



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

"ESTUDIO DEL MECANISMO(S) DE ACCION DE  
DERIVADOS DE QUINONA SOBRE LA FOTOSINTESIS  
EN CLOROPLASTOS DE ESPINACA (Spinacea oleacea)"  
in vitro"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**ALEJANDRO TOVAR MENDEZ**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

QUERIA TAN SOLO HACER LO QUE BROTABA  
ESPONTANEAMENTE DE MI SER.

¿ POR QUE HABIA DE SERME TAN DIFICIL ?

H. HESS.

A MIS MADRES:

JOSEFINA MADRE E HIJA.

A MIS HERMANOS:

RICARDO, MINERVA, CARLOS, CARMEN, IRENE Y MONICA.

A FRANCIS.

A ISIDRO.

A LA BANDA...

DIRECTOR DE TESIS  
Dr. BLAS LOTINA HENSSEN.

ESTUDIO REALIZADO EN EL LABORATORIO 112 DEL  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,  
DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA,  
FACULTAD DE QUIMICA.  
UNAM.  
CD UNIVERSITARIA.

## INDICE TEMATICO

	PP
1.0. ABREVIATURAS	1
2.0. RESUMEN	3
3.0. INTRODUCCION	4
4.0. ANTECEDENTES	8
4.1. LOS HERBICIDAS	8
4.2. LA FOTOSINTESIS	9
4.3. CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES CLASES DE INHIBIDORES DE LA FOTOSINTESIS	15
4.4. LAS QUINONAS EN LA FOTOSINTESIS	16
5.0. MATERIALES Y METODOS	18
5.1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS	18
5.2. CUANTIFICACION DE CLOROFILA	18
5.3. TRATAMIENTO DE CLOROPLASTOS CON KCN	19
5.4. EVALUACION <i>in vitro</i> DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS	20
5.4.1. CAPTACION DE PROTONES (C.P)	20
5.4.2. FOTOFOSFORILACION (Síntesis de ATP)	21
5.4.3. EVALUACION DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES (T.E)	22
5.4.3.1. T.E. ACICLICA DE AGUA A MV	23
5.4.3.2. REACCIONES PARCIALES	24
5.4.4. PREPARACION DE SOLUCIONES Y APLICACION DE LOS DERIVADOS DE QUINONA	28
5.5. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO METODOLOGICO	29

6.0. RESULTADOS Y DISCUSION	30
6.1. CARACTERIZACION DEL EFECTO DE LA DFAQ	30
6.2. CARACTERIZACION DEL EFECTO DE DoHFAQ, DBAQ, DMBAQ, (-) Y (+)DFHMEAQ	34
6.3. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	49
6.3.1. DESACOPAMIENTO DE LA T.E.	49
6.3.2. INHIBICION DE LA T.E.	51
7.0. CONCLUSIONES	60
8.0. BIBLIOGRAFIA	63

#### INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	PP
Tabla 1	7
Tabla 2	12
Tabla 3	53
Tabla 4	56
Tabla 5	59
Figura 1	10
Figura 2	14
Figura 3	31
Figura 4	33
Figura 5	35
Figura 6	36
Figura 7	37
Figura 8	38
Figura 9	39
Figura 10	41
Figura 11	42
Figura 12	43
Figura 13	44
Figura 14	45
Figura 15	52
Figura 16	54
Figura 17	55
Figura 18	57
Figura 19	58
Figura 20	62

## 1.0. ABREVIATURAS.

- Ar [filoquinona, aceptor electrónico secundario del FS II].
- A<sub>0</sub> [clorofila a, aceptor electrónico primario del FS II].
- ADP [adenosina difosfato].
- ATP [adenosina trifosfato].
- CCL I [complejo cosechador de luz asociado al FS II].
- CCL II [complejo cosechador de luz asociado al FS III].
- Centro Fe-S [centro activo de ferroproteínas, con actividad redox].
- CF<sub>1</sub> [factor de acoplamiento de la ATP<sub>asa</sub>].
- CF<sub>0</sub> [factor hidrofóbico de la ATP<sub>asa</sub>].
- Chl [clorofila].
- C.P. [captación de protones].
- CuSO<sub>4</sub> [sulfato de cobre].
- Cyt b<sub>6</sub> [citocromo b<sub>6</sub>].
- Cyt b<sub>559</sub> [citocromo b<sub>559</sub>].
- Cyt b<sub>6</sub>/f [citocromo b<sub>6</sub>/f].
- DAD [2,3,5,6-tetrametil-1,4-fenilendiaminal].
- DBAQ [2,5-dibencilamino-p-benzoquinonal].
- DBMIB [2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinonal].
- DCMU [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea].
- DFAQ [2,5-difenilamino-p-benzoquinonal].
- (+), (-)DFHMEAQ [ (+), (-)-2,5-di(2-fenil-2-hidroxi-1-metiletilamino)-p-benzoquinonal].
- DMBAQ [2,5-di(α-metilbencilamino)-p-benzoquinonal].
- DMSO [dimetilsulfóxido].
- DoHFAQ [2,5-di(o-hidroxifenilamino)-p-benzoquinonal].
- DoMxFAQ [2,5-di(o-metoxifenilamino)-p-benzoquinonal].
- DpHFAQ [2,5-di(p-hidroxifenilamino)-p-benzoquinonal].
- ΔpH [gradiente de protones].
- EDTA [ác. etilendiaminotetra acético].
- EPR [Resonancia Spin Electromagnética].
- FAD [dinucleótido de flavina y adeninal].
- Fd [ferrodoxina].
- Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> [ferricianuro].

Feo [feofitina].  
Fp [NADP<sup>+</sup> - ferredoxin oxidoreductasa].  
FS I [fotosistema uno].  
FS II [fotosistema dos].  
H<sup>+</sup>-ATP<sub>ase</sub> [H<sup>+</sup>-ATP sintetasa].  
HEPES [ác. N-hidroxietilpiperizina-N'-2-etanosulfónico].  
KCN [cianuro de potasio].  
MES [ác. N-2-morfolinoetanosulfónico].  
MV [metil viológeno].  
μeq [μequivalentes].  
NADP<sup>+</sup> [nicotinamida adeninucleótido].  
Pi [fosfato inorgánico].  
P<sub>680</sub> [centro de reacción del FS III].  
P<sub>700</sub> [centro de reacción del FS II].  
PC [plastocianina].  
PMS [N-metilfenazina metosulfato].  
PQ [plastoquinona].  
PQH<sub>2</sub> [plastohidroquinona].  
Qa [PQ, aceptor electrónico primario del FS II].  
Qb [PQ, aceptor electrónico primario del FS III].  
Rxn [reacción (es)].  
T.E. [transferencia de electrones].  
T.E.A. [T.E. acoplada a la síntesis de ATP].  
T.E.B. [T.E. en condiciones basales].  
T.E.D. [T.E. desacoplada de la síntesis de ATP].  
TMQ [tetrametil-p-benzoquinona].  
TMQH<sub>2</sub> [tetrametil-p-benzohidroquinona].  
UHDBT [alquilhidroxidioxobenzoatiazol].  
Z [donador electrónico primario de FS III].



## 2.0. RESUMEN.

En la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis *in vitro*, se evaluaron derivados de benzoquinona 2,5-dialquilaril(o 2,5-diaril)amino sustituidas. Se encontró que uno de los derivados DFAQ actúa como un inhibidor-desacoplante débil. En tanto que el resto de los derivados actúan como inhibidores de la transferencia de electrones, (+) y (-)DFHMEAQ actúa a nivel del cyt b<sub>6</sub>/f, y DoHFAQ, pDpHFAQ, DoMxFAQ, DBAQ y DMBAQ inhiben a nivel del FS I, esta es la primera vez que se encuentra inhibición por derivados de p-benzoquinona en este sitio.

La inhibición por DFHMEAQ es estereoespecífica siendo mayor la actividad inhibitoria para el estereoisómero (-)DFHMEAQ.

Finalmente, se encontró que un hidroxilo localizado a dos átomos de carbono del átomo de nitrógeno (de los sustituyentes del núcleo p-benzoquinona) es importante para la unión de estos derivados al sitio receptor en el FS I y probablemente sea importante para el respectivo sitio en el cyt b<sub>6</sub>/f.

### 3.0. INTRODUCCION.

En la optimización de la productividad en los campos agrícolas la práctica general es el monocultivo; sin embargo, el monocultivo es fácilmente plagado por insectos, malezas, etc., reduciendo su productividad, por lo que es necesario controlar dichas plagas (1,46).

En particular las malezas se han controlado mediante diferentes métodos: biológico, mecánico y químico (24). Actualmente los métodos más utilizados son el mecánico y el químico, sin embargo debido a lo costoso de utilizar el método mecánico a gran escala, el químico es preferido (14,76,70). Se sabe que los compuestos químicos (conocidos como herbicidas) son selectivos, específicos, de toxicidad controlable y económicos (14). Si bien regularmente se combinan ambos métodos para un mejor control de las malezas (14,24).

De los herbicidas de mayor uso en el país, 16 son de fabricación nacional y 33 son de importación. Los de fabricación nacional (de mayor consumo) son compuestos que en otros países ya han terminado su ciclo de vida tecnológico, bien por que su uso esta prohibido o por no ser efectivos (46); haciéndose necesario plantear el desarrollo de herbicidas de menor toxicidad y de mayor efectividad que los herbicidas de fabricación nacional.

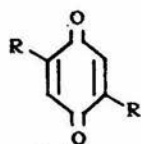
Para el desarrollo de herbicidas se debe realizar una intensa investigación, como la que hacen las empresas transnacionales productoras de herbicidas; la cual se inicia sintetizando o aislando de una fuente natural compuestos orgánicos, a continuación se sondea su posible actividad biocida mediante

pruebas biológicas in vitro (96,46). A partir de la década de los 80's los nuevos herbicidas se diseñan mediante su modo de acción predeterminado en vías metabólicas con bases bioquímicas sólidas (70); los compuestos con actividad inhibitoria sobre alguna reacción bioquímica particular, son modificados y caracterizados bioquímicamente con el fin de potenciar dicha actividad. Posteriormente se realizan pruebas en malezas y plantas agrícolas para conocer su efectividad y selectividad; los compuestos seleccionados en la prueba anterior son sometidos a ensayos de toxicidad, residualidad, biodegradabilidad, etc., y finalmente se hacen pruebas de campo (46,70).

Los sitios de acción de los herbicidas se localizan a nivel de cualquier enzima de una vía metabólica o en una proteína que regule la actividad de la enzima (23). Los sitios mejor conocidos son: la fotosíntesis, la formación de microtúbulos, la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos, la síntesis de aminoácidos aromáticos y lípidos, la glicólisis, la fosforilación oxidativa así como el metabolismo y síntesis de ácidos nucleicos (45,54). La inhibición de la fotosíntesis, en la fase luminosa, es uno de los efectos primarios de mayor importancia de más del 50 % de todas las clases de herbicidas comerciales, los cuales son de una gran variedad estructural (45,54). Por lo tanto compuestos que afecten a la fotosíntesis in vitro, en las reacciones fotodependientes, son compuestos con actividad herbicida potencial.

