ciclo de Galvín, en donde se efectúa la asimilación de CO₂, para rendir finalmente una molécula de hexosa, previo consumo de 12 moléculas de NADPH y 18 moléculas de ATP generadas en la fase luminosa y la reincorporación de 6 moléculas de CO₂, hechos que suceden en el estroma del cloroplasto.

Durante la fase luminosa, objeto de estudio en este traba

jo, suceden una serie de reacciones en la membrana de los tilacoides, donde se localiza la cadena transportadora de electrones de $H_2O \rightarrow NADP^+$. El orden de las reacciones es el siguiente: absorción de energía radiante, transferencia de energía, separación de cargas, transporte de electrones, fotólisis del agua, desprendimiento de oxígeno, síntesis de ATP y reducción de $NADP^+$.

- Flujo de Electrones en la Fotosíntesis.

El transporte de electrones involucrado en la fotosíntesis procede en contra de un potencial de energía de cerca de 1.2 volts, por lo que hay razón para creer que en los organismos fotosintéticos un solo quantum de luz no es capaz de vencer esta barrera; lo que parece dar lugar a que sean requeridos dos quantum de luz para el transporte de cada electrón. Esta hipótesis está soportada por numerosos experimentos; además esta de acuerdo con una importante observación hecha por Robert Emerson de la Universidad de Illinois hace casi 30 años. Emerson encontró la evidencia de que hay dos sistemas de pigmentos en las plantas que preferencialmente absorben luz de escasamente diferente longitud de onda (o color), implicando con esto que el transporte de electrones se lleve a cabo en dos escenarios principales e involucre dos eventos fotoquímicos (21).

El esquema del transporte de electrones en la fotosíntesis (figura 2) está basado en el modelo propuesto por Robert Hill y Fay Bendall (13). El proceso empieza con la absorción de un fotón por la antena del sistema de pigmentos II. La energía de excitación es transportada a una molécula de clorofila en el centro de reacción de una unidad fotosintética; la molécula está designada como P680 porque una de sus bandas en el

espectro de absorción se encuentra a 680 nanómetros. P680 excitado transfiere un electrón al aceptor Q, y subsecuentemente recobra un electrón del donador Z. Después de que Z ha donado cuatro electrones los recobra al oxidarse dos moléculas de agua. (Trabajos sobre la cinética del desprendimiento de oxígeno llevados a cabo por Pierre Joliot del Institut de Biologie Physico-Chimique en Paris y Bessel Kok del Research Institute for Advanced Studies en Baltimore (5) han mostrado que se desprende una molécula de oxígeno después de que Z ha donado cuatro electrones y así acumulado cuatro cargas positivas; Z restablece su neutralidad por la recuperación de cuatro electrones provenientes de dos moléculas de agua. Los átomos de oxígeno del agua forman una molécula de O_2 y los cuatro protones restantes entran a la solución como iones positivos).

Desde Q el electrón pasa a través de una serie de moléculas acarreadoras, incluyendo B, la cuál no ha sido identificada, una plastoquinona (PQ), citocromo f (Cyt_f) hasta plastocianina (PC), la cuál es una proteína que contiene cobre. La plastocianina inyecta el electrón al sistema de pigmentos I. La clorofila del centro de reacción del sistema de pigmentos I, designada como P700, es excitada a través de su antena de pigmentos y promueve un electrón al aceptor X ó P430. Finalmente el electrón pasa a una sulfo-ferro-proteína llamada ferredoxina reduciéndola (FRS), la ferredoxina (FD) y la enzima ferredoxina-NADP⁺ reductasa (R) reduce el nicotín adenín dinucleótido fosfato (NADP⁺), el cuál en su forma reducida se abrevia como NADPH. El NADPH es un producto primario en estas reacciones. En adición, durante la transferencia de dos electrones se genera ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Un sitio para la generación de ATP está entre plastoquinona y citocromo f; el otro es asociado con el sistema II pero no se ha localizado. El

NADPH y el ATP manejan el proceso por el cuál el CO_2 es incorporado a los carbohidratos (2), multiples de la unidad CH_2O . Tambien hay un sistema cíclico en la fotosíntesis en el cuál los electrones pasan de P700 a X y regresan a P700.

Embebidos en la membrana del tilacoide se encuentran los pigmentos moléculares que inician el proceso de la fotosíntesis. Dichos pigmentos son sustancias que, por definición, absorben fuertemente la luz visible (11); la mayoría absorbe en sólo ciertas regiones del espectro.

Tres principales variedades de clorofila se distinguen por pequeñas diferencias en su estructura, en una región del anillo porfirínico (5). La clorofila a, la forma más abundante, se encuentra en las plantas superiores y todas las algas, presentan un grupo metilo en esa posición ($-\text{CH}_3$). En la clorofila b, que está localizada sólo en plantas superiores y algas verdes, el grupo metilo es reemplazado por un grupo aldehído ($-\text{CHO}$). Finalmente, la bacterioclorofila forma de pigmentos establecidos en bacterias fotosintéticas, un enlace sencillo es sustituido por uno doble en el anillo conjugado y se agregan dos átomos de hidrógeno, figura 3.

Aunque las clorofilas, indudablemente, son los pigmentos más importantes de las plantas, no son los únicos presentes ni los que participan solamente en la absorción de la luz; se encuentran también los carotenoides en bacterias, algas y plantas superiores. Consisten en largas cadenas de átomos de carbono unidos por enlaces dobles y conjugados, formando un anillo de 6 carbonos en cada extremo; están divididos en dos clases; los carotenos que son hidrocarburos que contienen hidrógeno y carbón solamente, se reportan en dos formas α y β carotenos; y los carotenoles que son alcoholes y cetonas, que contienen oxígeno además de hidrógeno y carbono, tales como luteína y

sexantina. Otra categoría de los pigmentos son las ficobilinas, que están divididas en ficoeritrobilina que se encuentra solo en algas rojas y azul-verdes, las moléculas de ambos tipos tienen un anillo cerrado, relacionado a la estructura porfirínica de la clorofila, pero en las ficobilinas el anillo es tá unido a un componente proteico.

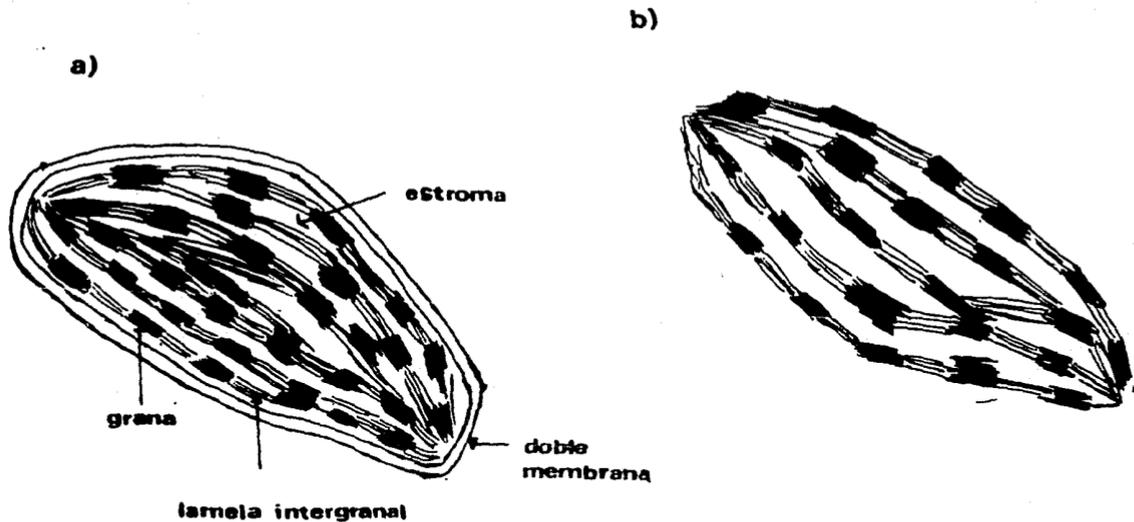


Figura 1. a) Cloroplasto clase I con doble membrana externa, mostrando la disposición de sus componentes. b) Cloroplasto clase II sin doble membrana externa.

Potenciales oxido-reducción

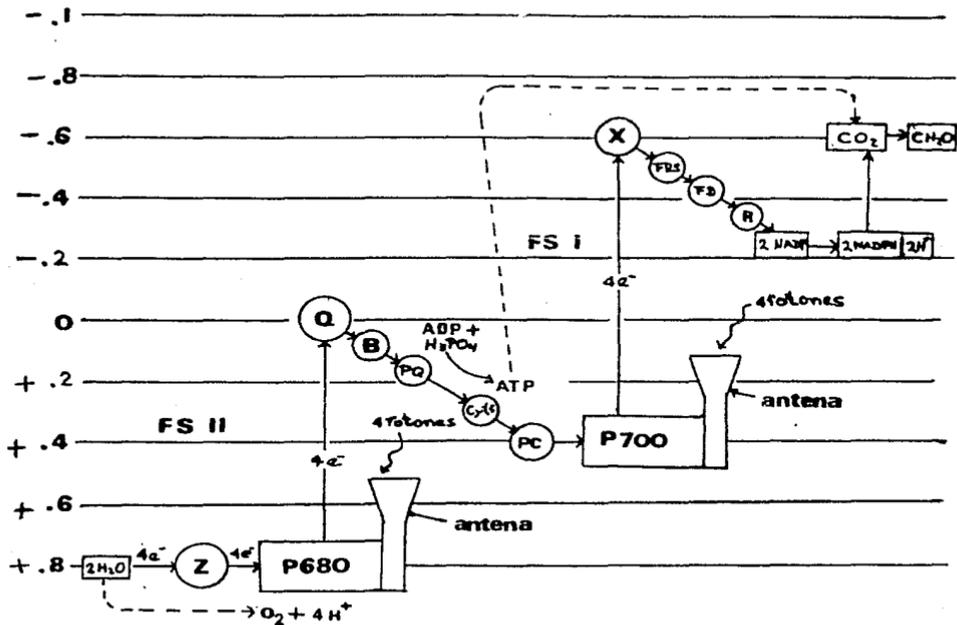


Figura 2. Esquema del transporte de electrones en la fotosíntesis.

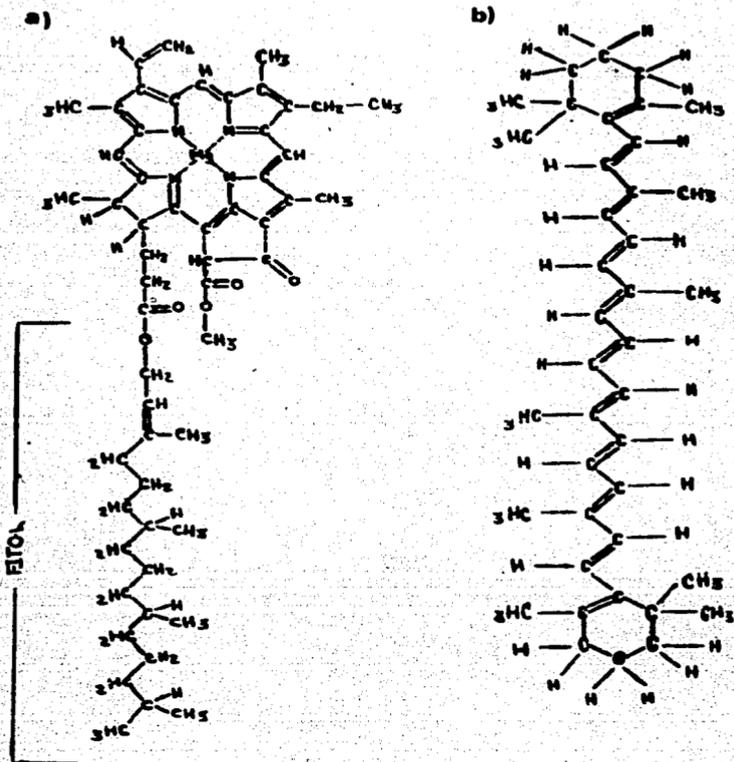


Figura 3. a) En la clorofila, los enlaces conjugados se encuentran en un complejo anillo porfirínico; unido al anillo está una "cola" llamada fitol hecha de átomos de carbono unidos por enlaces sencillos. La estructura mostrada pertenece a la clorofila *a*. b) Otros pigmentos que participan en la absorción de la luz son los carotenos. En los carotenos los enlaces conjugados se localizan en una larga cadena de átomos de carbono que tiene en cada extremo un anillo cíclico.

- Acoplamiento del Transporte de Electrones a la Síntesis de ATP.

La energía luminosa que se transforma en energía química se conserva en moléculas de ATP, que es la moneda energética que usan las células para el manejo de la energía. La síntesis de estas moléculas de alta energía es un proceso acoplado al flujo de electrones, inducido o desencadenado por la luz, es decir, no puede haber síntesis de ATP si no hay flujo de electrones y este flujo electrónico tampoco continúa si no se forma ATP simultáneamente.