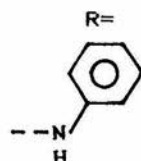
La bien documentada actividad inhibitoria de p-benzoquinonas sobre la fotosíntesis (sección 4.4); además, de como en algunas ocasiones se ha encontrado que compuestos con y sin actividad biocida, para la cual fueron sintetizados originalmente ,

presentan actividades biocidas diferentes: el objetivo de la presente tesis fue evaluar el efecto in vitro de un grupo de derivados de p-benzoquinonas (tabla 1) sobre las reacciones fotodependientes de la fotosíntesis , con vistas a encontrar entre ellas compuestos con actividad inhibitoria sobre dichas reacciones y por lo tanto herbicidas potenciales. Estas p-benzoquinonas originalmente fueron sintetizadas con fines amibicidas por el grupo de investigación precedido por el Dr Norberto Farfan (Departamento de Química, CINVESTAV, IPN).

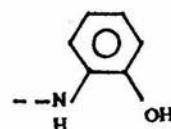


p-benzoquinona

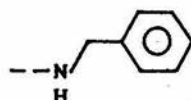
**DFAQ**  
(2,5-difenilamino-p-benzoquinona)



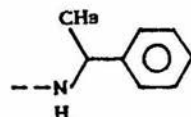
**DoHFAQ**  
(2,5-di(o-hidroxifenilamino)-p-benzoquinona)



**DBAQ**  
(2,5-di(bencilamino)-p-benzoquinona)



**DMBAQ**  
(2,5-di(α-metilbencilamino)-p-benzoquinona)



**(-) y (+)DFHMEAQ**  
( (-) y (+)-2,5-di(2-fenil-2-hidroxi-1-metiletilamino)-p-benzoquinona)

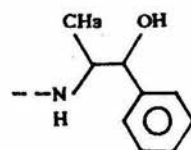


Tabla 1. Fórmula estructural de derivados de quinona: arriba, al centro el núcleo de p-benzoquinona; abajo, abreviación, nombre y representación de los grupos R para cada derivado.

#### 4.0. ANTECEDENTES.

4.1. LOS HERBICIDAS: El problema de las malezas no es reciente, ya se mencionaban hace 2000 años; compuestos químicos y varios productos industriales (p.e. desperdicios de fundiciones) se aplicaban a los lados de los caminos para eliminar la vegetación que en ellos crecía o en futuros caminos; sin embargo, los herbicidas nacen en 1896 cuando se encontraron las propiedades herbicidas de boratos, sulfatos de amonio, zinc, fierro y otros metales; posteriormente se introdujeron los primeros químicos orgánicos como la 2-metil-4,6-dinitrofenol en 1932 (14). Años después se introdujeron análogos de hormonas vegetales, como el 2,4-D (ác. diclorofenoxiacético), con gran selectividad herbicida; y los herbicidas residuales no selectivos; posteriormente herbicidas selectivos como las fenilureas y triazinas sustituidas, así como los no residuales tal como el diquat y el paraquat (MV), que pueden considerarse como el grupo de herbicidas más recientes, aunque estos últimos bastante tóxicos en humanos (14,76).

Muchos de los sitios de ataque de los herbicidas a nivel molecular son desconocidos, siendo la fotosíntesis uno de los sitios mejores conocidos. Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis son los más estudiados por su baja toxicidad en mamíferos y por ser éste uno de los efectos primarios de más del 50% de las clases de herbicidas comerciales. Dichos herbicidas pueden actuar como inhibidores de la transferencia electrónica, desacoplantes, inhibidores-desacoplantes, inhibidores de la transducción de energía, o como aceptores electrónicos (45,54).

De dichos modos de acción el más importante a nivel experimental es el bloqueo de la T.E. en el lado reductor del FS II en el sitio de  $Q_a$  (figura 2) (74,60,63); han sido identificadas dos proteínas a las que se unen dichos herbicidas, una de 32 kD para la mayoría de estos herbicidas y otra de entre 41 a 43 kD para los derivados fenólicos (74). El tener una única zona de inhibición en la cadena redox fotosintética permite tener un modelo simple de estudio para el diseño de nuevos herbicidas. Actualmente se llevan a cabo estudios de estructura-actividad de compuestos inhibidores de la T.E. in vitro; los datos obtenidos in vitro son correlacionados con la actividad herbicida in vivo; además en algunos casos se realizan estudios de química teórica (p.e. cálculo de parámetros electrónicos y estéricos) y de propiedades fisicoquímicas (p.e. determinación de  $pK_a$ , coeficiente de partición y potencial redox) de las nuevas estructuras, para correlacionarlos con su actividad biológica, todos estos estudios son realizados con el objeto de predecir estructuras de mayor potencia inhibitoria (8,9,10,11,16,21,42,52,95).

**4.2. LA FOTOSINTESIS:** En las plantas superiores el proceso fotosintético es realizado en organelos celulares llamados cloroplastos. El proceso primario de conservación de energía (reacciones luminosas) se efectúa en las membranas lamelares e intergranales del tilacoide, donde se encuentran los pigmentos cosechadores de la energía luminosa. Las enzimas del proceso secundario (en el que se forman carbohidratos a partir de  $CO_2$ , a expensas de la energía capturada en el proceso primario) se localizan en el medio ambiente acuoso (estroma) de los

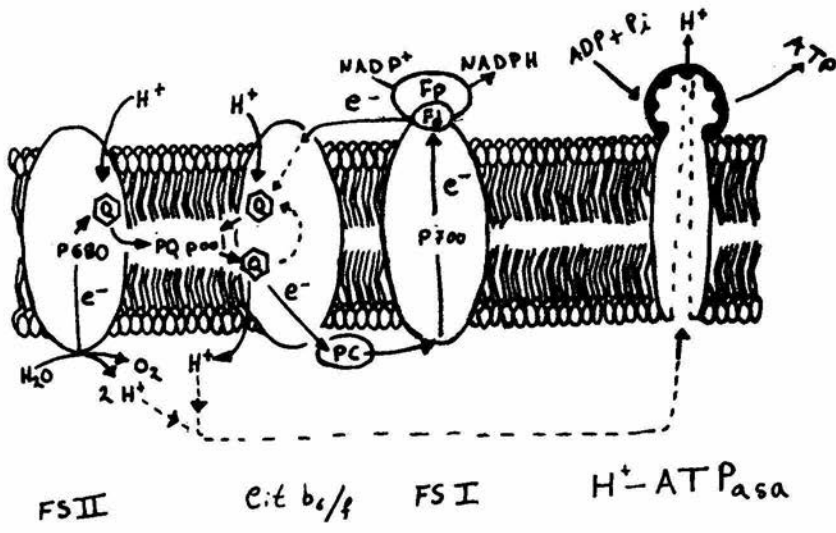


Figura 1. Representación de la T.E. fotosintética acoplada a la síntesis de ATP. Se muestra la T.E. acíclica de agua a NADP<sup>+</sup>, el ciclo electrogénico Q y la T.E. cíclica.



cloroplastos (6,12,81).

Dado que el presente proyecto involucro únicamente el proceso primario de la fotosíntesis, sólo se describirá brevemente dicho proceso.

Las reacciones fotosintéticas dependientes de la luz se pueden generalizar como la transferencia de equivalentes de reducción ( $e^-$ ) desde el potencial redox del agua hasta el potencial redox del  $\text{NADP}^+$  (o T.E.) a través de la cadena transportadora de electrones y la síntesis de ATP acoplada a dicha T.E.; el término cadena transportadora de electrones se utiliza para calificar al sistema constituido por enzimas oxidoreductoras que catalizan la T.E., esta cadena se organiza en tres complejos supramoleculares: el FS II, el cyt  $b_6/f$  y el FS I; todos los componentes proteicos de la cadena redox forman parte de la membrana tilacoidal del cloroplasto, los cuales se encuentran como polipéptidos extrínsecos e intrínsecos (tabla 2, figura 1 y figura 2) (3,12,19,29,81).

Otro complejo importante es la  $\text{H}^+$ -ATPasa que consta de un factor unido a la membrana ( $\text{CF}_i$ ) con la actividad catalítica y de un factor hidrofóbico agregado a la membrana ( $\text{CF}_o$ ) cuya función es la de unir a la  $\text{CF}_i$  a la membrana y translocar protones desde el lúmen hacia  $\text{CF}_i$  a través de la membrana, a favor del gradiente potencial electroquímico (tabla 2 y figura 1) (3,12,19,41,81).

El proceso de la T.E. (figura 2) se inicia con la captación de energía luminosa (fotón ó cuanto de luz) por el CCL II en el FS II, almacenándose en forma de energía de excitación que es transferida de pigmento a pigmento hasta la clorofila especializada (probablemente un dímero de clorofila a) del centro

Complejo		P.M. (Kd)	Componentes asociados
FS II	Núcleo	47,	P800, Feo, Chl a.
		43	Z, Ga.
		34	Mn <sup>+2</sup> (?).
		10	Cyt b550.
		32	Ga.
	CCL II	28	Chl a/b.
		26	Chl a/b.
		24	Chl a/b.
	Periféricos	33	Ca <sup>+2</sup> (?), Cl <sup>-</sup> .
		23	Ca <sup>+2</sup> (?).
17		---	
70		P700, Ao, Chl a.	
FS I	Núcleo	25	---
		20	PC.
		18	Fe-S.
		16	Fe-S.
		8	Fe-S.
	CCL I	4 polipéptidos	Chl a/b.
	Periféricos	de 19 a 24	Fe-S.
		11 (Fd)	FAD.
		33 (Fp)	Cyt f.
	Cyt b6/f	33,34	Cyt b6.
23		Fe-S.	
20		---	
17		---	
59 (α)		---	
ATPase	CF <sub>1</sub>	56 (β)	---
		37 (γ)	---
		18 (δ)	---
		13 (ε)	---
		17 (I)	---
	CF <sub>0</sub>	11 (II)	---
		9 (III)	---
		10.5	Cu <sup>+2</sup> .
	PC		

Tabla 2. Composición polipeptídica de los complejos funcionales de la membrana tilacoidal.

de reacción  $P_{680}$  el cual se excita y dona un electrón, vía una feofitina, a un aceptor primario  $Q_A$  (una PQ que se encuentra complejada con el centro Fe-S del FS II). El  $P_{680}^+$  es reducido por el complejo liberador de oxígeno (en este complejo la hidrólisis de dos moléculas de agua genera un mol de  $O_2$ , y cuatro protones liberados a el lumen tilacoidal, además de cuatro electrones transportados a la cadena redox en un mecanismo de cuatro pasos), los electrones son transferidos de uno en uno a Z (probablemente un residuo de tirosina (50)) que reduce directamente al  $P_{680}^+$ .  $Q_A$  reduce a  $Q_B$  (otra PQ complejada con el mismo centro Fe-S que  $Q_A$ ) en un doble paso con captación de dos protones desde el estroma,  $Q_B$  en la forma reducida ( $PQH_2$ ) se intercambia rápidamente por una molécula de PQ del pool membranal (de acuerdo con la literatura la PQ unida este sitio redox es denominado  $Q_B$  para diferenciar sus propiedades y las del pool de PQ libre). El  $PQH_2$  viaja por la membrana al complejo cyt  $b_6/f$  reduciéndolo, en donde dos protones son liberados a el lumen tilacoidal, con liberación de la PQ oxidada, (el cyt  $b_6/f$  actúa como bomba de protones al catalizar el ciclo electrogénico  $\theta$ ), un electrón viaja desde el cyt  $b_6/f$  hasta la PC (una proteína-Cu<sup>+2</sup> la cual acepta y dona un electrón) que a su vez reduce a la clorofila especializada (probablemente un dímero de clorofila a) del centro de reacción  $P_{700}$  del FSI; El CCL I absorbe un fotón y lo transmite al  $P_{700}$ , cuyo centro en estado excitado dona un electrón a  $A_0$  (monómero de clorofila a) éste a  $A_1$  (una quinona) luego el electrón viajan a través de tres centros Fe-S hasta la Fd y finalmente la Fd reduce al  $NADP^+$  (en un doble paso), en una reacción catalizada por la Fp (3,12,18,19,29,81).