A pesar de la gran importancia del fenómeno y de los gran des esfuerzos desarrollados para entenderlo, todavía estamos lejos de conocer el mecanismo de acoplamiento por el cuál un flujo de equivalentes reductores pueden dar lugar a la formación de moléculas de alto contenido energético (ATP).

Una de las formas de abordar este problema, es estudiar el proceso inverso, el mecanismo de desacoplamiento, lo cual se logra empleando sustancias llamadas desacoplantes, tales como aminas alifáticas, atebrina, clorpromazina, gramicidina S, octilguanidina, nigericina, FCCP, CCCP, tiofosfato y otros, los cuales ocasionan la anulación de la fosforilación sin inhibir el transporte de electrones. El transporte de electrones liberado de la restricción impuesta por el mecanismo de acoplamiento se acelera gradualmente, al mismo tiempo que la síntesis de ATP disminuye.

Para explicar el acoplamiento del transporte de electrones a la síntesis de ATP, se han postulado algunos mecanismos tales como la hipótesis Química propuesta por Slater (23,10), la hipótesis Químio-ósmótica y la hipótesis propuesta por R. J. P. Williams.

En este trabajo solo mencionaremos la hipótesis Químio-ósm

mética y la hipótesis de Williams, ya que son de especial interés para su desarrollo.

1) Hipótesis Químico-osmótica.

En 1961 Peter Mitchell (18) propuso un mecanismo de acoplamiento entre la transferencia de electrones y la síntesis de ATP llamada "Teoría Químico-osmótica" ; Mitchell sugiere que el flujo de electrones a lo largo del sistema de moléculas transportadoras de hidrogeniones cargados positivamente en la membrana del tilacoide, crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. El gradiente consta de dos componentes: una diferencia en la concentración de iones hidrógeno o gradiente de pH y una diferencia de potencial electroquímico. El gradiente electroquímico y el gradiente de protones se deben a la acumulación de hidrogeniones en los tilacoides del cloroplasto, cuando se transportan los protones de afuera hacia adentro por medio de las plastoquinonas y la fotólisis del agua, depositándose en el espacio intratilacoidal. La síntesis de ATP se lleva a cabo por el flujo de protones en sentido inverso por el canal a favor del gradiente en presencia de ADP y fosfato inorgánico que son usados por la enzima llamada factor de acoplamiento uno, CFl.

La hipótesis de Mitchell puede ser descrita en cinco postulados mayores:

a. Las reacciones principales ocurren en una membrana impermeable o casi impermeable a protones (e iones hidroxilo), la cual encierra un espacio interno. Ya que las partículas de cloroplasto sin la doble membrana externa, efectúan la fotofosforilación, se asume que el espacio interno importante es el de los tilacoides, el cual permanece intacto bajo la mayoría de las condiciones.

b. La membrana tilacoidal contiene las enzimas transporta

adoras de electrones. El flujo de electrones desde un acarreador a otro está obligadamente acoplado al transporte vectorial de iones hidrógeno; en el caso de los cloroplastos desde el exterior al interior. El flujo de equivalentes reductores alterna de un acarreador de electrones (tal como citocromo f) a un acarreador de hidrógenos (como la plastoquinona) y otra vez al primero. Las reacciones secuenciales tienen que ocurrir en los opuestos de la membrana con una geometría restringida dada por la orientación transversal específica de los acarreadores de electrones y de sus hidrógenos. Cuando los equivalentes reductores van de un acarreador de electrones a uno de hidrógenos, los protones son tomados del medio externo de la partícula fosforilante y cuando estos equivalentes reductores regresan a los transportadores de electrones, los protones ahora necesarios serán liberados al espacio interior -el truco es tener el sistema arreglado de tal manera que los protones puedan únicamente ser obtenidos del exterior y solo puedan ser liberados al medio interno. El efecto neto acopla el flujo de equivalentes reductores a través de la membrana a la translocación de iones hidrógeno desde el exterior hasta el interior (figuras 4 y 5).

e. El flujo neto de iones H^+ a través de la membrana produce dos cosas: 1) Hace que el interior sea más ácido que el exterior, creando un gradiente de pH y 2) logra que el interior sea más eléctricamente positivo. Para prevenir la construcción de una diferencia de carga eléctrica excesiva, debe existir una forma -ya sea por libre difusión de otros iones o por medio de acarreadores específicos- para que otros cationes sean expulsados de la vesícula, o que otros aniones entren al mismo tiempo.

El movimiento de otros aniones es por naturaleza electro-

forético. De acuerdo a la medida de este transporte de iones será la diferencia de potencial eléctrico que se construya.

d. La combinación de la diferencia en la concentración de iones hidrógeno (ΔpH) y la diferencia de potencial eléctrico ($\Delta \Psi$) a través de la membrana, se designará como fuerza proton motiva o diferencia de potencial electroquímico de protones ($\Delta \mu H$). En unidades eléctricas, la fuerza proton motiva se expresa:

$$\Delta \mu H = \Delta \Psi + \frac{RT}{F} (\Delta pH)$$

en donde Ψ es expresada en milivoltios, R y T son la constante de los gases y la temperatura absoluta y F es la constante de Faraday. Esta es la fuerza directa que maneja la síntesis de ATP, el intermediario acoplante.

e. La fuerza proton motiva actúa para formar ATP vía una enzima anisotrópica unida a la membrana sintetizando ATP en la dirección indicada y actuando como ATPasa en la dirección contraria.

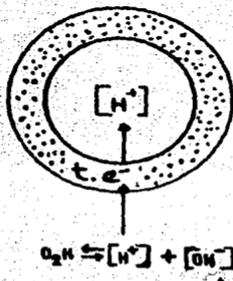


Figura 4. Gradiente de pH en el disco tilacoidal resultado del transporte de electrones.



Figura 5. Una abstracción del mecanismo de formación de ATP.

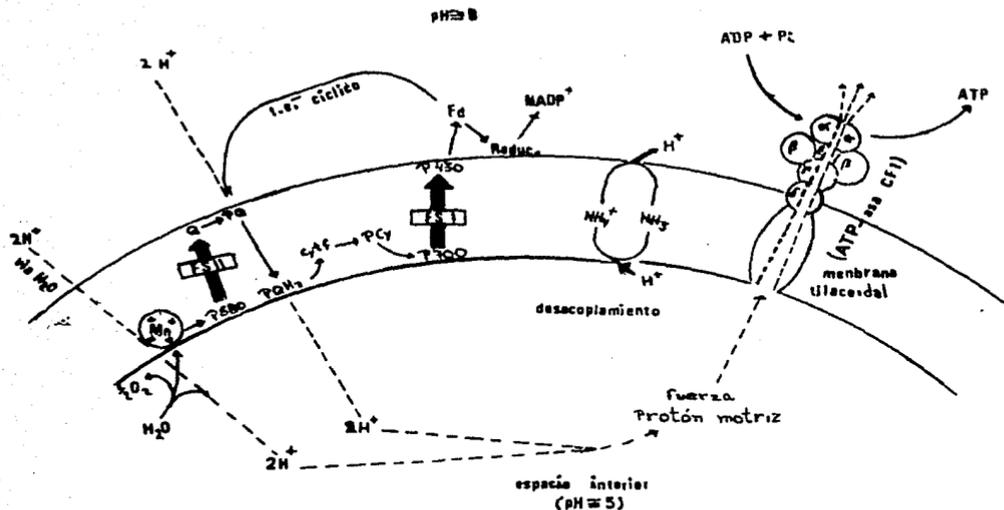
Los desacoplantes en este esquema, serán aquellos compuestos que causen una disminución en el gradiente de iones H^+ , equilibrando el pH en ambos lados de la membrana, lo cual evita la síntesis de ATP al no haber energía del gradiente electroquímico; el transporte de electrones se acelera al no tener la restricción (control) ejercida por el gradiente. Las características más comunes de los desacoplantes son: a) equilibran el pH evitando el gradiente, b) aceleran el transporte de electrones, c) no se observa síntesis de ATP en su presencia.

El mecanismo que se propone para el desacoplamiento consiste en la entrada del desacoplante al espacio interno del tilacoide; una vez dentro de este espacio, el desacoplante se protona y se transloca en su forma protonada hacia el exterior disociándose ahí. La forma no ionizada vuelve a penetrar nuevamente hacia el interior del tilacoide y así, en un constante entrar y salir del desacoplante acarreando iones H^+ , causa el desacoplamiento descrito anteriormente. La hipótesis de Mitchell es la más aceptada actualmente en el campo de la Bioenergética.

11) Hipótesis de Williams.

Otra hipótesis para explicar el mecanismo de acoplamiento del transporte de electrones a la síntesis de ATP es la propuesta por el Dr. R. J. P. Williams (30,31,32), la cual coincide con la anterior en la proposición de la generación de altas actividades de protones en dos fases de tal manera que no hay equilibrio de pH entre las regiones externa e interna de los organelos de la célula.

En el modelo de Mitchell, la difusión de los protones es de una fase acuosa a otra a través de la membrana, creándose un gradiente protónico quimiosmótico, en donde el H^+ es un protón hidratado o ión hidrónico H_3O^+ . En el modelo de Williams,



En el esquema se muestra a la izquierda el flujo de electrones acoplado a la síntesis de ATP. De acuerdo al mecanismo quimio-osmótico el sistema transportador de electrones está separado en el interior de la membrana de la ATP sintetasa. En el mismo esquema (al centro) el mecanismo de desacoplamiento, en este caso el desacoplante es el NH_3 .

se especifica que los protones generados en la cadena redox se depositan en pequeños bloques en la fase lipoproteica del interior de la membrana, como se describe en la figura 6. En este caso los H^+ son protones anhidros.

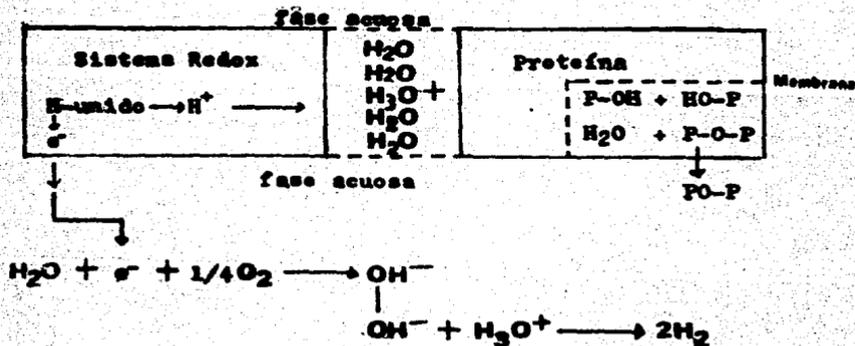
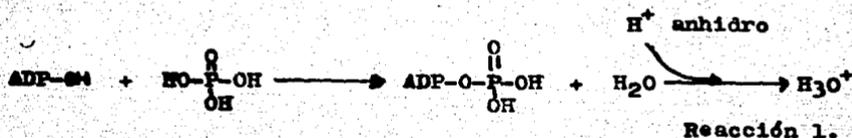


Figura 6. Esquema del modelo de Williams.

Williams propone que la fosforilación puede llevarse a cabo por la oxidación de hidrogeniones de la fase lipoproteica que conecta la vecindad de la cadena redox y la ATPasa reversible. La formación de ATP a partir de ADP mas fosfato consiste en una deshidratación inducida por el H^+ anhidro. Reacción (1).



La reacción hacia la derecha es termodinámicamente favorable a pH bajo si se estabiliza en una región membranal no acuosa (figura 6). La estabilización deberá ser efectuada cuando se combine el protón anhídrico con el agua formándose H_3O^+ (reacc. 1) que es expulsado hacia la fase acuosa fig. 1.

Experimentos realizados por Witt (33) mostraron que la formación de ATP no necesita protones en la fase acuosa; los experimentos mostraron que una diferencia de potencial eléctrico, artificial, sólo, es suficiente para generar la fosforilación. El campo se produjo por polarización y no fue acompañado de un gradiente de pH.

Los agentes desacoplantes en esta teoría son compuestos con la habilidad para actuar en la membrana como un aceptor de protones para prevenir la reacción;



Los agentes desacoplantes 1) permiten el flujo de electrones para desviar acarreadores esenciales; 2) remueven el protón activado por una ruta la cuál no involucra la eliminación de agua; 3) permiten la entrada de agua al sistema transportador de electrones para remover el protón; 4) bloquean los grupos esenciales para las diferentes reacciones.

El desacoplamiento por amoníaco y una serie de moléculas depende de la solubilidad del agente desacoplante en lípidos y su constante de disociación, lo que demuestra que la fosforilación puede ser desacoplada por la eliminación de protones en la membrana.

Se ha postulado que las aminas son desacoplantes capaces de actuar como tales siguiendo el mecanismo de desacoplamiento propuesto por la teoría Químio-ósmótica, por lo que en base a

esto Lotina Hennsen y Arias (1) trataron de despejar la duda acerca del sitio en donde se encontraba realmente la acumulación de protones; si realmente estaban en el interior de la vesícula tilacoidal (en el caso de los cloroplastos), o en la membrana tilacoidal y trabajaron con diaminas alifáticas unidas a sefaroasa que es un polisacárido esférico y de un tamaño diez veces mayor o más que la membrana tilacoidal, dando como producto sefaroasa alquil-aminada, que se asemeja a monoaminas alifáticas. En ese trabajo se utilizaron sefarosas-aminas con diferente longitud del brazo alquílico hidrocarbonado (2,4,6, 8,10 y 12 átomos de carbono), encontrándose que se necesita una distancia de 21 \AA dada por 12 átomos de carbono que separa el grupo amino de la sefaroasa para que hubiera desacoplamiento, los resultados encontrados son similares al efecto de un desacoplante clásico libre, las aminas de brazo más corto no presentan tal efecto. Estos datos sugieren que las aminas, al desacoplar, lo hacen interaccionando con algún componente de la membrana localizado a 21 \AA del exterior hacia el interior o esta monitoreando la zona correspondiente al almacén de protones para la formación del gradiente protónico. Esta evidencia apoya mas la hipótesis de Williams pero no descarta totalmente la de Mitchell, ya que los desacoplantes como las alquilaminas no distinguen entre un protón anhidro y un protón hidratado (ver hipótesis de Mitchell y Williams mencionadas anteriormente).

Ahora la pregunta a dilucidar con respecto al mecanismo de desacoplamiento de los grupos amino es, si las aminas se protonan al desacoplar o actúan por algún otro mecanismo diferente.

Para contestar la pregunta anterior, en este trabajo se procedió a medir el efecto desacoplante de algunas aminas y de diferentes compuestos nitrogenados relacionandolo con su poder

de protonación dado por su pK_b y su coeficiente de reparto, o sea la solubilidad en fases acuosas o sistemas lipoproteicos dado por el valor de \log de P , para poder encontrar la relación entre protonación del desacoplante y su actividad desacoplante.

- Relaciones Estructura-Actividad.

Desde más de 100 años los químicos y farmacólogos han estado intrigados por las observaciones de cambios en efectos biológicos al alterar la estructura de un compuesto.

Estas observaciones dejaron el postulado de que la actividad de una droga (ϕ) es una función de sus rasgos estructurales (C), ecuación 2.

$$\phi = f(C) \quad \text{-----} \quad (2)$$

Hansch (6) ha relacionado la actividad biológica con la estructura química. El tratamiento de Hansch de la actividad biológica de sustancias químicas está basado en el postulado de que para que una sustancia tenga actividad biológica, debe en primer lugar, llegar a un sitio de acción en la célula y después interaccionar con un receptor para producir el efecto biológico. Son los factores fisicoquímicos de una molécula los que gobiernan el transporte y la interacción droga-receptor; estos factores fisicoquímicos se ven modificados al cambiar la estructura química de una molécula en estudio y se pueden agrupar en factores electrónicos, hidrofóbicos y estéricos, de tal manera que la actividad de un compuesto podría representarse como:

$$\text{Actividad Biológica} = a \left[\begin{array}{c} \text{Parámetros} \\ \text{Electrónicos} \end{array} \right] + b \left[\begin{array}{c} \text{Parámetros} \\ \text{Hidrofóbicos} \end{array} \right] + c \left[\begin{array}{c} \text{Parámetros} \\ \text{Estéricos} \end{array} \right]$$

Una relación lineal entre las constantes de los sustituyentes y el logaritmo del inverso de la actividad de los compuestos se puede usar para correlacionar la actividad biológica con la estructura molecular. Para poder aplicar este método a los datos biológicos se requieren de tres requisitos básicos (20): 1) la serie de moléculas en estudio deberán ser similares para incrementar la probabilidad de que tengan el mismo mecanismo de acción, 2) los datos de actividad biológica deben ser precisos, cuantitativos y medidos bajo las mismas condiciones para toda la serie, y 3) las contribuciones del grupo deberán ser intrínsecamente aditivas para elegir los parámetros.

- Parámetros Hidrofóbicos (8).

Meyer y Overton mostraron que la actividad narcótica de muchos compuestos orgánicos es paralela a su coeficiente de reparto (P) aceite/agua, iniciando el uso de tales medidas como un medio para definir lipofilicidad relativa (ahora llamada muy comúnmente hidrofobicidad) de compuestos orgánicos activos biológicamente. En los años 50, Collander generó un nuevo interés en los coeficientes de reparto aceite/agua al demostrar que la velocidad de penetración de una gran variedad de compuestos orgánicos en la membrana de las células de las plantas, estaba relacionada con sus coeficientes de reparto.

La respuesta biológica altamente específica de los compuestos orgánicos aunque generalmente muestra dependencia de la hidrofobicidad relativa, es difícil de analizar debido a que la especificidad surge de efectos adicionales cruciales como el electrónico y el estérico.

Se han usado varios pares de disolventes (siempre el agua ha sido uno de ellos) y aunque ahora se use octanol/agua, no significa que sea el ideal.

Los valores de Log P se obtienen analizando una de las dos fases. El Log P es una definición operacional de la hidrofobicidad de una molécula entera, frecuentemente uno trabaja con un grupo de derivados de un compuesto en el cuál una gran porción de la estructura permanece constante. En este caso conociendo la hidrofobicidad relativa de los sustituyentes puede ser suficiente para hacer una correlación:

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H$$

donde P_x es el coeficiente de reparto de un derivado y P_H el coeficiente de reparto del compuesto original.

Valores erroneos en los cálculos de π de unos cuantos compuestos hidrocarbonados, alifáticos, dejaron la conclusión errónea de que la hidrofobicidad intrínseca de los átomos de hidrógeno en el sistema octanol/agua estaba cerrada a cero. Davis fue el primero en señalar este error mostrando que la hidrofobicidad de un metilo es apreciablemente más grande que el de un metileno. Siguiendo esta observación Nys y Rekker hicieron un reconocimiento estadístico de los datos disponibles en 1973 para desarrollar una serie de valores de fragmentos los cuáles pueden ser aditivos en una forma acordada por la siguiente ecuación:

$$\log P = \sum_1^n a_n f_n$$

donde a es el número de ocurrencias del fragmento f de la estructura tipo n de una molécula cualquiera. En esencia, este reconocimiento extensivo fue llevado a cabo para determinar la hidrofobicidad promedio de los átomos de hidrogeno en una gran variedad de situaciones estructurales. Por definición, la adi-

ción de las constantes de los átomos de hidrógeno a las constantes de algunos sustituyentes da como resultado las constantes de los fragmentos para obtener el valor de la constante (Log P) de la estructura. En el método de la suma de fragmentos se contemplan además factores como " F " el cuál es un factor de enlace y su valor depende de los tipos de enlace presentes en los compuestos..

- Parámetros Electrónicos.

Los efectos electrónicos de sustituyentes, sobre la ionización del ácido benzoico son usados como modelo para el efecto de sustituyentes sobre otros centros de reacción unidos a sistemas aromáticos. Hammett parametrizó estos efectos y los represento con la letra sigma (σ), y definió el parámetro como sigue:

$$\sigma = \log K_X - \log K_H$$

en donde K_H es la constante de ionización para el ácido benzoico en agua a 25°C y K_X es la constante de ionización para un derivado meta ó para bajo las mismas condiciones experimentales.

El valor de la constante sigma depende de la posición del sustituyente dado, en la posición meta (σ_m) es diferente a la de el mismo sustituyente en la posición para (σ_p).

Valores positivos de σ indican que el sustituyente atrae electrones del anillo aromático y valores negativos de σ indican una liberación de electrones del sustituyente hacia el anillo aromático.

- Parámetros Estéricos.

Las primeras publicaciones acerca de la cuantitatividad

de los efectos estéricos de substituyentes sobre la velocidad en reacciones orgánicas fueron realizadas por Meyer en 1895. Meyer postuló que el peso atómico de substituyentes orto determinaban la facilidad de esterificación de ácidos aromáticos or to substituidos.

La primera suceción numérica que dió una definición de efectos estéricos en reacciones orgánicas fue hecha por Taft. Despues Charton hizo una aproximación más directa sobre estos efectos.

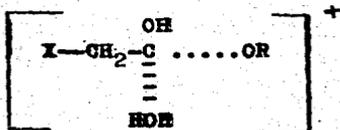
Taft definió la constante estérica E_s como:

$$E_s = \log \left[\frac{K_x}{K_H} \right] \Delta$$

donde K se refiere a la constante de velocidad de hidrólisis de un ácido del tipo:



El tamaño de X afecta el estado de transición:



en el caso de la hidrólisis del ácido por el agua, o por algún otro ligando en los procesos en donde E_s puede ser usada como modelo. Esta definición asume que los efectos electrónicos de X pueden ser dejados a un lado en el estado de transición. Desafortunadamente, debido a las variaciones estructurales, valores de E_s no pueden ser obtenidos para algunos substituyentes

comunes ($X-CH_2 = NO_2, CN, \text{ halogenos, OR, etc.}$) los cuáles son inestables bajo condiciones de hidrólisis de un ácido.

Charton descubrió que valores de E_s se podían obtener para los grupos anteriormente señalados, al mostrar que había una relación estrecha entre E_s y el radio de Van der Waals, y esta relación se ha utilizado para racionalizar efectos estéricos intermoleculares. Ahora hay muchos ejemplos en donde E_s ha sido usada para racionalizar efectos estéricos en sistemas biológicos donde la interacción con macromoléculas es de importancia primaria. A pesar de esto, E_s solo fue diseñada para sistemas homogéneos simples en reacciones orgánicas, pero para interacciones de compuestos orgánicos con macromoléculas e receptores de drogas en ordenes de magnitud más complicados no funciona.

Se han desarrollado sistemas más complicados para obtener o desarrollar tales interacciones tan complejas y se han utilizado programas de computación en los cuales se han seleccionado cinco dimensiones para cada sustituyente, las cinco dimensiones son llamadas L, B1, B2, B3 y B4. El parámetro L es definido como la longitud del sustituyente a lo largo del enlace axial entre el primer átomo del sustituyente y la molécula padre. Los cuatro parámetros B1 - B4 son determinados por la distancia desde cada enlace axial a su máximo punto perpendicular. B1 es el más pequeño y B4 es el más grande.

Para hacer un estudio estadístico justificado de estos nuevos parámetros, se requieren cinco parámetros estéricos de los sustituyentes para cada posición substituida de la estructura padre.

MATERIAL Y METODOS

- Aislamiento y Resuspensión de Cloroplastos.

De hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) adquiridas en el mercado, se aislaron cloroplastos de clase II sin doble membrana externa, o de tipo C según la clasificación de Reeves y Hall (22), por el método de Takaoki et al. (25) modificado el cuál consistió en lo siguiente: 40 g. de hojas de espinaca tiernas y en buen estado se lavaron con agua de la llave y se les quitó la nervadura central y el ápice para eliminar los cloroplastos viejos y jóvenes; después se cortaron en pedazos de un cm^2 aproximadamente y se pusieron en un vaso de licuadora (enfriado previamente 15 minutos a una temperatura de 4°C) con 180 ml. de medio de aislamiento que contenía sacarosa 500 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, amortiguador tricina-KOH 40 mM pH 7.6 y FVP-40 (polivinil polipirrolidona) 0.01 %.

Se homogeneizarán en una licuadora Osterizer Custom Mod. L-21 por 5 seg. a velocidad máxima. El homogeneizado se filtre a través de cuatro capas de gasa y dos de tela nylon a malla controlada, el filtrado resultante se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos en una centrifuga MSE Mod. LR-6 a 4°C . El sobrenadante se deshechó y la pastilla que contenía los cloroplastos se resuspendió en un volumen de 3 a 5 ml. en un medio de resuspensión que contenía sacarosa 500 mM, amortiguador tricina-KOH 40 mM pH 7.8, MgCl_2 5 mM y KCl 10 mM, se guardó en un tubo de ensayo frío, cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz.

Todos los pasos de aislamiento se efectuaron a 4°C aproximadamente.

- Determinación de la Concentración de Clorofila (17).

Se tomaron 5 ml. de solución de acetona al 80% (a temperatura ambiente) en tres tubos. A dos de ellos (duplicado) se les agregó 20 μ l de cloroplastos aislados y resuspendidos, se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente en un Vortex-Genie Mod. K-550-G y se centrifugaron en una centrifuga clínica durante 5 minutos a velocidad máxima para bajar los residuos de los cloroplastos. Se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro Pye Unicam Mod. SP6-550 contra solución de acetona al 80% como blanco a 663 y 645 nm. La cantidad de clorofila se obtuvo aplicando la ecuación siguiente reportada en (14):

$$\text{clorofila a/b} = (\text{g/ml}) = 8.05(A_{663}) + 20.29(A_{645})$$

- Medición de la Velocidad del Transporte de Electrones.

Se midió la reacción de Hill en sus dos fases separadas Fotosistema-I (FS-I) y Fotosistema-II (FS-II), así como la reacción completa.