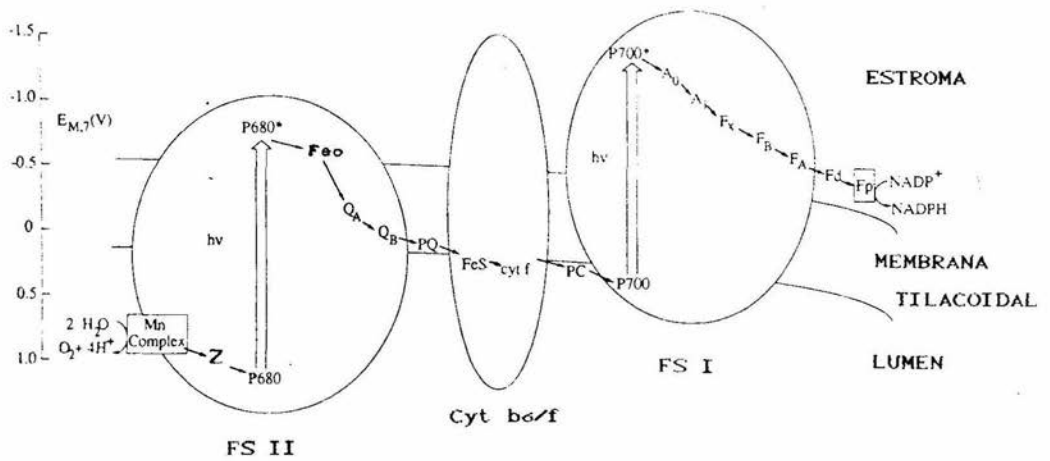


Figura 2. Esquema Z de la T.E. acíclica en plantas. La posición vertical de cada acarreador electrónico corresponde a su posición redox a pH 7. Las flechas dobles indican fotoexcitación y las flechas sólidas muestran la vía de la T.E. de agua a NADP<sup>+</sup>. Los acarreadores móviles se muestran fuera de los ovalos que indican los complejos enzimáticos en la membrana tilacoidal.

La separación de cargas vectorial en los centros de reacción y el transporte vectorial de protones genera el gradiente electroquímico a través de la membrana tilacoidal (en la fotólisis del agua y en el complejo cyt *b<sub>6</sub>/f*), del que el  $\Delta pH$  contiene la energía libre principal que permite la síntesis de ATP por la  $H^+$ -ATP<sub>asa</sub> (figura 1). El paso de protones por la  $H^+$ -ATP<sub>asa</sub> genera un cambio conformacional en CF<sub>1</sub> mediante el cual se da la transducción de energía para la síntesis de ATP (12,19,41,81).

Una vía alternativa para los electrones provenientes desde P700 es que los electrones de alto potencial de la Fd pueden ser transferidos al cyt *b<sub>6</sub>/f* más que a NADP<sup>+</sup>, y regresar a P700 (figura 1): esta T.E. cíclica solo bombea protones en el cyt *b<sub>6</sub>/f*, y el  $\Delta pH$  es utilizado para la síntesis de ATP; en este proceso, llamado fosforilación cíclica, se genera ATP sin concomitante formación de NADPH y sin liberación de oxígeno (81).

#### 4.3. CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES CLASES DE INHIBIDORES DE LA FOTOSINTESIS:

**INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES:** La T.E. es inhibida cuando uno (o más) de los acarreadores de electrones de la cadena redox son removidos desde la membrana por solubilización o son inactivados por interacción enzima-compuesto químico. Estos inhibidores bloquean las T.E.B., T.E.A y T.E.D, e inhiben la C.P. y la síntesis de ATP (25,38,54,55).

**DESACOPLANTES:** Estos disocian la T.E. y la síntesis de ATP, por disipación del estado energizado de la membrana tilacoidal. Estos compuestos estimulan las T.E.B. y T.E.A., inhiben la síntesis de ATP y la C.P., sin afectar la T.E.D. (38,49,54,55).

**INHIBIDORES DE LA TRANSDUCCION DE ENERGIA:** Estos afectan directamente la síntesis de ATP actuando sobre  $CF_0$  y/o sobre  $CF_1$ ; inhiben la T.E.A. y la síntesis de ATP, sin efecto sobre las T.E.B., T.E.D. y la C.P. (38,49,54,55).

**INHIBIDORES-DESACOPLANTES:** Este término se utiliza para compuestos que presentan características de inhibidores y de desacoplantes. Estos compuestos inhiben la T.E. a pHs alcalinos (pH 8) y lo desacoplan a pHs ácidos (pH 6). En algunos casos presentan ambos efectos en el mismo pH (38,49,54,55).

**ACEPTORES DE ELECTRONES:** Estos compuestos compiten con algún componente de la cadena redox tilacoidal y son reducidos. Estimulan la T.E. cuando se utiliza al ferricianuro como aceptor de electrones ya que lo reducen, y en el caso de los compuestos bipyridílicos como el MV, aceptan electrones pero se oxidan con el oxígeno del medio generando radicales libres (superóxido y  $H_2O_2$ ), estos a diferencia de los no autooxidables son muy tóxicos (54,55).

**4.4. LAS QUINONAS EN LA FOTOSINTESIS:** Las quinonas naturales participan en todos los sistemas membranales que realizan la transferencia de electrones en los seres vivos (bacterias, mitocondrias y cloroplastos), y están presentes en un exceso denominado pool de plastoquinona. La unión de las quinonas a las proteínas de las enzimas redox membranales modifica las características termodinámicas y la especificidad de reacción de dichas quinonas, en particular tal unión tiende a estabilizar la forma semiquinona asegurando así un proceso de transferencia electrónica controlado y no una simple e indiscriminada reacción redox entre una especie reductora y una especie oxidante (60).

La pérdida de el control normal de las quinonas membranales refleja cambios en el medio ambiente de las mismas, la inhibición de las reacciones redox de las quinonas naturales, por quinonas sintéticas u otros compuestos, ha sido utilizado para la elucidación de las secuencias parciales de la cadena transportadora de electrones, además, muchos de estos inhibidores juegan un papel importante en el control de plagas como herbicidas (60,63).

La inhibición por compuestos exógenos de las cadenas redox en la porción donde participan las plastoquinonas son de especial interés, y en particular si presentan el núcleo 1,4-quinona (p-benzoquinona), porque estas sustancias semejan las plastoquinonas. El sitio de acción y tipo de efecto de los derivados de p-benzoquinona no necesariamente es el mismo, dependiendo fuertemente de la sustitución que presenten (63,75). Muchas de las formas reducidas (quinoles) de las quinonas sintéticas son buenos donadores electrónicos en la cadena redox tilacoidal, donando electrones a nivel del pool de PQ (40,93), y a nivel del complejo Cyt  $b_6/f$  (36,71,91). En la forma oxidada aceptan electrones desde el FS II (60,71,75,78,86,88,89,92,94). Como inhibidores de la T.E. actúan tanto en la fotoreducción dependiente del FS II a nivel de  $Q_a$  (75,91), como en la fotoreducción dependiente del FS I a nivel del centro Fe-S del cyt  $b_6/f$  (48,62,89,92), o bien ambas fotorreducciones (13,63).

En este trabajo se estudió el efecto de derivados de p-benzoquinona sobre la fotosíntesis in vitro, que no han sido caracterizadas con anterioridad.

## 5.0. MATERIALES Y METODOS.

5.1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS: Técnica de aislamiento de cloroplastos intactos (51). Se pesaban aproximadamente 30 gramos de hojas frescas de espinacas, lavadas con agua destilada, y seccionadas en segmentos menores de 0.5 cm. se colocaban en un vaso de licuadora con 100 ml de medio de aislamiento (Sorbitol 350mM, Ac ascórbico 5mM, MES 20 mM, a pH 6.5) a 4°C. Se homogeneizaban 5 segundos a velocidad máxima, el homogenado fue filtrado en 20 capas de gasa y centrifugado a 300g por 4 minutos a 4°C. El precipitado (cloroplastos intactos) fue lavado una vez con 50 ml de medio de aislamiento y finalmente se resuspendía en 1-2 ml de medio de resuspensión (Sorbitol 350 mM, EDTA 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, HEPES 50 mM, a pH 7.6). En todos los casos el paquete de cloroplastos fue resuspendido cuidadosamente con un pincel de cerdas suaves, separando luego alícuotas de 1 ml y manteniéndolas en la obscuridad por 1 hora a 4°C antes de utilizarlos en los ensayos, de esta manera se obtenían con buena actividad.

Se utilizó como material biológico cloroplastos de espinaca por la gran facilidad de aislamiento de cloroplastos desde espinacas y a que la mayoría de los estudios de inhibidores de la fotosíntesis in vitro se han realizado en estos cloroplastos.

5.2. CUANTIFICACION DE CLOROFILA: La clorofila se cuantificó por el método de Arnon (4). Se adicionó 0.02 ml de suspensión de cloroplastos en 2 ml de acetona al 80% (en agua v/v), en un tubo de ensaye que era tapado y agitado vigorosamente, manteniéndolo en



obscuridad por 5 minutos para permitir la extracción y solubilización de la clorofila así como para evitar su degradación por la luz; a continuación se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos en una centrifuga clinica para sedimentar las proteínas y otros residuos de los cloroplastos. Por ultimo se determinó la absorción del sobrenadante a 663 nm y a 645 nm, el contenido de clorofila en las muestras de cloroplastos se calculó utilizando la siguiente relación:

$$C = [ (20.29) (Abs_{645}) + (8.05) (Abs_{663}) ] 100.$$

Donde C=  $\mu$ g de chl / ml;

20.29 y 8.05 son constantes derivadas de los coeficientes de extinción de la clorofila;

y 100= factor de dilución.

**5.3. TRATAMIENTO DE CLOROPLASTOS CON KCN:** El tratamiento con KCN inhibe la T.E. de agua a MV, y su sitio de acción es a nivel de la PC, de la que quelata el  $Cu^{+2}$  esencial para su actividad redox (por ser cofactor de esta enzima), sin afectar los demás componentes de la cadena redox de los tilacoides (37,68,67).

**Método:** Una alícuota de cloroplastos equivalente a 300  $\mu$ g de clorofila se adicionó a 1 ml de medio de tratamiento con KCN (Sacarosa 100 mM,  $MgCl_2$  1mM, tricina 90 mM, KCN 30 mM y  $Fe(CN)_6 \times 50 \mu M$  a pH 8) y se mantuvo en la obscuridad a 4°C por 30 minutos. El control para el tratamiento anterior fue similar excepto que el medio contenía KOH 30mM en vez del KCN (68).

#### 5.4. EVALUACION in vitro DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS:

Debido a que el medio utilizado para evaluar dichas actividades es hipotónico, la membrana externa de los cloroplastos intactos es lisada, solubilizándose el NADP<sup>+</sup> y la ferredoxina de las membranas tilacoidales; por lo cual es necesario adicionar al medio ambos elementos naturales de la cadena en concentraciones grandes o bien un aceptor de electrones artificial en sustitución (85). En los ensayos de la síntesis de ATP, la C.P., las T.E.B., T.E.A., y T.E.D., se utilizó MV como aceptor de electrones artificial.

5.4.1. CAPTACION DE PROTONES (C.P): El método se basa en el cambio de pH del medio en una dilución de membranas tilacoidales, inducido por la T.E. en presencia de luz y que es proporcional al gradiente electroquímico generado por los sitios o bombas de C.P. en función de tiempo (58).

Método: Se adicionó un volumen de suspensión de cloroplastos equivalente a 20 µg de clorofila por ml (el volumen final usado para cada ensayo fue de 3ml) de medio para la C.P. (Sorbitol 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 100 mM, Tricina 1 mM y MV 50 µM, ajustado a pH 8 en el momento del ensayo con soluciones diluídas de HCl o KOH). Las muestras se iluminaban con un proyector de transparencias, incidiendo el haz luminoso a través de una lente de Izawa (CuSO<sub>4</sub> al 2% en H<sub>2</sub>O) para eliminar el calor y filtrar la luz (nota: el lente se utilizó en todos los ensayos realizados en este trabajo), con agitación continua a 4°C. Simultáneamente se registraron los cambios de pH del medio en función del tiempo con un potenciómetro de escala expandida conectado a un graficador. Después de 1 minuto se apagó la fuente luminosa y se adicionó 10 µl de HCl 0.01N para

titular el cambio de pH observado. La velocidad de C.P. se calculo empleando la siguiente relación:

$$V = A h/c.$$

Donde V= Velocidad en  $\mu\text{moles H}^+$  / (mg chl) (hr);

A=  $\mu\text{moles H}^+$  usados en la titulación / altura del trazo en cm;

h= pendiente de la curva obtenida durante la iluminación de los cloroplastos en cm / hr; y

c= Concentración de clorofila empleada en mg.

**5.4.2. FOTOFOSFORILACION (Síntesis de ATP):** Se realizó por el método potenciométrico (20,59). Se ha calculado a partir de las constantes de disociación que a pH 8 se consume un mol  $\text{H}^+$  por mol ATP sintetizado en presencia de  $\text{Mg}^{+2}$  según la siguiente reacción:



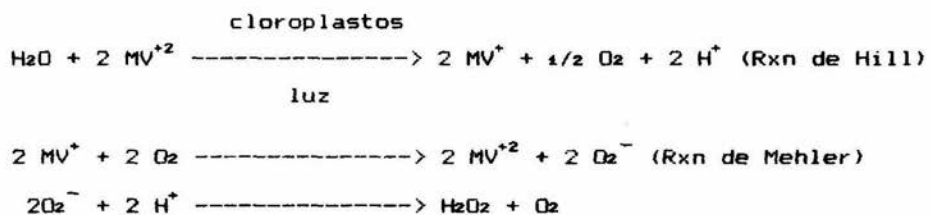
De manera que a pH 8, el  $\Delta\text{pH}$  inducido en una muestra de cloroplastos al ser iluminada, es directamente proporcional a la síntesis de ATP, durante los primeros 30 segundos de iluminación.

**Método:** El procedimiento es similar al descrito para la C.P., excepto por el medio de reacción que contenía ADP 1 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM (para la formación del complejo  $\text{Fi-ADP-Pi}$  desde  $\text{Fi-ADP}$ , una elevada concentración de  $\text{Pi}$  es necesario debido a que los sitios de unión para el ADP y el  $\text{Pi}$  están parcialmente sobrelapados por el ATP sintetizado) (41) y que el tiempo de reacción fue 30 segundos. Para calcular la velocidad de la síntesis de ATP se empleo la misma relación utilizada para la C.P.; las unidades de actividad están dadas en  $\mu\text{moles ATP} / (\text{mg chl}) (\text{hr})$ .

#### 5.4.3. EVALUACION DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES (T.E.):

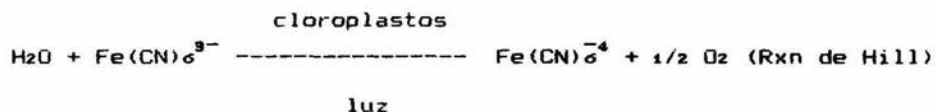
En todos los casos se evaluó por oximetría utilizando un oxímetro tipo Clark (33), determinando los cambios de O<sub>2</sub> presentes al iluminar la muestra de cloroplastos.

Evaluación de la T.E. en presencia de MV como aceptor de electrones: El MV acepta electrones a nivel de los centros Fe-S (F<sub>A</sub>/F<sub>B</sub>) del FSI (30,85), el MV tiene un potencial redox muy bajo (-0.34 a -0.65 V) siendo extremadamente oxidable con el oxígeno del medio, catalizando por esto la reacción de Mehler:



de manera que la reacción general involucra un consumo neto de oxígeno en el medio de reacción (33).

Evaluación de la T.E. en presencia de ferricianuro como aceptor de electrones: El ferricianuro acepta electrones en el mismo sitio que el MV, pero no se oxida con el oxígeno del medio, catalizando únicamente la reacción de Hill:



Así en la reacción hay liberación neta de oxígeno. El ferricianuro

es capaz termodinámicamente, además, de aceptar electrones a nivel del FS II, dado su potencial redox (+0.42 V), sin embargo su elevada hidrosolubilidad se lo impide (30,31,39,85), en este estudio se utilizó como aceptor final acoplado a un aceptor del FS II.

#### 5.4.3.1. T.E. ACICLICA DE AGUA A MV:

A) TRANSFERENCIA DE ELECTRONES BASAL (T.E.B.): Este ensayo se realizó en ausencia de ADF y  $P_i$  exógenos. La T.E.B. es muy lenta, dado que al no estar presentes los sustratos para la síntesis de ATP no se consume el  $\Delta pH$ , y por lo tanto la T.E. esta limitada (84).

Método: Una alícuota de cloroplastos equivalente a 20  $\mu g$  de clorofila por ml (el volumen final usado para cada ensayo fue de 3 ml) de medio para T.E. (Sorbitol 100 mM,  $MgCl_2$  1 mM, KCl 100 mM, Tricina 10 mM y MV 50  $\mu M$ , a pH 8). El electrodo del oxímetro se introdujo en la muestra, y se mantuvo en obscuridad por 30 segundos, con agitación continua y a 4°C. La T.E. se iniciaba iluminando la suspensión de cloroplastos, registrando simultáneamente el cambio en la concentración de oxígeno en el medio de reacción en función del tiempo con ayuda de un graficador. En cada serie de ensayos se realizaba una calibración con ferricianuro, adicionando 10  $\mu l$  de solución de ferricianuro de potasio 40 mM ( $0.4 \mu eq$  de  $Fe(CN)_6^{-3} = 0.4 \mu eq$  de  $e^-$ ) a una muestra sin MV, la mezcla de reacción se iluminaba hasta la reducción total del Ferricianuro. El cálculo de la velocidad se realizó con la siguiente relación:

$$V = A m / c.$$

Donde:  $V$  = velocidad de la T.E. en  $\mu\text{eq e}^- / (\text{mg chl})(\text{h})$ .

$A$  =  $\mu\text{eq e}^- / \text{cm}$ , de la calibración.

$m$  = Pendiente de la curva obtenida durante la iluminación de los cloroplastos en  $\text{cm} / \text{hr}$ ; y

$c$  = Concentración de clorofila empleada en  $\text{mg}$ .

**B) TRANSFERENCIA DE ELECTRONES ACOPLADA A LA SINTESIS DE ATP (T.E.A.):** Se realizó de la misma manera que para la T.E.B., pero se adicionaba ADP 1mM y  $\text{P}_i$  3mM en el medio de reacción. La tasa de T.E. es mayor aquí, pues la síntesis de ATP esta acoplada a la T.E, consumiéndose el  $\Delta\text{pH}$  por el proceso de fosforilación, estimulándose por lo tanto la T.E. (84).

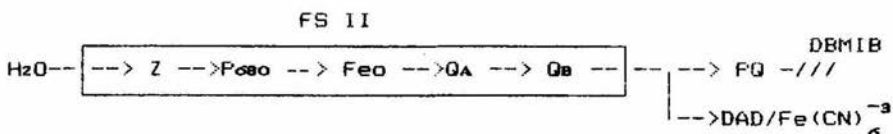
**C) TRANSFERENCIA DE ELECTRONES DESACOPLADA DE LA SINTESIS DE ATP (T.E.D.):** Se realizó de la misma manera, pero se adicionó  $\text{NH}_4\text{Cl}$  3mM al medio de reacción. En este caso dado que el cloruro de amonio promueve la disipación del  $\Delta\text{pH}$ , la T.E. se ve fuertemente estimulado, perdiéndose el control debido por la síntesis de ATP (49).

**5.4.3.2. REACCIONES PARCIALES:** Estas reacciones en términos técnicos se realizaron en la misma forma que el T.E. acíclico. Para cuantificar la eficiencia de la T.E. dependiente de cada fotosistema, por separado, se adicionó al medio de reacción inhibidores de uno u otro fotosistema, así como donadores y/o aceptores de electrones artificiales para cada fotosistema. El cambio de la concentración de oxígeno en el medio de reacción

estuvo en función del aceptor final.

#### A) TRANSFERENCIA DE ELECTRONES DEPENDIENTE DEL FS II:

(i) De agua a DAD (Agua>DAD): El inhibidor utilizado fue la DBMIB, el cual inhibe la T.E. a nivel del centro Fe-S del Cyt b<sub>6</sub>/f (30,37,47); y se utilizó el sistema acoplado DAD/Ferricianuro como aceptor, el DAD acepta electrones a nivel de Q<sub>B</sub> en el FS II (potencial redox +0.22 V), el cual se utilizó en cantidades catalíticas; mientras que el exceso de ferricianuro permite mantener al DAD oxidado durante la reacción (31,85). De esta manera la porción de la cadena redox que se evaluó en esta reacción fue:



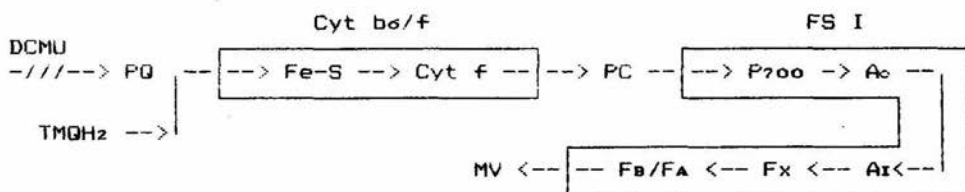
Medio de reacción : Sorbitol 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KCl 100 mM, Tricina 10 mM, DBMIB 1 μM, DAD 400 μM, y K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) 3mM, a pH 8).