Para la medición de este proceso se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark (Fork, 1972) (3,15,29) que mide cambios de concentración de oxígeno a partir de la fotólisis del agua, dicho aparato está compuesto por un cátodo de platino y un ánodo de plata, los que están en contacto con una solución concentrada de cloruro de potasio y todo esto a su vez cubierto por una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), mejor conocido como teflón, que separa la mezcla de reacción del ánodo y cátodo (electrodo), permitiendo así solo el paso selectivo

de oxígeno y otros gases, evitando también su contaminación con lo agregado a la mezcla de reacción.

Las reacciones realizadas en el electrodo descrito son:



El electrodo está conectado a un oxímetro el que a su vez está conectado a un registrador Beckman Recorder. Cuando no hay cambio de concentración de oxígeno en la gráfica se registra un trazo con pendiente nula. Si hay un aumento en la concentración de oxígeno se registra una pendiente proporcional a la tasa de aumento de oxígeno. Si disminuye ahora la concentración de O_2 se registra una pendiente inversa también proporcional a la tasa de disminución de oxígeno, ver Fig. (7). Para obtener una relación cuantitativa de estas pendientes con la velocidad del transporte de electrones se compara el sistema a uno ya conocido, por ejemplo, con el que incluye al ferricianuro de potasio como acceptor de electrones.

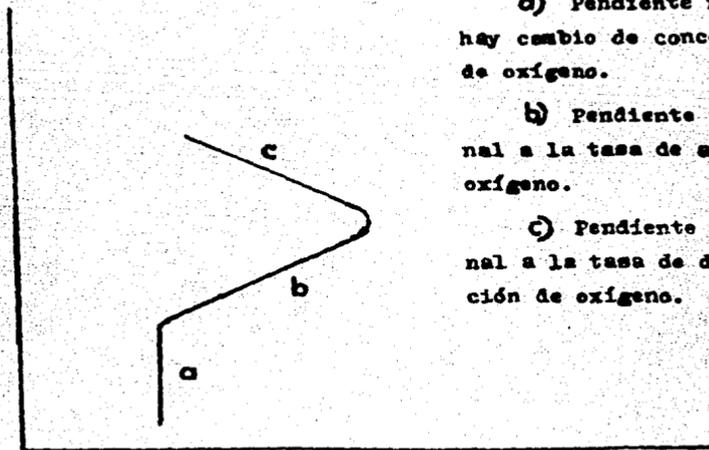
Cuando agregamos un pulso de ferricianuro a la preparación de cloroplastos obtenemos una pendiente en el registrador, pues se desprende oxígeno, cuando se ha reducido todo el ferricianuro esta pendiente se anula pues ya no hay transporte de electrones. Si conocemos la estequiometría de la reacción:



podemos calcular la velocidad del transporte de electrones, considerando el tiempo en que se mantuvo la pendiente. Esta velocidad puede tomarse como referencia para cuando se utilizan otros sistemas en que el acceptor de electrones es otro compues

te. En nuestros experimentos todos los datos están referidos al sistema de ferricianuro.

El dispositivo usado Fig., (8) consta de un proyector que incide su luz sobre una lente de Izawa, que esta formada por una solución de tramas de sulfato de cobre contenida en un matras balón de 0.5 litros que elimina el calor y hace las funciones de filtro, concentrando su luz en la cámara de reacción que esta soportada por una base de agitación magnética Spin Master con plato térmico Mod., 4803 que mantiene homogénea la suspensión de cloroplastos contenida en la mencionada cámara y que contiene una camisa con circulación de agua para mantener la temperatura (20°C aproximadamente).

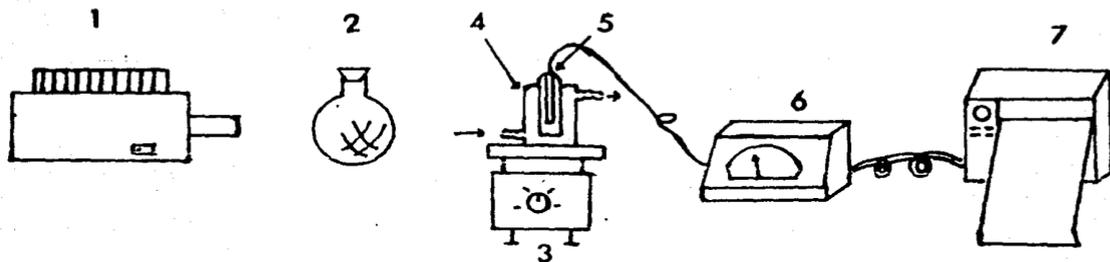


a) Pendiente nula. No hay cambio de concentración de oxígeno.

b) Pendiente proporcional a la tasa de aumento de oxígeno.

c) Pendiente proporcional a la tasa de disminución de oxígeno.

Figura 7.



- 1.- Proyector
 2.- Lente de Izawa
 3.- Base de agitación magnética
 4.- Cámara de reacción

- 5.- Electrodo
 6.- Ohmetro
 7.- Registrador

Figura 8.

El transporte de electrones en condiciones basal y acíclico de toda la cadena transportadora de electrones o sea la reacción de Hill, se midió utilizando 3 ml. de mezcla de reacción estandar que contenía sorbitol 100 mM, amortiguador tris-HCl-KOH 50 mM pH 7.6, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 40 mM, KCN 1 mM (mezcla de reacción estandar), MV 50 μ M y 10 μ g de clorofila por ml.

Para medir PS I :

Se tomaron 3 ml. de la mezcla de reacción estandar y se le adicionaron MV 50 μ M, DCIP 0.4 mM, ascorbato 2.5 mM, DCMU 10 μ M y 10 μ g de clorofila por ml.

Para PS II :

Además de la mezcla de reacción estandar, se adicionó DAD 0.2 mM, DEMIS 1 μ M y 10 μ g de clorofila por ml.

En los tres casos anteriores se estableció un control que contenía todo lo antes anotado y se comparó con los ensayos, los cuáles contenían concentraciones crecientes de desacoplante que fueron los compuestos nitrogenados ensayados tales como etilamina, dietilamina, trietilamina, acetamida, hexilamida, β, β, β -tricloroacetamida, β, β, β -tricloroetilamina, piridina, colidina, quinolina, 4-mercaptopiridina y 4-nitro-N-óxido de piridina.

Algunos de los compuestos nitrogenados fueron sintetizados en el Dpto. de Química Orgánica de la D.E.Fg., y otros fueron comprados en la casa Sigma Chemical Co. USA.

La calibración se realizó utilizando 3 ml. de la mezcla de reacción estandar y 0.010 ml. de ferricianuro 50 mM en lugar de MV.

$$\log^P \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_3 = 2(-0.12) + 2(-0.12) + -0.12(1) = -0.60$$

Para observar el efecto estérico y su importancia sobre la actividad desacoplante se comparé la actividad que presentan los compuestos trietilamina y quinuclidina sobre la cadena transportadora de electrones en condiciones basal y acíclica (reacción de Hill), así como su acción sobre los fotosistemas I y II en condiciones basales; estos dos compuestos fueron escogidos por sus características estructurales así como por su basicidad e hidrofobicidad las cuáles son semejantes, a excepción de que la trietilamina presenta impedimento estérico para la protonación y la quinuclidina no lo presenta.

- Determinación de V_{50} , U_{50} , VI_{50} e I_{50}

Los valores de V_{50} , U_{50} , VI_{50} e I_{50} se determinan a partir de las gráficas de concentración del desacoplante vs. % de actividad desacoplante. V_{50} es el 50% de la velocidad del transporte de electrones que se induce con U_{50} , donde U_{50} es la concentración del desacoplante que induce un 50% del incremento en la velocidad del transporte de electrones.

Gráficamente también podemos obtener los valores de VI_{50} e I_{50} , en este caso VI_{50} se refiere al 50% de inhibición causada por I_{50} , en donde I_{50} es la concentración del compuesto requerida para inducir un 50% de inhibición en el transporte de electrones.

- Obtención de los Valores de pK_b.

El pK_b de los compuestos estudiados se obtuvo de la literatura. El pK_b de los siguientes compuestos: etilamina, dietilamina, trietilamina, n-butilamina, n-hexilamina, n-octilamina, n-decilamina, n-dodecilamina, 1,6-diaminohexano, tetrametilendiamina, β , β , β -tricloroetilamina, β , β , β -tricloroacetamida y etilendiamina fue consultado en el Patai (19).

El valor de pK_b de los compuestos 1,8-diaminooctano, 1,10-diaminododecano y 1,12-diaminododecano se tomó de Tchaplá A. (26).

El pK_b de la colidina, quinolina, piridina y acetamida se encontró en el Merck Index (16).

Hexilamida y quinuclidina fue consultado en Wepster B. M. (28).

Por último el valor de pK_b del compuesto 4-mercaptopiridina se encontró descrito en Lange's Handbook (12).

- Cálculo del Logaritmo de los Coeficientes de Reparto de los Compuestos Nitrogenados.

El logaritmo del coeficiente de reparto de los compuestos nitrogenados fue calculado para cada uno de ellos por el método en el cuál se considera el log de P de una especie molecular como el resultado de la contribución de los diferentes fragmentos y características estructurales de la molécula (8), por ejemplo para el propano se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Log } P_{\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_3} = 2f_{\text{CH}_3} + 2f_{\text{CH}_2} + (n-1)F_b$$

en donde $F_b = (-0.12)$ Factor de enlace y $n-1$ enlaces, dando:

Compuestos Nitrogenados Estudiados



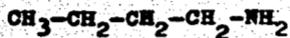
Etilamina



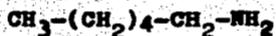
Diethylamina



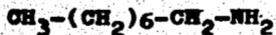
Trietilamina



n-Butilamina



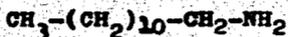
n-Hexilamina



n-Octilamina



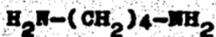
n-Decilamina



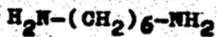
n-Dodecilamina



Etilendiamina



Tetrametilendiamina



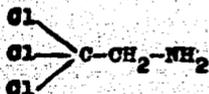
1,6-Diaminohexano



1,8-Diaminoetano



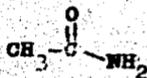
1,10-Diaminodecano



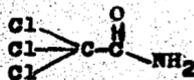
β, β, β -tricloroetilamina



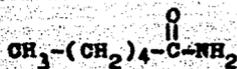
Quinuclidina



Acetamida



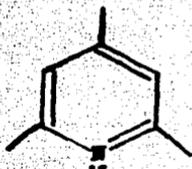
β, β, β -tricloroacetamida



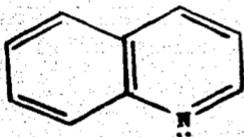
Hexilamida



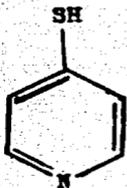
Piridina



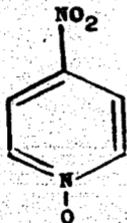
Colidina



Quinolina



4-Mercaptopiridina

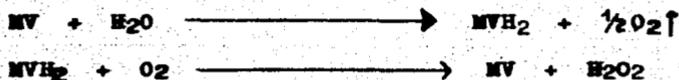


4-Nitro-N-óxido de piridina

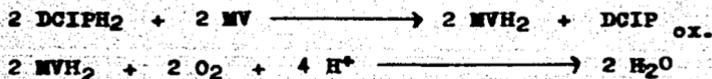
RESULTADOS Y DISCUSION

En los métodos montados (ver en material y métodos) para medir la velocidad del transporte de electrones en la reacción de Hill y los fotosistemas I y II, las reacciones realizadas fueron las siguientes:

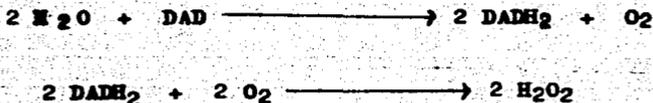
Reacción de Hill e reacción acíclica del transporte de electrones. ($H_2O \longrightarrow MV$)



FS I. ($DCIPH_2 \longrightarrow MV$)



FS II. ($H_2O \longrightarrow DAD$)



En la gráfica No. 1 se observa el efecto de concentraciones crecientes de aminas sobre la velocidad del transporte de electrones basal acíclico de $H_2O \rightarrow MV$. La actividad desacoplante calculada como el porcentaje de incremento en la velocidad, al adicionarse el compuesto que se está ensayando comparado al control que carece de desacoplante.

De la gráfica No. 1 es posible calcular V_{50} y U_{50} . Dónde V_{50} es el 50% de la velocidad del transporte de electrones basal de $H_2O \rightarrow MV$ que se induce por U_{50} , donde U_{50} es la concentración del desacoplante que induce un 50% del incremento en la velocidad del transporte de electrones. Los valores de V_{50} de todos los compuestos ensayados, obtenidos de esta forma se encuentran en la tabla - II.