#### B) TRANSFERENCIA DE ELECTRONES DEPENDIENTE DEL FS I:

i) De TMQH<sub>2</sub> a MV (TMQH<sub>2</sub>>MV): El inhibidor utilizado fue DCMU, el cual bloquea la T.E a nivel de Q<sub>B</sub> a en el FS II (30,37); el donador usado fue la TMQH<sub>2</sub>, que dona electrones a nivel del centro Fe-S del cyt b<sub>6</sub>/f (30,40). Y el aceptor utilizado fue MV. La TMQH<sub>2</sub> reacciona con el radical libre de oxígeno generado por autooxidación del MV<sup>•+</sup>, de acuerdo con la siguiente reacción:



Por lo que el consumo de oxígeno debido a la reacción de Mehler es duplicado (33), este factor se tomó en cuenta en el cálculo de la velocidad de la T.E.. La porción de la cadena redox que se evaluó en esta reacción fue:



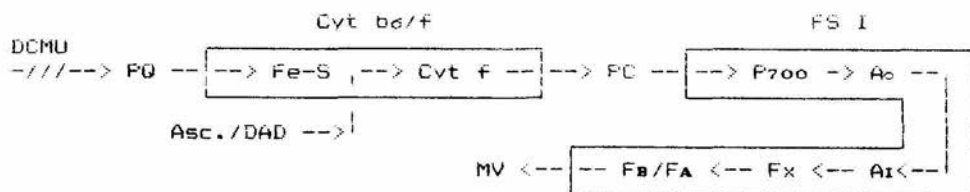
Medio de reacción : Sorbitol 100 mM, MgCl 1 mM, KCl 100 mM, Tricina 10 mM, MV 50 μM, DCMU 10 μM, y TMOHz 250 μM, a pH 8)

ii) De DAD a MV (DAD>MV): El inhibidor utilizado fue el DCMU que bloquea la T.E. a nivel de Q<sub>B</sub> en el FS II (30,37); se usó el sistema acoplado DAD/Ascorbato como donador: el ascorbato (potencial redox +0.6 V) que reduce al DAD, en exceso permitió mantener reducido al DAD durante la reacción, el DAD reducido dona electrones a nivel del cyt f en el complejo cyt b<sub>6</sub>/f (85). Y el MV se utilizó como aceptor. El ascorbato reacciona con el radical libre de oxígeno generado por autooxidación del MV<sup>+</sup>, de acuerdo con la siguiente reacción:



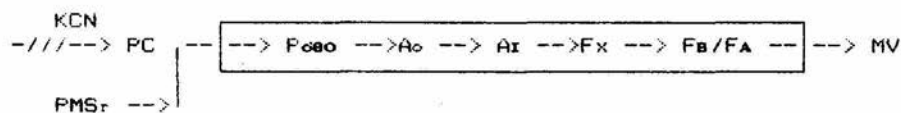
Por lo que el consumo de oxígeno debido a la reacción de Mehler es duplicado (33), este factor se tomó en cuenta en el cálculo de la velocidad de la T.E.. La porción de la cadena redox que se evaluó en esta reacción fue:





Medio de reacción : Sorbitol 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, KCl 100 mM, Tricina 10 mM, MV 50  $\mu$ M, DCMU 10  $\mu$ M, DAD 400  $\mu$ M, y Acido ascorbico 4 mM, a pH 8).

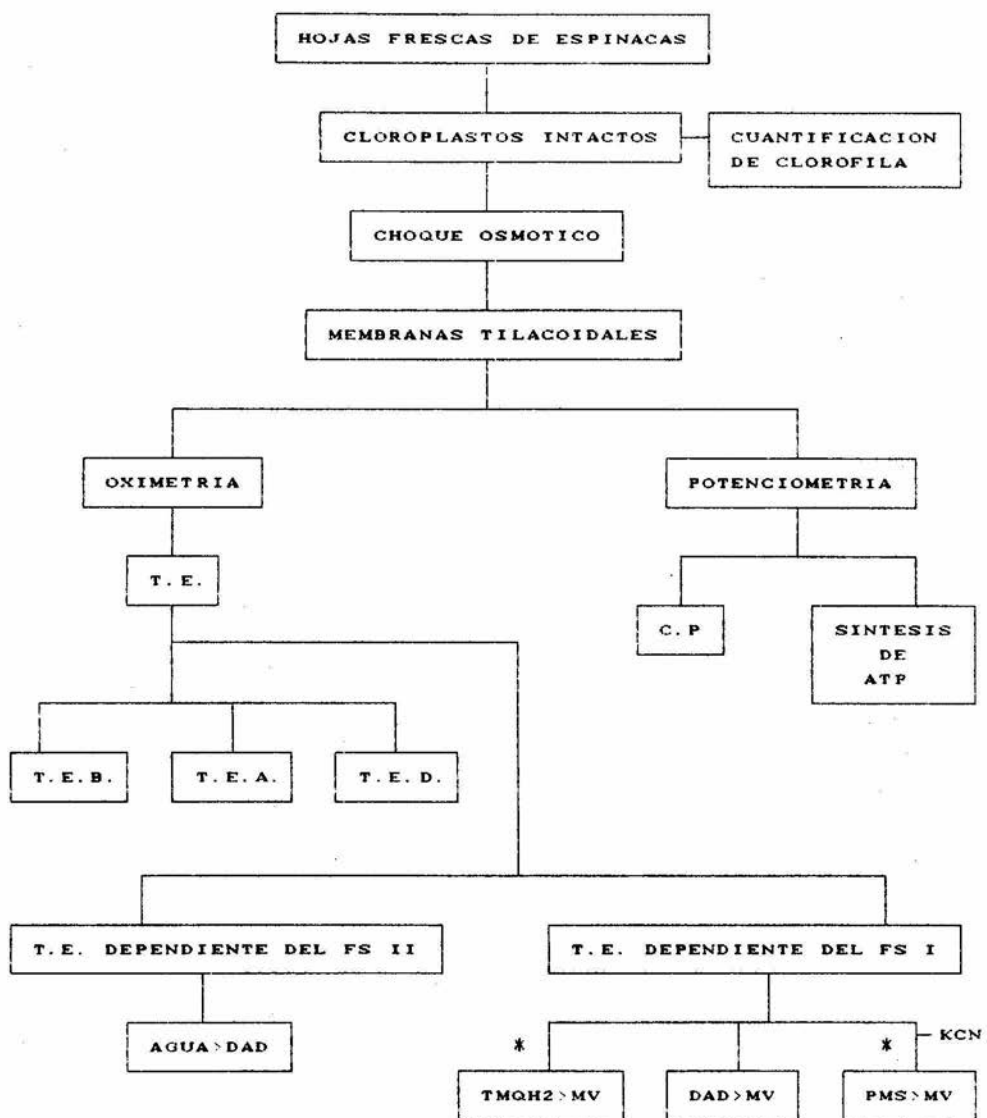
iii) De PMS a MV (PMS>MV): Se utilizaron cloroplastos previamente tratados con KCN; la PMS (con potencial redox de +0.08 V) se usó como donador de electrones: La PMS reducida (PMS<sub>r</sub>), dona electrones a nivel del cyt b<sub>6</sub>/f, sin embargo, en cloroplastos con la PC desactivada es capaz de donar electrones directamente a el centro de reacción P700 del FS I (37,68,85), el PMS fue reducido con ascorbato antes de adicionarlo al medio de reacción (82), con una equivalencia 1:1. Se empleó MV como aceptor. La porción de la cadena redox que se evaluó en este ensayo fue:



Medio de reacción :Sorbitol 100 mM, MgCl 1 mM, KCl 100 mM, Tricina 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 3 mM, MV 50  $\mu$ M y PMS 200  $\mu$ M, a pH 8).

5.4.4. PREPARACION DE SOLUCIONES Y APLICACION DE LOS DERIVADOS DE QUINONA: Los compuestos se disolvieron en DMSO (inmediatamente antes de evaluarse la actividad) inyectando directamente a la cubeta de reacción; el volumen máximo de DMSO inyectado nunca excedió 30  $\mu$ l (1% v/v final); se sabe que el DMSO a concentraciones menores del 1.5% v/v no afecta las actividades del cloroplasto que se evaluaron en este trabajo.

## 5.5. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO METODOLOGICO



### UNIDADES

T.E.  $(\mu\text{eq e}^- / (\text{mg chl})(\text{h}))$ .

C.P.  $(\mu\text{mol H}^+ / (\text{mg chl})(\text{h}))$ .

SINTESIS DE ATP  $(\mu\text{mol ATP} / (\text{mg chl})(\text{h}))$ .

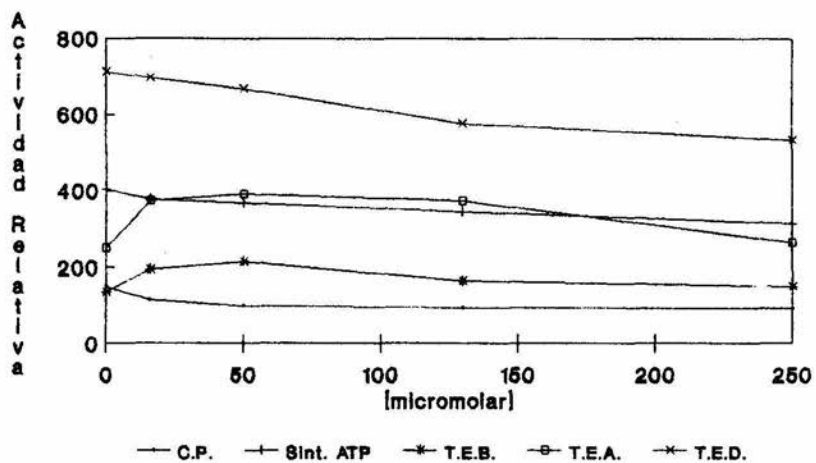
\*RXN EVALUADAS SEGUN LOS RESULTADOS DE LA RXN DAD > MV.

## 6.0. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1. CARACTERIZACION DEL EFECTO DE LA DFAQ: El efecto de concentraciones crecientes de DFAQ sobre la velocidad de C.P., la síntesis de ATP, y las T.E.B., T.E.A., T.E.D. se muestra en la figura 3. La DFAQ inhibe la C.P. y la síntesis de ATP en un 38 % y 27 % respectivamente a 250  $\mu\text{M}$ ; la inhibición de estas actividades puede ser afectado tanto por desacoplantes como por inhibidores de la T.E. (26). La T.E. presenta dos patrones diferentes, las T.E.B. y T.E.A. fueron estimuladas el 50% a 50  $\mu\text{M}$  de DFAQ, y a concentraciones mayores de 50  $\mu\text{M}$  fueron inhibidas ambas transferencias, presentando así la curva de los desacoplantes clásicos (7,58); el porcentaje de activación de la T.E.B. y la T.E.A. inducido por DFAQ es bajo por lo que es un desacoplante débil. En contraste, la T.E.D. se vio ligeramente inhibida, presentando un 20% de inhibición máxima a 250 $\mu\text{M}$ , esta característica de inhibición es causada por inhibidores de la T.E., aunque por el porcentaje de inhibición es un inhibidor débil. Por lo todo lo anterior la DFAQ es un inhibidor-desacoplante débil de la fotosíntesis, bajo nuestras condiciones de reacción.

Los desacoplantes son reconocidos como agentes lipofílicos de diversa naturaleza química que afectan el gradiente de protones (o/y otros iones) intertilacoidal, generado por la transferencia de electrones (5). Estos compuestos comprenden ácidos y bases débiles, por ejemplo fenoles (58,80), carbonilcianidafeníl hidrazonas (32), ácidos benzoicos (56), cloruro de amonio, aminas alifáticas, aromáticas, y complejas (65,90).

**Fig 3. Efecto de DFAQ sobre las Rxn fotosinteticas C.P, Sint. ATP y T.E.**

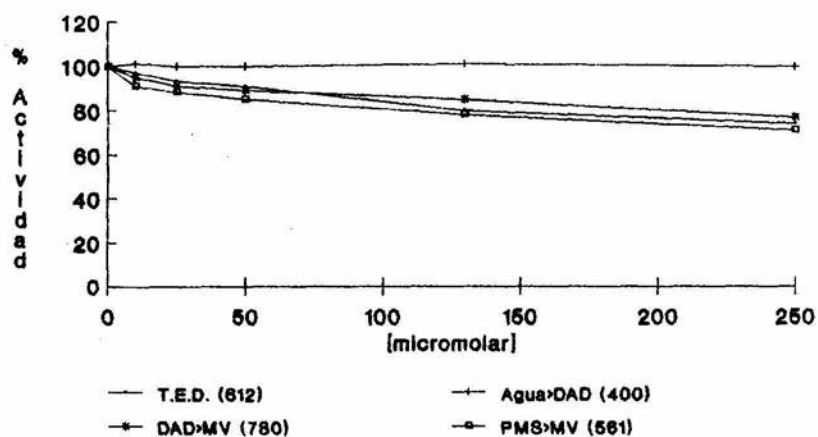


Actividad en microeq e<sup>-</sup> (T.E.),  
 micromoles H<sup>+</sup> (C.P) y micromoles  
 ATP (Sint. ATP) / (mg chl)(h).

Se sabe que muchos de los desacoplantes, inhiben la transferencia de electrones en un proceso dependiente del pH y de concentración. Así por ejemplo el cloruro de amonio, CCCP (carbonilcianida m-clorofenilhidrazona), dinitrofenoles, etc; desacoplan efectivamente la T.E. a pH de 7.5 o a pHs más ácidos, pero lo inhiben severamente a pH 7.5 o a pHs más alcalinos, dependiendo del desacoplante (17,58,80); además de que inhiben la T.E. a pH igual o mayor de 7.5, a altas concentraciones (7,28,80), tal como sucede con la T.E.B y la T.E.A. afectado por DFAQ a pH 8. El estudio de algunos de estos desacoplantes ha mostrado que su efecto primario sobre la cadena redox del tilacoide se da en el FS II a nivel del complejo enzimático liberador de oxígeno, conocido en la literatura como efecto "ADRY" (17,64). Se ha planteado el concepto de que la tasa de T.E. oxigénico (originado desde el agua y cuyo pH externo al tilacoide óptimo es cercano a 8, y de 5 para el pH del lumen tilacoidal) gobierna la T.E.; por lo tanto, un  $\Delta$ pH de aproximado de tres unidades a través de la membrana tilacoidal, establecido durante la T.E., genera un pH ácido óptimo dentro de las membranas tilacoidales (5). El efecto "ADRY" es consistente con el anterior concepto: Al equilibrar el pH externo y el pH interno, los desacoplantes previenen la acidez interna, así, a un pH externo alcalino los desacoplantes alcalinizan el pH interno dañando el complejo liberador de oxígeno, mientras que en un pH externo ácido, los desacoplantes acidifican el pH interno en un rango favorable para la T.E. oxigénica (5,17,64).

Debido a que la DFAQ inhibe la T.E.D., fue necesario obtener información sobre la localización del sitio de inhibición de DFAQ en la cadena redox para poder discernir si su efecto era de tipo

Fig 4. Efecto de DFAQ sobre la T.E.D. y las Rxn: DAD>MV, Agua>DAD y PMS>MV.



En parentesis, la actividad del control de cada Rxn, en microeq e<sup>-</sup>/(mg chl) (h).

"ADRY" o no, se evaluaron las reacciones parciales mostradas en la figura 4. En dicha figura se observa que el sitio de inhibición de DFAQ se localiza entre el sitio de donación de electrones del PMS<sub>r</sub> al FS I (en cloroplastos con la PC desactivada con cianuro) y el sitio donde acepta electrones el MV, ya que la T.E. en éste tramo de cadena redox es inhibida por DFAQ; por éste dato se deduce que DFAQ no es un inhibidor tipo "ADRY" ya que éstos inhiben la fotólisis del agua. La anterior conclusión esta soportada por las siguientes evidencias:

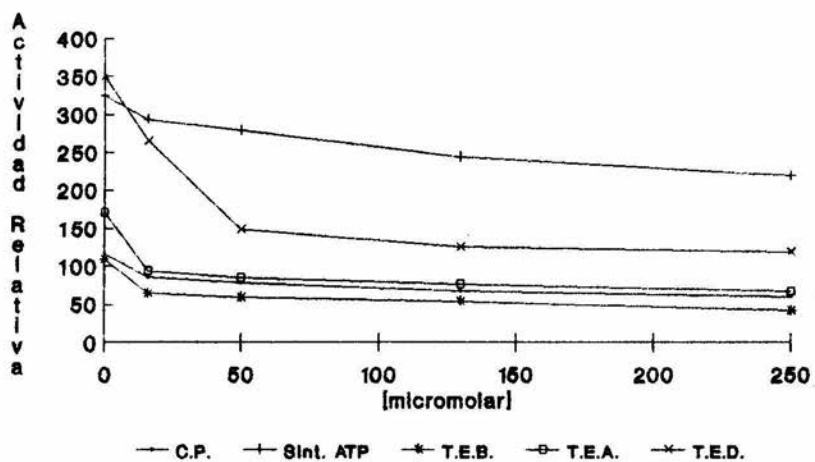
a) La T.E. Agua>DAD no es inhibida por DFAQ, por lo que la T.E. dependiente del FS II no es afectada.

b) La T.E. dependiente del FS I es inhibida: DAD>MV y PMS>MV son inhibidas en forma y porcentaje similar a la inhibición presentada por la T.E.D., y por exclusión de los componentes de éstas reacciones asumimos que el sitio de inhibición en la cadena redox tilacoidal para DFAQ, se localiza en el segmento que involucra la T.E. de PMS>MV.

**6.2. CARACTERIZACION DEL EFECTO DE DoHFAQ, DBAQ, DMBAQ, (-) y (+)DFHMEAQ:** Estas quinonas manifestaron un mismo patrón en su efecto sobre la fotosíntesis in vitro, inhibiendo la síntesis de ATP, la C.P., y las T.E.B., T.E.A., y T.E.D. (figuras 5, 6, 7, 8, y 9). La inhibición de la T.E.D., cuya T.E. no es controlada por la tasa de síntesis de ATP, o por el  $\Delta pH$  ocurrente en condiciones acopladas y basales respectivamente, es característico de un inhibidor de la T.E. fotosintética; así la inhibición de la C.P. y de la síntesis de ATP es reflejo de la inhibición de la T.E.B. y T.E.D respectivamente. Por lo tanto DoHFAQ, DBAQ, DMBAQ, (-) y

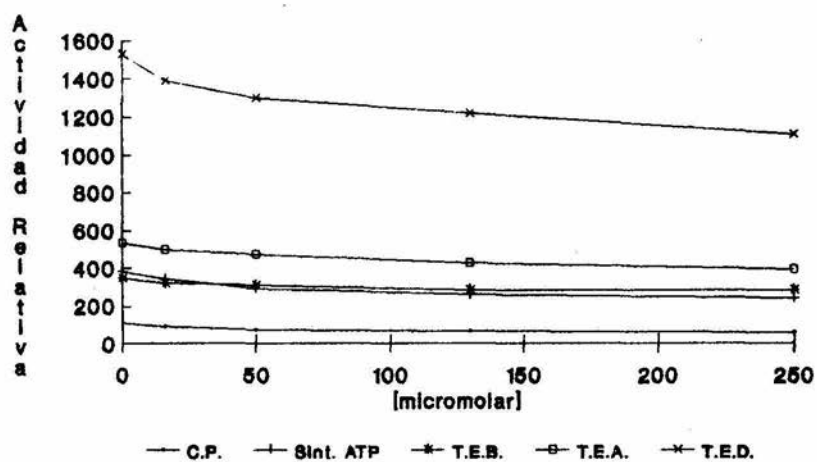


**Fig 5. Efecto de DoHFAQ sobre las Rxn fotosinteticas C.P, Sint. ATP y T.E.**



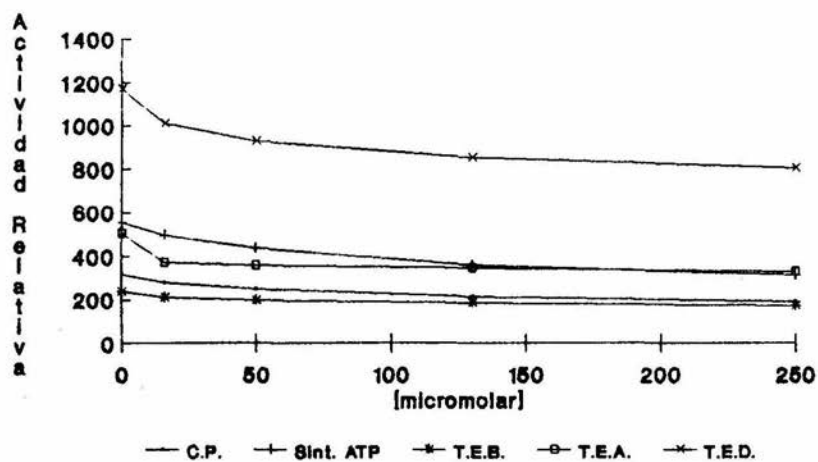
**Actividad en microeq e- (T.E.),  
micromoles H<sup>+</sup> (C.P) y micromoles  
ATP (Sint. ATP) / (mg chl)(h).**

Fig 6. Efecto de DBAQ sobre las Rxn fotosinteticas C.P, Sint. ATP y T.E.



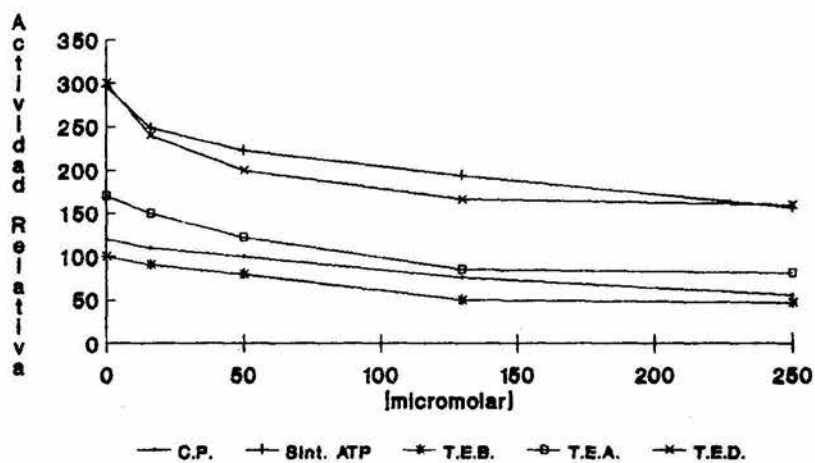
Actividad en microeq e<sup>-</sup> (T.E.),  
 micromoles H<sup>+</sup> (C.P) y micromoles  
 ATP (Sint. ATP) / (mg chl)(h).

Fig 7. Efecto de DMBAQ sobre las Rxn fotosinteticas C.P, Sint. ATP y T.E.