Al analizar las curvas de la gráfica No. 1, se observa que el orden de actividad desacoplante creciente, expresada por V_{50} es el siguiente:

β, β, β -tricloroetilamina < quinuclidina < dietilamina < etilamina < trietilamina

en cambio, el orden creciente de los valores de $\log P$ de de los mismos compuestos (tabla - I), ordenando primero a los más solubles en agua es:

etilamina < quinuclidina < dietilamina < β, β, β -tricloroetilamina < trietilamina

por otro lado, el orden creciente de pK_b de éstos compues

tos (tabla - I) es:

Dietilamina < trietilamina < etilamina < quinuclidina < β,β -
 β -tricloroetilamina.

Al tratar de correlacionar por inspección la actividad de desacoplante V_{50} con cualquiera de los otros parámetros $\log P$, pKb , U_{50} , observamos que no hay una relación directa entre la actividad y los parámetros mencionados. Nótese además que pKbs semejantes (compuestos 2,5,6, y 11. Tabla - II) presentan actividades variables; por otro lado, valores de $\log P$ opuestos, presentan actividades similares y máximas, como trietilamina y etilamina (tabla - I).

En la gráfica No. 1 observamos también la actividad desacoplante de los compuestos trietilamina y quinuclidina, los cuales se compararon con el objeto de conocer si el impedimento estérico era un factor que pudiera afectar la protonación del desacoplante. Los resultados encontrados son contrarios a los esperados, ya que la trietilamina es más potente como desacoplante que la quinuclidina, lo cuál indica que el impedimento estérico no es un factor importante en la protonación del desacoplante durante el desacoplamiento.

Con el objeto de contribuir a entender el mecanismo de desacoplamiento de compuestos nitrogenados, se estudio el efecto de concentraciones crecientes de piridina y sus análogos sobre el transporte de electrones basal acíclico de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$. Gráfica No. 2. Los resultados encontrados indican que solo dos compuestos son activos, siendo el 4-nitro-N-óxido de piridina el más potente y en menor grado el 4-mercaptopiridina; los compuestos colidina, piridina y quinolina prácticamente no presentan actividad desacoplante. Nótese que el compuesto más activo

presenta un valor de Log P de -1.72 lo que indica que es muy soluble en agua.

De acuerdo al mecanismo de desacoplamiento propuesto por Mitchell (16) y a los trabajos experimentales realizados por varios investigadores, postularon que las aminas actúan como acarreadores de protones, siendo la base no protonada la entidad que penetra en la membrana del tilacoide para protonarse en el interior y esta especie protonada regresar al exterior disociándose en la fase acuosa y quedando lista de esta forma para funcionar nuevamente como un protonóforo. Si este mecanismo fuera cierto, los desacoplantes como los compuestos nitrogenados deberían presentar una correlación directa entre la actividad desacoplante y su basicidad expresada por su pKb, siendo más básicos los compuestos con un valor de pKb más bajo; además de una correlación de la actividad desacoplante de compuestos nitrogenados y el logaritmo de su coeficiente de reparto. De acuerdo con los resultados de las gráficas 1 y 2 no se encontró correlación entre la actividad desacoplante y el pKb, por otro lado, al analizarse los datos de actividad desacoplante y Log P tampoco se encontró ninguna correlación.

Para entender el mecanismo de desacoplamiento más ampliamente, se ensayaron compuestos nitrogenados no básicos, con la hipótesis de que no actuarían como desacoplantes. En la gráfica No. 3 se observa el efecto de concentraciones crecientes de tres amidas sobre el transporte de electrones basal acíclico de H_2O a MV, los resultados que se observan en esta gráfica son sorprendentes, ya que las tres amidas ensayadas actúan como desacoplantes debido a que inducen aceleramiento del transporte de electrones basal, siendo los más efectivos la acetamida y la hexilamida y mucho más potentes aún comparándolas con

todos los compuestos nitrogenados ensayados; la β, β, β -tricloroacetamida actúa como desacoplante pero en un grado menor que las dos aminas anteriores. Nótese que en estos compuestos el valor de pK_b es el mismo, o sea presentan un pK_b de 14.5 lo que nos indica que no se protonan, por lo que se esperaba que las amidas no actuarán como desacoplantes. En cambio el valor de $\text{Log } P$ es variable, siendo la acetamida muy soluble en agua con un valor de $\text{Log } P$ de -2.6 comparada con la hexilamida que es muy soluble en lípidos con un valor de $\text{Log } P$ de +0.88, por los valores de $\text{Log } P$ tan opuestos es difícil pensar que atraviesan la membrana fácilmente como ocurre en el desacoplamiento, lo que indica que estos compuestos no actúan como protonóforos.

Efecto de los compuestos nitrogenados sobre el transporte de electrones basal en FS-I de DGIP a MV.

Con el objeto de entender mejor el mecanismo de desacoplamiento de los compuestos nitrogenados utilizados en este estudio, se midieron sus efectos sobre los fotosistemas I y II.

En la gráfica No. 4 observamos el efecto de concentraciones crecientes de aminas que inducen el aumento en la velocidad del transporte de electrones del FS-I, el orden de V_{50} va desde 13% para la β, β, β -tricloroetilamina hasta 44.5% para la quinuclidina, quedando con valores crecientes intermedios etilamina, dietilamina y tricloroetilamina (tabla-I). Al analizar los datos de pK_b , $\log P$, U_{50} en relación a V_{50} del fotosistema - I, observamos (ver tabla - I) que no hay correlación alguna de V_{50} y los parámetros mencionados. Un análisis más cuidadoso de los compuestos más efectivos para inducir mayor desacoplamiento, muestra que estos compuestos presentan valores opuestos de $\log P$, es decir, uno es soluble en agua y el otro soluble en lípidos pero con altas actividades desacoplantes en el FS-I, el pK_b es prácticamente constante para estos compuestos a excepción de la β, β, β -tricloroetilamina que presenta un pK_b de 8.53 y que por lo tanto es una amina menos básica que las aminas mencionadas anteriormente y con una tendencia desacoplante parecida a la que presenta sobre el transporte de electrones basal acíclico de $H_2O \rightarrow MV$. Nótese que la actividad desacoplante de estos compuestos sobre el FS-I, no sigue la misma tendencia que el efecto que inducen en toda la cadena de H_2O a MV.

El efecto de piridina y sus análogos sobre el transporte de electrones basal en FS-I, se observa en la gráfica No. 5.

El orden creciente de aumento en la velocidad del trans-

porte de electrones que inducen estos compuestos es el siguiente:

piridina < colidina < quinolina < 4-mercaptopiridina < 4-nitro-N-óxido de piridina

los V_{50} van de 7% para el primero hasta de 96.5% para el último (tabla - I). En la tabla - I observamos que no hay una correlación de V_{50} del FS-I con los parámetros estudiados (pK_b , $\text{Log } P$, U_{50}). Nótese sin embargo que estos compuestos aumentan su potencia como desacoplantes a medida que se van haciendo menos básicos, ya que los valores de pK_b van de 8.8 a 12.5. Por otro lado, encontramos que el compuesto más activo como desacoplante, el 4-nitro-N-óxido de piridina, es el más soluble en agua, con un $\text{Log } P$ de -1.72 y el compuesto más soluble en lípidos y más básico de esta serie, la piridina, prácticamente no es desacoplante, por lo que la basicidad de los desacoplantes de compuestos nitrogenados y sus propiedades de protonóforos no son requisitos indispensables e necesarios para el desacoplamiento.

Otro grupo de compuestos desacoplantes son las amidas, los efectos de concentraciones crecientes de estas amidas sobre el transporte de electrones basal del FS-I de DCIP a MV se observan en la gráfica No. 6. Los datos indican que el orden creciente de efectividad representada por V_{50} del FS-I, para inducir incremento en la velocidad del transporte de electrones basal es el siguiente:

β, β, β -tricloroacetamida < acetamida < hexilamida

Nótese que todos estos compuestos no son básicos ya que tienen un pK_b de 14.5, por lo que difícilmente se protonarían,

sin embargo son buenos desacoplantes. Por otro lado las amidas tienen valores de Log P muy variables, sin embargo la acetamida que es el compuesto más soluble en agua es uno de los más potentes para inducir desacoplamiento, ya que la hexilamida es muy soluble en lípidos y también presenta máximo desacoplamiento. Estos compuestos tampoco guardan una relación con U_{50} . Estos datos de las propiedades de las amidas como desacoplantes descartan la protonación en el desacoplamiento del PS-I y a las propiedades protonóforas de los desacoplantes como requisitos necesarios para efectuar su acción.

Efecto de compuestos nitrogenados sobre el transporte de electrones basal de FS-II de DAD a DCIP.

Al continuar los estudios de caracterización de los efectos que inducen los compuestos nitrogenados ensayados en este trabajo, encontramos que el FS-II es afectado en dos formas:

La mayoría de los compuestos inhiben el transporte de electrones basal del FS-II, en cambio tres de ellos (compuestos 4, 14 y 23. Tabla - II) inducen aceleramiento del transporte de electrones basal en el FS-II al igual que se observa en toda la cadena del transporte de electrones basal acíclico de H_2O a MV. Los resultados indican que son desacoplantes puros ya que la mayoría de los desacoplantes inhiben el FS-II.

VI_{50} es el 50% de inhibición de la velocidad del transporte de electrones que se obtiene con I_{50} , en donde I_{50} es la concentración del compuesto requerida para inducir un 50% de inhibición en el transporte de electrones basal del FS-II. Los valores de VI_{50} y de I_{50} se encuentran en la tabla - I.

En la gráfica No. 7 observamos el efecto inhibitorio creciente de las aminas sobre el FS-II, el cual es el siguiente:

Trietilamina < etilamina < β, β, β -tricloroetilamina < dietilamina < quinuclidina.

Los valores de VI_{50} van de 3.55 para el primero hasta 24.5 para el último. Como se puede observar en la misma figura 7 y con los valores de VI_{50} estos compuestos son inhibidores parciales del FS-II. Estos resultados son similares a los encontrados con otros desacoplantes como el NH_2Cl , el cual también inhibe parcialmente el FS-II (31, 32).

En las gráficas 8 y 9 observamos el efecto de concentraciones crecientes de piridina y sus análogos sobre el transpor

te de electrones basal del FS-II de H₂O a DAD. Los resultados indican que la colidina y piridina inhiben el transporte de electrones basal con valores de VI₅₀ de 4 y 13% respectivamente, en cambio la quinolina (gráfica No. 8), 4-mercaptopiridina y 4-nitro-N-óxido de piridina (gráfica No. 9) inducen un aumento en la velocidad del transporte de electrones basal en FS-II, siendo más efectivos los dos últimos como se observa en la tabla - I. En la misma tabla - I observamos que no hay una correlación directa entre V₅₀ y los diferentes parámetros (pK_b, Log P, U₅₀) analizados (tabla-I); el compuesto más efectivo como desaceplante, es el 4-nitro-N-óxido de piridina, es muy soluble en agua (Log P -1.72) y tiene una mayor actividad desaceplante comparada con la 4-mercaptopiridina y la quinolina, estos dos últimos compuestos tienen valores de Log P de +0.39 y +2.02 respectivamente.

Finalmente las uridas ensayadas inhiben el transporte de electrones basal de FS-II de H₂O a DAD (gráfica 10), siendo la más efectiva como inhibidor la acetamida (ver tabla - I).

En la tabla - I también observamos que el pK_b es constante y no hay correlación directa entre este último y VI₅₀.

Con el objeto de realizar un estudio más completo sobre desacoplamiento y tener un mayor intervalo de valores de pK_b y de compuestos nitrogenados y así obtener mayor información acerca del mecanismo de desacoplamiento en la fetofosforilación, se utilizarán los valores de la velocidad del transporte de electrones basal de una serie de aminas y diaminas ensayadas anteriormente por Arias (1) y García Garzón (4). Los valores de V_{50} de H_2O a MV correspondiente a cada compuesto se tomaron de la literatura arriba citada y se procedió a comparar la actividad desacoplante V_{50} con los parámetros indicados en la tabla - II, los cuáles se analizarán con los V_{50} de los compuestos ensayados en este trabajo (pK_b , $\log P$, U_{50}).

Los valores de V_{50} de los compuestos que no ensayamos, así como los V_{50} de los compuestos ensayados en este trabajo se integrarán en una sola tabla (tabla - II) al igual que sus pK_b s, y U_{50} .

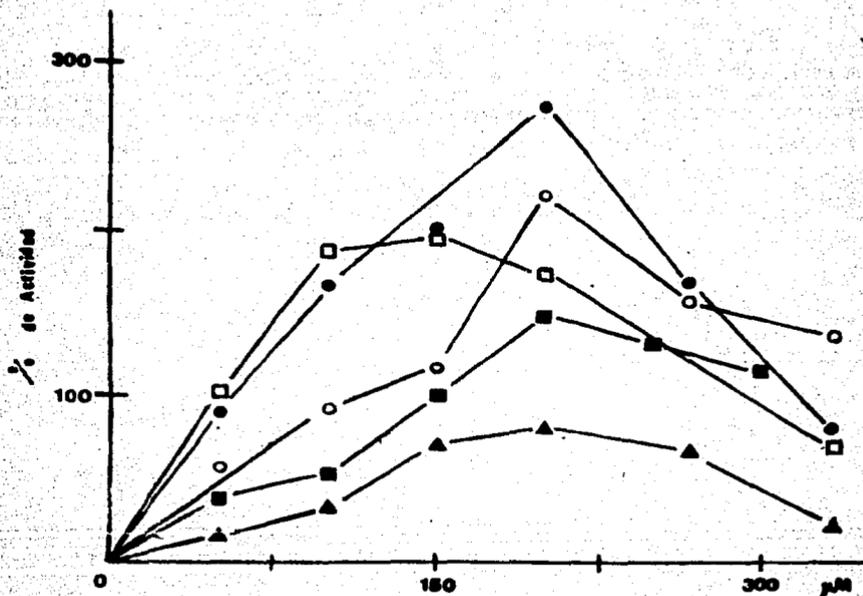
A continuación se graficarán los datos en forma de $\log. V_{50}$ vs. pK_b (gráfica No. 11), en esta gráfica se observa que no existe relación alguna entre la actividad desacoplante (V_{50}) y la basicidad de los compuestos nitrogenados (pK_b), esto sugiere que el mecanismo de desacoplamiento basado en la protonación del desacoplante podría no ser cierto.

Por otro lado, en la gráfica No. 12 tenemos los datos del $\log. V_{50}$ vs. el $\log.$ de los coeficientes de reparto de todos los desacoplantes enlistados en la tabla - II, como se puede observar en la gráfica, los puntos 3,4,5,6,7,8,9,11,12,13, 15, y 16 se relacionaron con $\log P$, pues al ser más negativo este valor, o sea al ser el desacoplante más soluble en agua, su poder desacoplante es mayor. Este dato sugiere que los compuestos nitrogenados, desacoplantes difícilmente podrían moverse

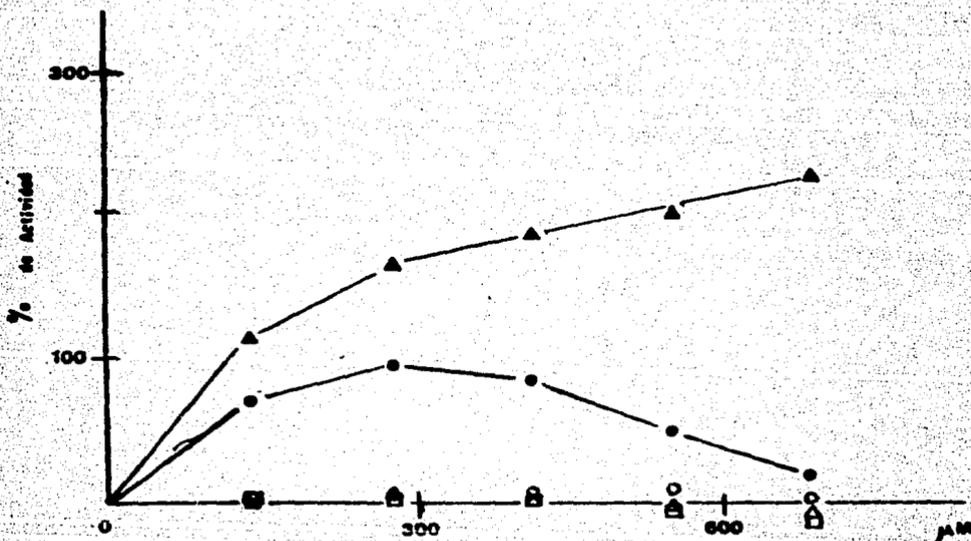
en un medio hidrofóbico por lo que no podrían actuar como protonóforos.

Los compuestos 10,18,19,20,21, 22, y 23 (gráfica No. 12) también presentan una relación aunque diferente a los puntos anteriores pero en este caso, éstos compuestos presentan una actividad desacoplante menor. Como se puede observar, esta serie de compuestos al igual que la anterior no se están comportando como protonóforos y por sus valores de Log P que presentan tampoco están sacando protones del interior de la membrana, y sobre todo, esta serie de compuestos son diaminas a excepción del compuesto 22 que corresponde a la Colidina y del compuesto 23 que corresponde a la Quinolina.

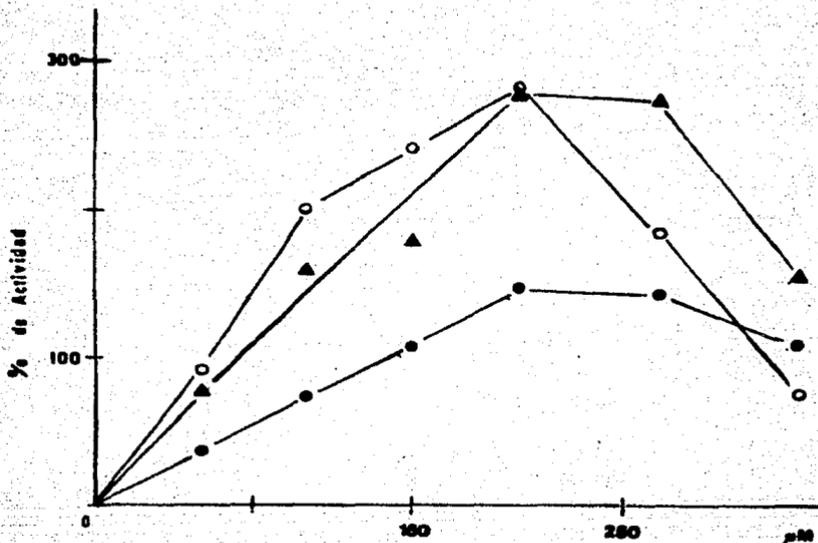
Finalmente, se llevó a cabo una correlación tipo Hansch al relacionar la actividad desacoplante de los compuestos nitrógenados con los parámetros Log P y pK_b juntos. Se pudo establecer una ecuación no lineal para estos datos y se encontró un coeficiente de correlación de 0.14. A la serie de diaminas enlistadas arriba, también se les aplicó esta relación tipo Hansch por separado y se encontró una correlación también pobre de 0.53, lo cual nos indica que todos los compuestos nitrógenados mencionados en la tabla - I no tienen una relación de estructura con su actividad desacoplante.



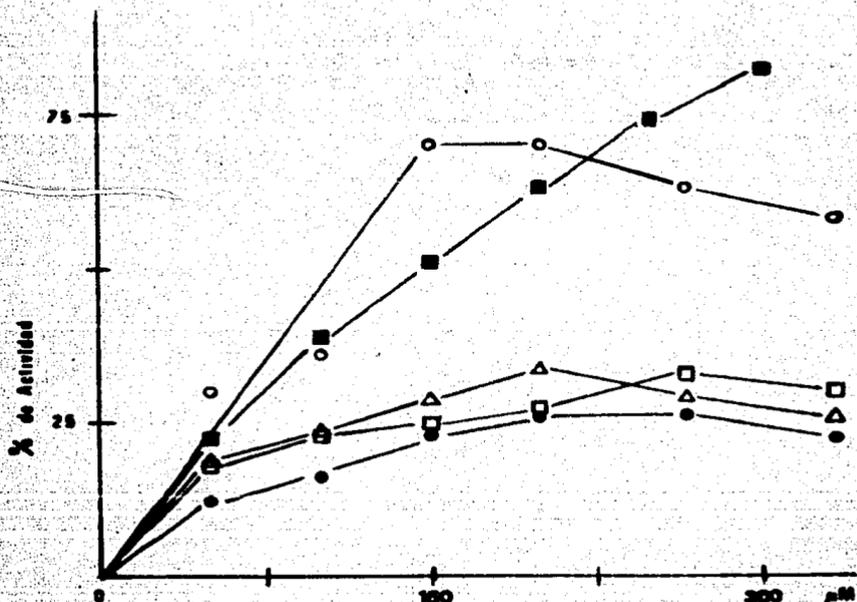
Gráfica No. 1 Efecto de las aminas sobre el transporte de electrones basal acíclico de $H_2O \rightarrow MV$. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se hace igual a 0% de actividad y se grafica el efecto de los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles. ○—○ Etilamina. □—□ Diethylamina. ●—● Trietilamina. ▲—▲ β,β,β-tricloroetilamina. ■—■ Quinuclidina.



Gráfica No. 2 Efecto de piridina y sus derivados sobre el transporte de electrones basal acíclico de $H_2O \rightarrow MV$. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se hace igual a 0% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles. ○—○ Colidina ●—● 4-Mercaptopiridina. ▲—▲ 4-Nitro-N-óxido de piridina. △—△ Piridina. □—□ Quinolina.

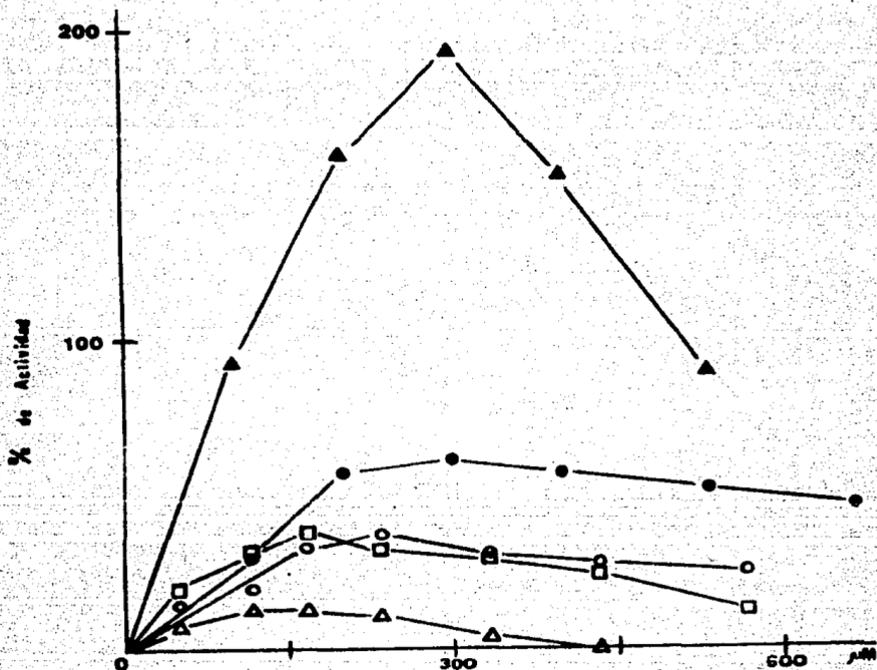


Gráfica No. 3 Efecto de amidas sobre el transporte de electrones basal acíclico de $H_2O \rightarrow MV$. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se hace igual a 0% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles. ▲—▲ Acetamida. ○—○ Hexilamina. ●—● β,β,β-tricloroacetamida.



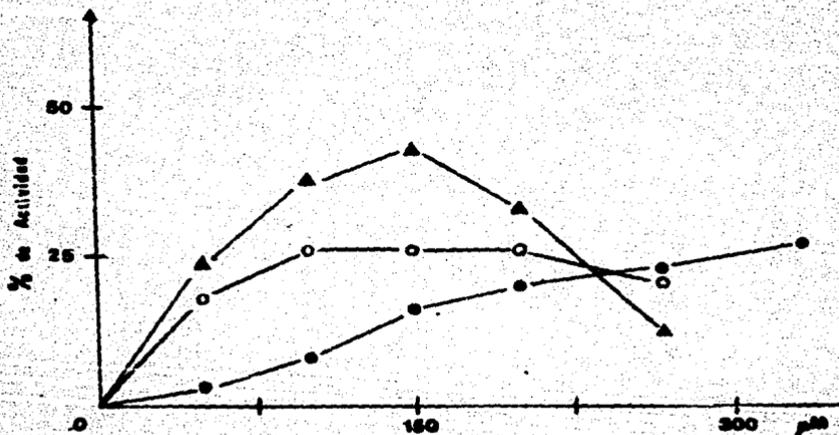
Gráfica No. 4 Efecto de aminas sobre el transporte de electrones basal en Fotosistema - I de DCIP → MV. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se iguala a 0% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles.

Estilamina.
 Dietilamina.
 Trietilamina.
 N,N-tricloroetilamina.
 Quinclidina.