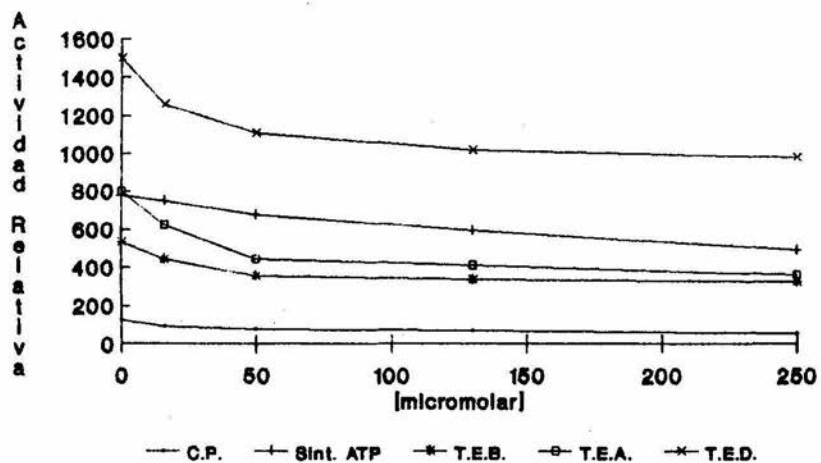
Actividad en microeq e<sup>-</sup> (T.E.),  
micromoles H<sup>+</sup> (C.P) y micromoles  
ATP (Sint. ATP) / (mg chl) (h).

**Fig 8. Efecto de (-)DFHMEAQ sobre las Rxn fotosinteticas C.P, Sint. ATP y T.E.**



Actividad en microeq e- (T.E.),  
 micromoles H+ (C.P) y micromoles  
 ATP (Sint. ATP) / (mg chl) (h).

Fig 9. Efecto de (+)DFHMEAQ sobre las Rxn fotosintéticas C.P, Sint. ATP y T.E.



Actividad en microeq e- (T.E.),  
micromoles H<sup>+</sup> (C.P) y micromoles  
ATP (Sint. ATP) / (mg chl) (h).

(+)DFHMEAQ son inhibidores de la T.E. a través de la cadena redox tilacoidal.

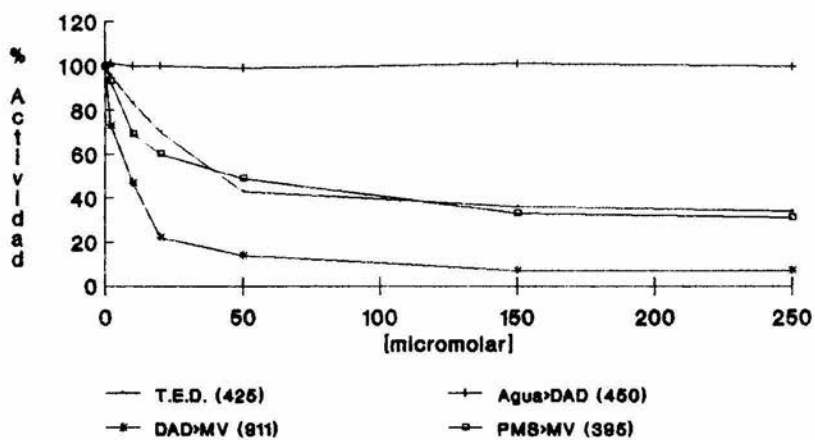
Para la localización del sitio de inhibición de éstas quinonas se evaluaron las reacciones parciales cuyos resultados se muestran en las figuras 10, 11, 12, 13, y 14. Del análisis de dichas figuras se determinó que DoHFAQ, DBAQ, y DMBAQ actúan a nivel del FS I entre el sitio de donación de electrones del PMS<sub>r</sub> al FS I (en cloroplastos con la PC desactivada con cianuro) y el sitio donde acepta electrones el MV, similarmente a DFAQ. Mientras que (-), y (+)DFHMEAQ actúan a nivel del complejo cyt b<sub>6</sub>/f entre el sitio de donación de electrones de la TMHQ<sub>2</sub> al centro Fe-S y antes del cyt f a nivel del cyt b<sub>6</sub>/f. La anterior conclusión está soportada por las siguientes evidencias:

a) La T.E. Agua>DAD no es inhibido y por tanto la T.E. dependiente del FS II no es afectado.

b) La T.E. dependiente del FS I es inhibido de manera diferencial por estas quinonas, pues DoHFAQ, DBAQ y DMBAQ afectan la T.E. DAD>MV mientras que (-) y (+)DFHMEAQ no la afectan, presentando por lo tanto diferente sitio de acción cada grupo.

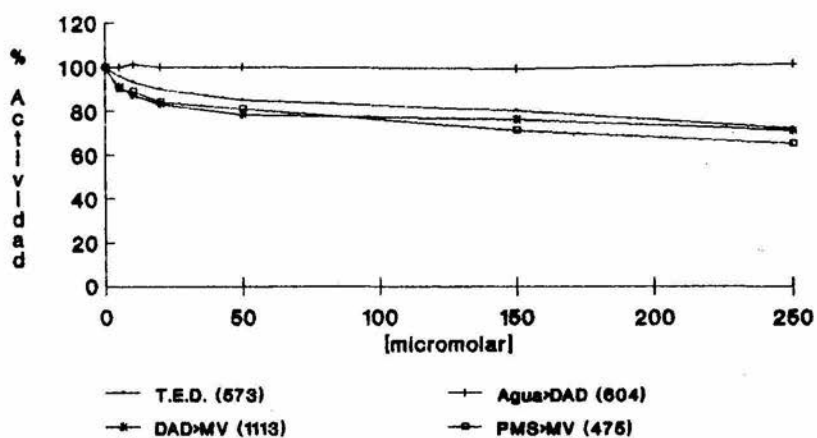
c) La T.E. dependiente del FS I afectada por DoHFAQ, DBAQ y DMBAQ: La inhibición de las T.E.D., DAD>MV y PMS>MV fue similar (excepto por DoHFAQ que afecta mucho más la DAD>MV, discutido después), así, los datos sugieren que el sitio de inhibición, para estos derivados, en la cadena redox tilacoidal se localiza entre el sitio donde el PMS dona electrones al FS I (en cloroplastos con la PC desactivada con cianuro) y el sitio donde el MV acepta electrones desde la cadena redox.

Fig 10. Efecto de DoHFAQ sobre la T.E.D. y las Rxn: DAD>MV, Agua>DAD y PMS>MV.



En parentesis, la actividad del control de cada Rxn, en microeq e<sup>-</sup>/(mg chl) (h).

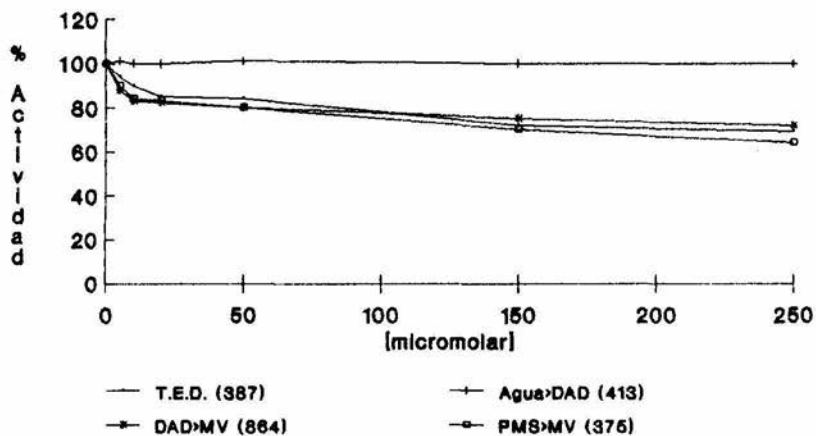
Fig 11. Efecto de DBAQ sobre la T.E.D.  
y las Rxn: DAD>MV, Agua>MV y PMS>MV.



En parentesis, la actividad del control  
de cada Rxn,  
en microeq e-/(mg chl) (h).

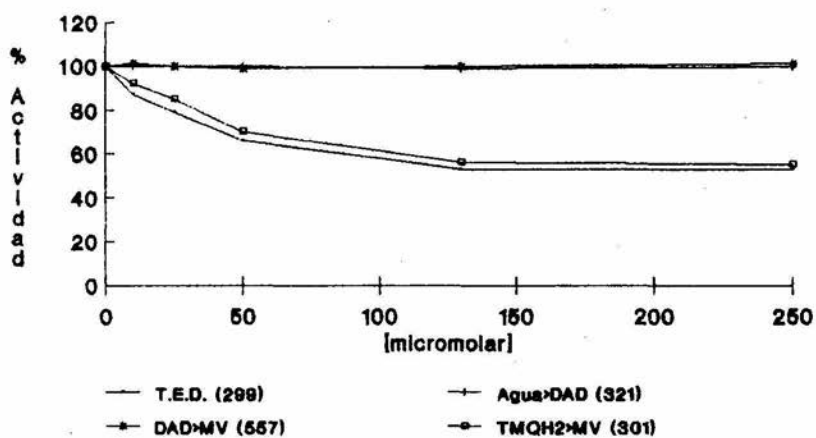


Fig 12. Efecto de DMBAQ sobre la T.E.D. y las Rxn: DAD>MV, Agua>DAD y PMS>MV.



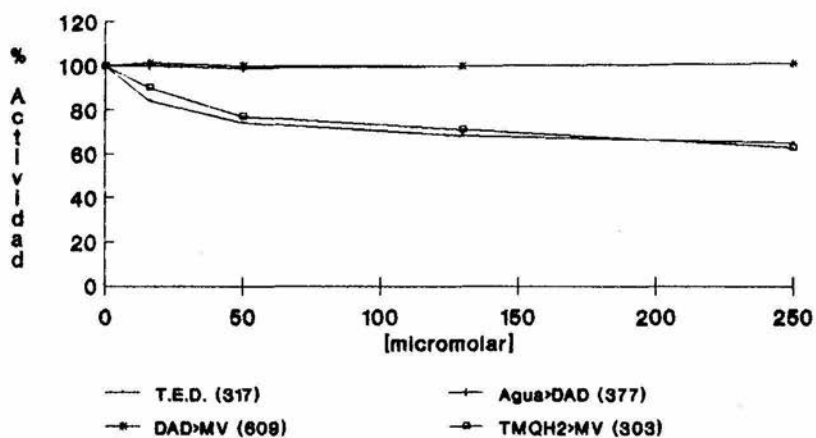
En parentesis, la actividad del control de cada Rxn, en microeq e<sup>-</sup>/(mg chl) (h).

Fig 13. Efecto de (-)DFHMEAQ sobre la T.E.D. y las Rxn indicadas.



En parentesis, la actividad del control de cada Rxn, en microeq e<sup>-</sup>/(mg chl) (h).

Fig 14. Efecto de (+)DFHMEAQ sobre la T.E.D. y las Rxn indicadas.



En parentesis, la actividad del control de cada Rxn, en microeq e-/(mg chl) (h).

d) Como (-) y (+)DFHMEAQ no afectaron las T.E. Agua>DAD y DAD>MV, aun cuando afectan la T.E.D., se procedió a evaluar la T.E. que incluyera los acarreadores electrónicos, no incluidos en las reacciones no afectadas, utilizando para dicho fin la T.E. TMOH<sub>2</sub>>MV; , que al ser inhibida en forma y proporción semejante a la T.E.D., nos indicó que en el segmento afectado por estos isómeros de la DFHMEAQ se localiza entre sitio donde la TMOH<sub>2</sub> dona electrones (centro Fe-S) y antes del cyt f en el cyt b<sub>6</sub>/f.