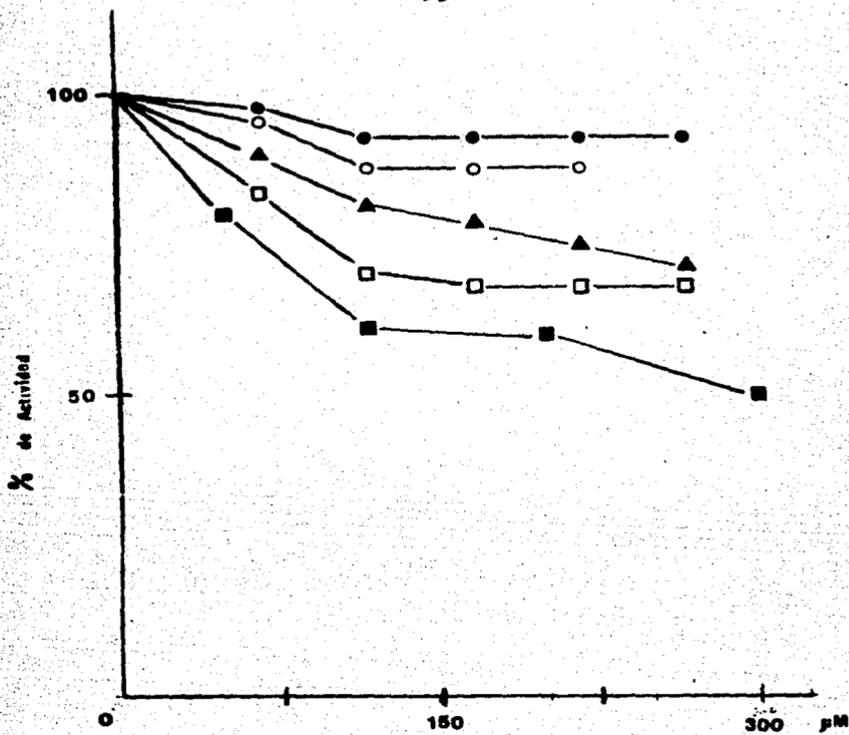
Gráfica No. 5 Efecto de piriđina y sus derivados sobre el transporte de electrones basal en Fotosistema - I, de DCIP → MV. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se iguala a 0% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles.

○—○ Colidina. ●—● 4-Mercaptopiridina. ▲—▲ Quinolina.
 □—□ 4-Nitro-N-óxido de piridina. △—△ Piridina.

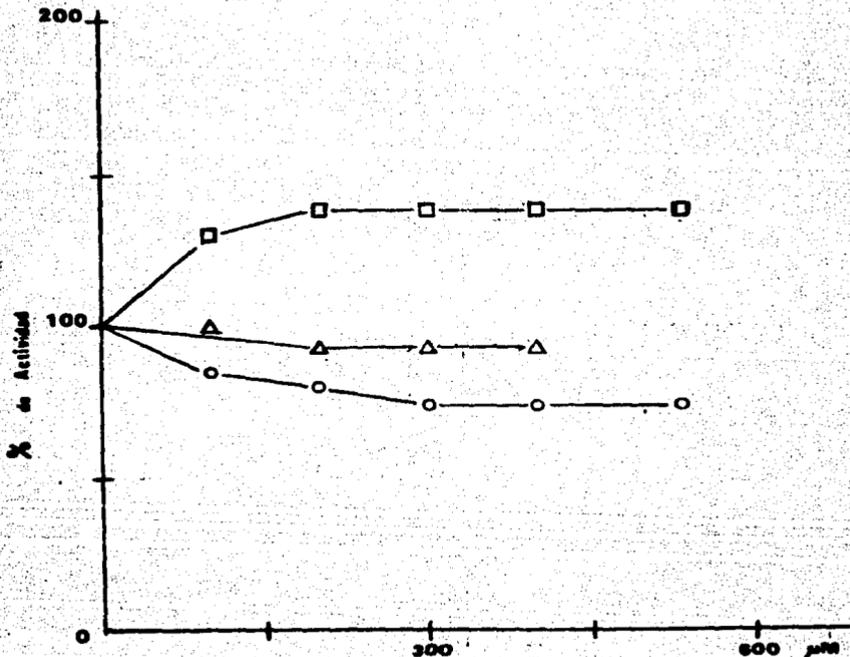


Gráfica No. 6 Efecto de amidas sobre el transporte de electrones basal en Fotosistema - I de DCIP → MV. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se iguala a 0% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. Concentración del compuesto expresada en micromoles.

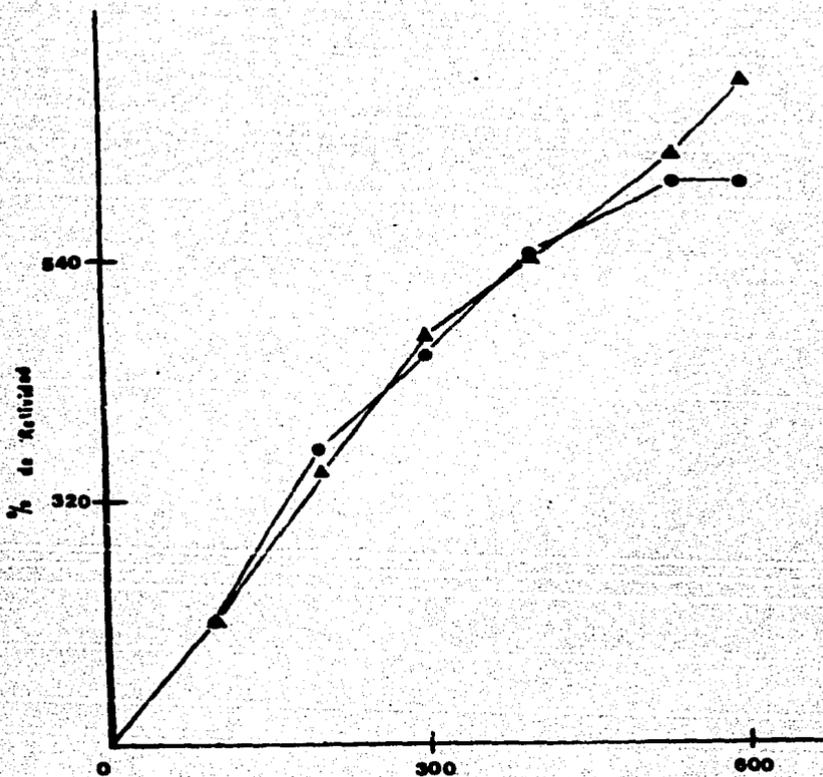
▲—▲ Acetamida. ○—○ Hexilamida. ●—● β,β,β-tricloroacetamida.



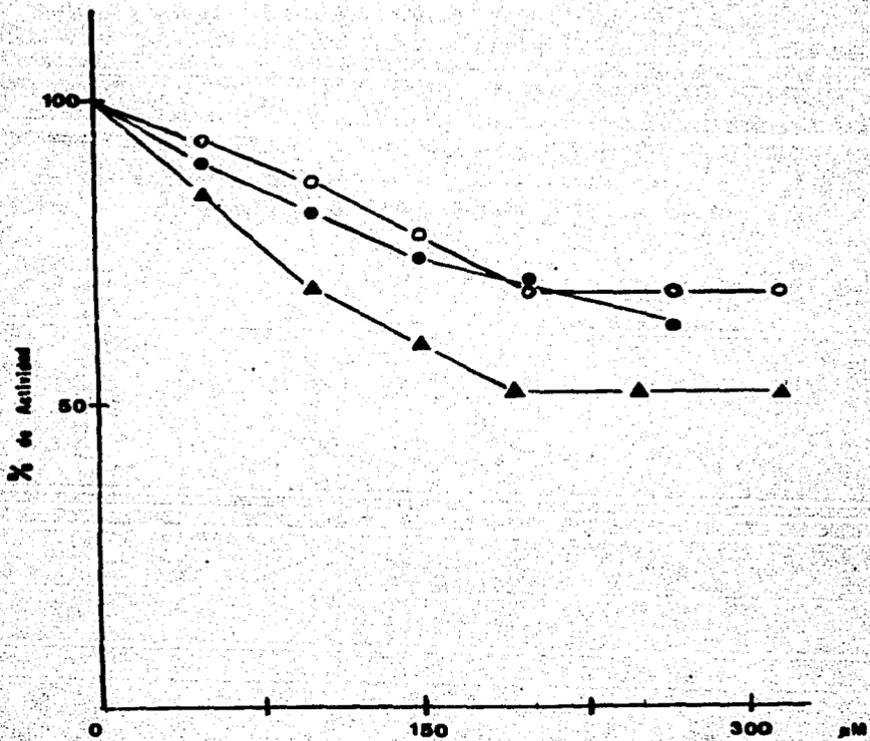
Gráfica No. 7 Efecto de aminas sobre el transporte de electrones basal en Fotosistema-II de $H_2O \rightarrow DAD$. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones se iguala a 100% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles. ○—○ Etilamina. □—□ Dietilamina. ●—● Trietilamina. ▲—▲ β,β,β-tricloroetilamina. ■—■ Quinuclidina.



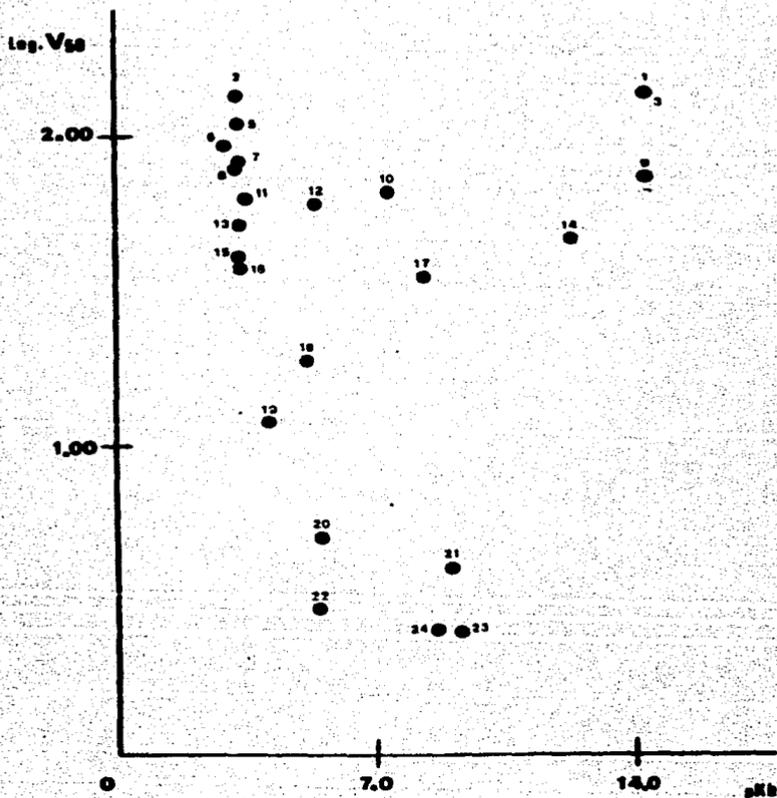
Gráfica No. 8 Efecto de piridina y sus derivados sobre el transporte de electrones basal en Fotosistema II de $H_2O \rightarrow DAD$. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se iguala a 100% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. Concentración del compuesto expresada en micromoles. ○—○ Colidina. △—△ Piridina. □—□ Quinolina.



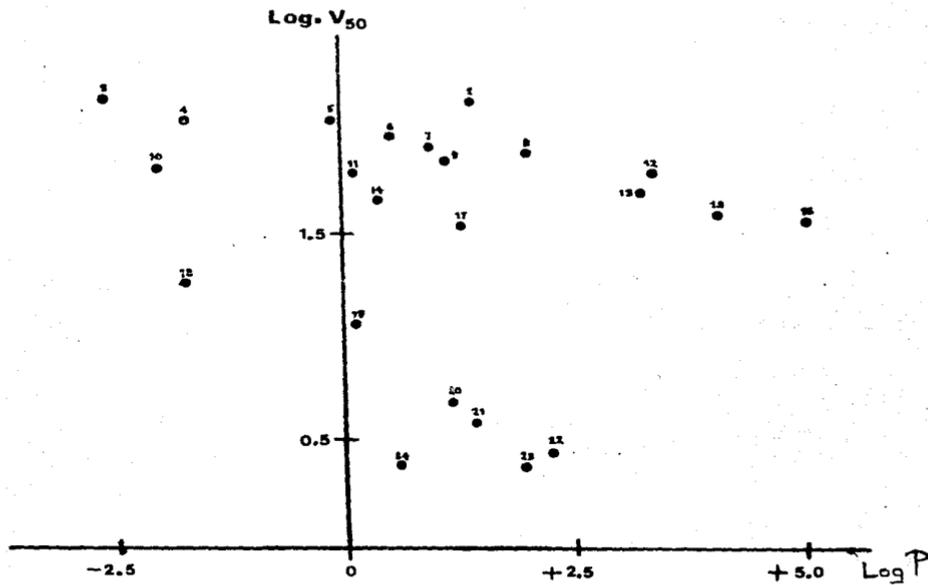
Gráfica No. 9 Efecto de los compuestos 4-Nitro-N-óxido de piridina ●—● , y 4-Mercaptopiridina ▲—▲ , sobre el transporte de electrones basal en Fotosistema-II de H₂O — DAD. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se igualó a 0% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles.



Gráfica No. 10 Efecto de amidas sobre el transporte de electrones basal en Fotosistema-II de $H_2O \rightarrow DAD$. Mezcla de reacción como se describe en material y métodos. La velocidad del transporte de electrones del control se igualó a 100% de actividad y se grafica el efecto que producen los compuestos sobre dicho control vs. concentración del compuesto expresada en micromoles. \blacktriangle — \blacktriangle Acetamida. \circ — \circ Hexilamida. \bullet — \bullet p,p,p-tricloroacetamida.



Gráfica No. 11 Logaritmo de V_{50} vs. pK_b . Cada punto que aparece en la gráfica representa un desacoplante, los números de los puntos corresponden a la numeración de la tabla I. En esta tabla I encontramos el nombre del desacoplante con sus respectivos valores de pK_b y V_{50} . La obtención de V_{50} se describe en material y métodos.



Gráfica No. 12 Logaritmo de V_{50} vs. logaritmo del coeficiente de reparto. Cada punto que aparece en la gráfica representa un desacoplante, los números de los puntos corresponden a la numeración de la tabla. En esta tabla encontramos el nombre del desacoplante con sus respectivos valores de L_{50} y V_{50} . La obtención de V_{50} así como la de L_{50} se describe en material y métodos.

" TABLA No. I "

ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS ENSAYADOS EN LA VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES BASAL ACICLICA (PSI + PSII), ASI COMO DE LOS EVENTOS PSI Y PSII.

Compuestos cuya actividad se muestra en la gráfica No. 1.

COMPUESTO	V ₅₀	pK _b	Log P	U ₅₀
Trietilamina	140	3.33	1.44	100
Etilamina	112.5	3.36	-0.11	150
Diethylamina	95	3.01	0.57	56
Quinuclidina	64	3.50	0.15	82.5
β, β, β -tricloroetilamina.	35	8.53	1.32	126

Compuestos cuya actividad se muestra en la gráfica No. 2.

COMPUESTO	V ₅₀	pK _b	Log P	U ₅₀
4-nitro-N-óxido de piridina.	113	-	-1.72	100
4-mercaptopiridina	47	12.57	0.39	70
Colidina	4	9.3	1.72	100
Quinolina	2.5	9.5	2.02	80
Piridina	2.5	8.8	0.62	110

Compuestos cuya actividad se muestra en la gráfica No. 3.

COMPUESTO	V ₅₀	pK _b	Log P	U ₅₀
Hexilamida	142	14.5	0.88	72
Acetamida	139	14.5	-2.6	97
β, β, β -tricloroacetamida	74	14.5	1.13	100

TABLA I (continuación)

FS I

Compuestos cuya actividad se muestra en la gráfica No. 4.

COMPUESTO	V ₅₀	pK _b	Log P	U ₅₀
Quinuclidina	89	3.5	0.15	128.3
Trietilamina	70	3.33	1.44	63.33
Diethylamina	34	3.01	0.57	43.3
Etilamina	33	3.36	-0.11	45
β, β, β -tricloro- etilamina	26	8.53	1.32	91.66

Compuestos cuya actividad se muestra en la gráfica No. 5.

COMPUESTO	V ₅₀	pK _b	Log P	U ₅₀
4-nitro-N-óxido de piridina.	193	-	-1.72	108.3
4-mercaptopiridina	61	12.57	0.39	120
Colidina	38	9.3	1.72	96.66
Quinolina	38	9.5	2.02	43.33
Piridina	14	8.8	0.62	43.33

Compuestos cuya actividad se muestra en la gráfica No. 6.

COMPUESTO	V ₅₀	pK _b	Log P	U ₅₀
Acetamida	43	14.5	-2.6	21.5
β, β, β -tricloro- acetamida.	27	14.5	1.13	13.5
Hexilamida	26	14.5	0.88	13

FS II

Compuestos cuya actividad se muestra en las gráficas No. 7 y 8.

Compuesto	VI ₅₀	pK _b	Log P	I ₅₀
Quinuclidina	24.5	3.5	0.15	60
Diethylamina	15.5	3.01	0.57	61.66
Colidina	13.0	9.3	1.72	83.33
β, β, β -tricloro- etilamina	12.5	8.53	1.32	88.33
Etilamina	6.0	3.36	-0.11	73.33
Piridina	4.0	8.8	0.62	143
Trietilamina	3.55	3.33	1.44	78.33

TABLA I (continuación)

Compuestos cuya actividad se muestra en la gráfica No. 10.

COMPUESTO	VI ₅₀	pK _b	Log P	I ₅₀
Acetamida	24	14.5	-2.6	75
β, β, β -tricloro- acetamida	20	14.5	1.13	93.33
Hexilemida	16.5	14.5	0.88	75

Compuestos cuya actividad se muestra en las gráficas 8 y 9.

COMPUESTO	V ₅₀	pK _b	Log P	U ₅₀
4-nitro-N-óxido de piridina	340	-	-1.72	316
4-mercaptopiridina	234	12.57	0.39	196.66
Quinolina	19	9.5	2.02	63.33

" TABLA No. II "

ACTIVIDAD DESACOPLANTE (V_{50}) EN LA VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL ACICLICO DE H_2O ---→ MV.

No.	COMPUESTO	V_{50}	LOG V_{50}	pKb		U_{50}
1	Hexilamida	142	2.152	14.5	0.88	72
2	Trietilamina	140	2.146	3.33	1.44	100
3	Acetamida	139	2.143	14.5	-2.6	97
4	4-nitro-N-óxido de piridina.	113	2.053		-1.72	100
5	Etilamina	112.5	2.051	3.36	-0.11	150
6 +	Dietilamina	95	1.978	3.01	0.57	56
7 +	n-Butilamina	84	1.924	3.40	0.97	106
8 +	n-Hexilamina	81	1.908	3.36	2.05	67.5
9	β, β, β -triclo. roacetamida.	74	1.870	14.5	1.13	100
10 +	Etilendiamina	67	1.826	7.2	-2.00	43.5
11	Quinuclidina	64	1.806	3.5	0.15	82.5
12 +	1,12-Diaminododecano.	62	1.792	5.44	3.4	54
13 +	n-Octilamina	53	1.724	3.35	3.13	68.5
14	4-mercaptopiridina.	47	1.672	12.57	0.39	70
15 +	n-Decilamina	41	1.613	3.36	4.09	37.5
16 +	n-Dodecilamina	38	1.580	3.37	5.12	17.5
17	β, β, β -triclo roetilamina.	35	1.544	8.53	1.32	126
18 +	Tetrametilendiamina.	19	1.279	5.22	-1.72	30
19 +	1,6-Diaminohexano	12	1.079	4.17	0.16	6
20 +	1,8-Diaminooctano	5	0.699	5.55	1.22	3.5
21	Colidina	4	0.602	9.3	1.72	100
22 +	1,10-Diaminododecano.	3	0.477	5.52	2.32	3.5
23	Quinolina	2.5	0.398	9.5	2.02	80
24	Piridina	2.5	0.398	8.8	0.62	110

NOTA: Los pKbs de los desacoplantes se obtuvieron de la literatura (ver referencias en material y métodos).

+ Los valores de V_{50} de estos compuestos se obtuvo de las referencias 1 y 4.

CONCLUSIONES

Las actividades desacoplantes de bases y compuestos nitrogenados sobre el transporte de electrones basal acíclico en teda la cadena transportadora de electrones, fotosistemas I y II, se relacionaron con los pKbs y los logaritmos de los coeficientes de reparte. Los resultados encontrados son los siguientes:

1) No existe una relación directa entre V_{50} y el pKb de los compuestos nitrogenados ensayados, ya que compuestos como las amidas, las cuales tienen valores de pKb de 14.5 y que por lo cual no deben protonarse, sorprendentemente presentan una gran actividad desacoplante; a su vez, compuestos como la piridina o quinuclidina casi no poseen actividad desacoplante comparada con las actividades de las amidas o algunas aminas; aunque estos compuestos (piridina y quinuclidina) son más básicos que las amidas; por lo tanto se sugiere que no es necesaria la protonación como un requisito en el mecanismo de desacoplamiento.

2) La solubilidad de los desacoplantes en sistemas acuosos e lipoprotéicos, o sea, la relación entre el logaritmo de los coeficientes de reparte y el poder desacoplante (V_{50}) de los compuestos estudiados no concuerdan con la hipótesis de Mitchell en el aspecto del lugar en donde se encuentra la acumulación de protones durante la transducción de energía en la fotofosforilación, ya que desacoplantes con valores de Log P o opuestas presentan actividades desacoplantes (V_{50}) máximas y

similares, como en el caso de la trietilamina y la acetamida, por otro lado desacoplantes con valores de Log P semejantes presentan actividades diferentes.

3) El impedimento estérico no es un factor que afecte la actividad de un desacoplante; esta observación se dedujo al comparar la actividad de los compuestos trietilamina y quinuclidina (gráficas 1, 4 y 7) los cuales son del mismo tamaño, pero el primero presenta conformaciones variables y el segundo es rígido, se esperaba que las velocidades de protonaciones fueran mayores para la quinuclidina, en cambio se encontró el resultado contrario, reflejado por las actividades más altas de la trietilamina. Los pKbs son bastante semejantes. ...

4) No se encontró una relación estructura-actividad en los compuestos nitrógenados, al aplicarles una correlación tipo Hansch, es decir, no hubo relación alguna entre la estructura química de los compuestos y su actividad desacoplante.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Arias G., Tesis Profesional, Fac. Química, UNAM. México : 116 pp. (1976).
- 2) Bassham, J., A., Sci. Am., June (1962).
- 3) Clark, L. C., Wolf, R., Granjer D. and Taylor, Z. J., Appl. Physiol., 6 : 189 (1953).
- 4) García Salvador, Tesis Profesional, Fac. Química, UNAM. México : 64 pp (1979).
- 5) Godvinjee and Godvinjee Rajni, Sci. Am., 231, 68, (1974).
- 6) Hansch, C. E. et al., J. Amer. Chem. Soc., 87 , 2738 - 42, (1965).
- 7) Hansch, C. E. and Fujita, T. J. Amer. Chem. Soc. 86 , 1616 - 26 (1964).
- 8) Hansch and Leo, Substituents constants for correlation analysis in Chemistry and Biology, Cap. 3 y 4, Edit. John Wiley & Sons. New York (1979).
- 9) Isawa, S., Heath, R. L., Hind, G. ; Biochim. Biophys. Acta 180 , 388 - 398 (1969).
- 10) Jagendorf, A. T. and Uribe, E., Brokhaveen Symp. Biol., 19 219 (1966).
- 11) Joliot, Pierre et Anne, La Recherche, 9 , 331 (1978).
- 12) Lange's Handbook of Chemistry, John A. Dean, Thirteenth edition, Mc. Graw-Hill Book Company , Table 5 -8 , 46 (1985).
- 13) Levine R. P., Sci. Am., December (1969).
- 14) Mackinnon, G., J. Biol. Chem., 140 : 315 (140).
- 15) Malmsta, T., Enke and Crouch., Electronic analog measurement and transducer, ES W. A., Benjamin

Inc. U.S.A. P35 (1973).

- 16) Merck Index. Merck and Company 8th. edition.
- 17) Mitchell, P., Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 47 : 654 (1960).
- 18) Mitchell, P., Nature, 191 , 144 (1961).
- 19) Patai S. "The Chemistry of the amino group." Interscience Publishers, John Wiley.
- 20) Purcell, William and Clayton J. M., Adv. in Chem. Series. Drug Discovery, 108 , Cap. 5., 123- 141 (1971).
- 21) Rabinowitch, E. and Govindjee. "The role of chloropyll in photosynthesis". Sci. Am., July (1965).
- 22) Reeves, S. C. & Hall, D. O. "Higher plant chloroplasts *grana*: general preparative procedures (excluding high carbon dioxide fixation ability Chloroplasts)". Methods in Enzimology, 69 , 85 - 9 (1980).
- 23) Slater, E. and Myers, D. K., Biochem. J., 67 , 558 (1957).
- 24) Strayer, L., Bioquimica, Ed. Reverte, Cap. 19., (1976).
- 25) Taoki, T. et al., Biochim. Biophys. Acta, 352 , 160 , (1974).
- 26) Tchapla A. Tet., 38, 113 - 118 (1982).
- 27) Vernon, L. P., Zangg, W. S. ; J. Biol. Chem. 235 , 2728 - 2738 (1960).
- 28) Wepster, B. M. Rec. Trav., Chim. 71 , 1159 -117 (1952), "Steric effects on mesomeris".
- 29) William Bryan, L., and Keith Wilson, "Principles and Techniques of practical Biochemistry, New York, 41 P (1975).
- 30) Williams R. J. P. "Electron Transfer and Energy Conservation"., Current Topics Bioenergetics, Sanadi, Acad. Press Inc. New York : 3 ,

79 - 156 (1969).

- 31) Williams R. J. P., FEBS Letters, 43, 189 - 194 (1974).
- 32) Williams R. J. P., Biochim. Biophys. Acta., 505, 1 - 44 (1978).
- 33) Witt, H. T., Schlodder, E. and Vredenberg, W. J. Biochim. Biophys. Acta, 462, 613 - 621 (1977).
- 34) Zelitch, I. C. & EN, P 28 (1979).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Blas Lotina por su apoyo, enseñanzas y asesoría durante la elaboración de este trabajo.

También quiero agradecer a la Dra. Martha Albores sus útiles consejos.

Por último agradezco a Reyes Varela y mi hermano Roberto por su colaboración en la realización de esta tesis.