Los estudios realizados por otros autores, acerca de p-benzoquinonas sustituidas que interfieren con la T.E. fotosintética (13,48,62,63,75,89,91,92), han mostrado que el sitio de inhibición por p-benzoquinonas es fuertemente dependiente de el patrón de sustitución que presenten, y de esta inhibición diferencial de la T.E., se ha planteado (63) que los acarreadores participantes en las reacciones redox de la PQ son diferentes y por lo tanto el modo de unión de las p-benzoquinonas en las enzimas redox tambien lo son, ésto evidenciado por que la inhibición por p-benzoquinonas a nivel del cyt b<sub>6</sub>/f es gobernada principalmente por la lipofílicidad, mientras que la inhibición en Q<sub>B</sub> en el FS II es regido por el parámetro estérico (63).

Por lo tanto, el hecho de que las quinonas aqui evaluadas no afecten la T.E. a nivel de Q<sub>B</sub> puede deberse al alto grado de impedimento estérico de sus sustituyentes, suposición apoyada por los reportes de p-benzoquinonas alquilamino sustituidas (13) inhibidoras de la T.E. a nivel de Q<sub>B</sub> y de la T.E. DAD>MV, además de un análogo amino sustituido de DBMIB (63) el cual actúa tanto a nivel de Q<sub>B</sub> como en el centro Fe-S del cyt b<sub>6</sub>/f.

La diferencia en el sitio de inhibición entre los isómeros de DFHMEAQ y los demás derivados (DFAQ, DoHFAQ, DBAQ, y DMBAQ), suponemos que se debe a las diferencias en lipofiliidad, ya que la función alcohol (hidroxilo) alifático presente en (-) y (+)DFHMEAQ modifica la lipofiliidad presente en los otros derivados; si bien no descartamos la posibilidad de que la posición del fenilo a dos átomos de carbono del nitrógen en los sustituyentes de (-) y (+) DFHMEAQ sea importante para su unión al cyt b<sub>5</sub>/f, y que esto sea impedimento para la unión de DFAQ, DoHFAQ, DBAQ, y DMBAQ al sitio receptor de los isómeros de DFHMEAQ en el cyt b<sub>5</sub>/f.

La inhibición de la oxidación de PQH<sub>2</sub> ha sido asociada con el centro Fe-S del cyt b<sub>5</sub>/f (47,48). Por ejemplo, batofenantrolina (36) es un quelante de Fe; DBMIB y análogos (27,36), dinitrofenileter alogenados (15,36), y UHDBT (36) interaccionan con el centro Fe-S del cyt b<sub>5</sub>/f.

Generalmente se asume que DBMIB es un inhibidor competitivo de la oxidación de PQH<sub>2</sub>, pero no se han reportado datos rigurosos para soportar dicha sugestión (27), sin embargo, DBMIB modifica la señal EPR del centro Fe-S<sub>red</sub> (reducido), de lo que se ha aceptado que DBMIB se asocia antiferromagnéticamente con el centro Fe-S<sub>red</sub> (27); en tanto UHDBT y los dinitrofenileter alogenados sólo modifican ligeramente dicha señal (48), además el efecto de éstos compuestos sobre la relajación de la excitación de P<sub>700</sub> es diferente a la inducida por DBMIB (77), por lo que se plantean diferentes sitios de inhibición. El descubrimiento del desplazamiento de DBMIB por UHDBT, dinitrofenileter alogenados y FQ (48), evaluado por cambios en la señal EPR, aunado a los

reportes anteriores ha permitido describir el sitio de inhibición de la oxidación de PQH<sub>2</sub>, como un sitio en la proteína asociada con el centro Fe-S; la unión de los análogos de p-benzoquinona y presumiblemente PQH<sub>2</sub>, debe ser en este sitio, lo que provoca un efecto pronunciado en la señal EPR del centro Fe-S y sus propiedades redox (47); un segundo sitio de unión debe estar presente pero no tan cercanamente asociado con el centro Fe-S ya que sólo un pequeño cambio en la señal EPR es provocado por la unión del inhibidor, este sitio de unión es para diversos inhibidores tales como dinitrofenileter alogenados y UHDBT; por el desplazamiento de las p-benzoquinonas con los compuestos del segundo sitio, los dos sitios pueden estar sobrelapandose en la ferroproteína dentro del dominio del centro Fe-S en el cyt b<sub>6</sub>/f.

(-) y (+)DMFHQAQ inhiben a nivel de la oxidación de PQH<sub>2</sub>; por ser éstas dos quinonas análogos de PQ y de acuerdo con el modelo anterior es probable que interaccionen con el centro Fe-S en el primer sitio del modelo mencionado,, pero los resultados aquí presentados no permiten ser concluyentes.

Novedosamente encontramos que DFAQ, DBAQ, DMBAQ, y DoHFAQ inhiben a nivel del FS I, efecto que no se ha reportado con anterioridad para p-benzoquinonas. El MV acepta electrones desde los componentes F<sub>B</sub>/F<sub>A</sub> del FS I (43,79), al igual que la ferredoxina, y por lo tanto el sitio de inhibición para DFAQ, DBAQ, DMBAQ, y DoHFAQ se localiza en el segmento de la cadena redox: P<sub>700</sub>-A<sub>0</sub>-A<sub>1</sub>-F<sub>x</sub>-F<sub>B</sub>/F<sub>A</sub>. Análogamente a los isómeros de DFHMEAQ, es probable que éstas p-benzoquinonas estén inhibiendo la T.E. por interacción con algún centro Fe-S de el segmento

mencionado o en el sitio de A<sub>1</sub>, pero no podemos afirmarlo ni indicar el sitio preciso con los datos aquí presentados.

La mayor sensibilidad de la reacción DAD>MV por DoHFAQ (Figura 10) es semejante a lo reportado para DBMIB, cuyo efecto es potenciado en presencia de ascorbato (72,93), la explicación dada a éste fenómeno es que el ascorbato reduce a DBMIB, en cuya forma (quinólica) es un mejor inhibidor de la T.E., siendo probable por lo tanto, que suceda lo mismo con DoHFAQ.

### 6.3. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

6.3.1. DESACOPLAMIENTO DE LA T.E.: La presencia de nitrógeno en la estructura molecular de DFAQ, nos sugiere la participación del nitrógeno en la actividad desacoplante de ésta quinona.

Se ha concluido (90) que existen dos tipos de desacoplantes con grupo amino en su molécula:

1) Un grupo de derivados de aminas alifáticas básicas en los que la lipofílicidad es el factor químico más importante.

2) Otro grupo de compuestos con un -NH- entre dos sistemas aromáticos en los que el factor electrónico es el más importante.

Las siguientes observaciones apoyan la posibilidad de que DFAQ pertenezca al grupo de desacoplantes amino aromáticos:

a) Desacoplantes amino aromáticos, por ejemplo difenilaminas sustituidas (61,64), anilino tiofenos (73) y N-aril-N',N'-dialquil-1,2-etanodiaminas (90), dependiendo de su sustitución aromática pueden actuar como compuestos ADRY, o como

inhibidores de la T.E. en otro (s) sitio (s) de la cadena redox tilacoidal; tal como sucede con DFAQ (Figura 4).

b) En el caso de difenilaminas sustituidas (61,64), anilino tiofenos (73) y N-aril-N',N'-dialquil-1,2-etanodiaminas (90), la sustitución en orto y en para, en el anillo del fenilo, afectan al anillo aromático, donando o atrayendo densidad electrónica; los grupos electrón-atradores potencializan tanto el efecto desacoplante como la inhibición de la T.E., ya que al atraer la densidad electrónica del fenilo, el fenilo atrae densidad electrónica desde el nitrógeno (del amino), lo cual provoca acidez en el hidrógeno unido al nitrógeno, que determina la capacidad desacoplante, y para la inhibición de la T.E. probablemente por la generación de dipolos intramoleculares. Comparando los efectos de DFAQ y DoHFAQ, sobre las T.E.B y T.E.A. (Figuras 3 y 5), se observa como la sustitución del hidrógeno en orto del fenilo por un hidroxilo (DoHFAQ), provoca pérdida de la actividad desacoplante; cabe aclarar que el hidroxilo en un sistema aromático actúa como un grupo electrón-donador (69), de esta manera aumenta la densidad electrónica del fenilo y por lo tanto del núcleo difenilamino-p-benzoquinona, disminuyendo la acidez del hidrógeno unido a los nitrógenos de los sustituyentes, concordando con el planteamiento para el efecto electrón-atractor aromático en el desacoplamiento de difenilaminas sustituidas, anilino tiofenos y N-aril-N',N'-dialquil-1,2-etanodiaminas; sin embargo, la inhibición de la T.E. no presenta el mismo patrón de afección por sustitución aromática (discutido en la sig sección).

c) Al separar el fenilo del amino con uno (DBAQ y DMBAQ) o dos átomos de carbono ((-) y (+)DFHMEAQ) en los sustituyentes de



los derivados aquí estudiados, provoca pérdida del efecto desacoplante presentado por DFAQ, sugiriendo que la función anilina (-NH-fenilo) es necesaria para su actividad desacoplante.

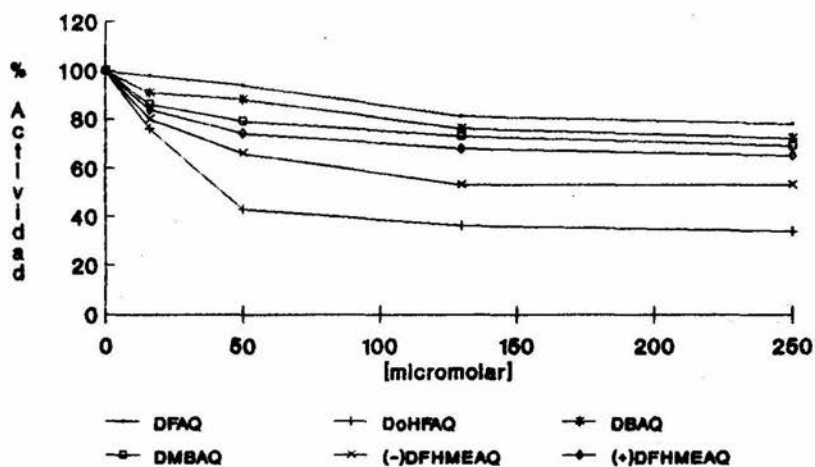
**6.3.2. INHIBICION DE LA T.E.:** La cinética de inhibición de la T.E.D., para las quinonas, en un mismo pool de cloroplastos se muestra en la figura 15. Como se observa, el comportamiento de inhibición fue similar (aunque en diferente grado) para todas éstas quinonas, presentando el siguiente orden de inhibición decreciente: DoHFAQ > (-)DFHMEAQ > (+)DFHMEAQ > DMBAQ > DBAQ > DFAQ; Lo observado en la cinética de inhibición indica que cada una de estas quinonas no presenta más de un sitio de unión, y observandose máxima inhibición a 250 µM. Con el fin de obtener un orden de inhibición máxima confiable, se evaluó la T.E.D. a 250 µM con cinco repeticiones, los resultados (tabla 3) indican el siguiente orden de inhibición decreciente : DoHFAQ > (-)DFHMEAQ > (+)DFHMEAQ = DBAQ = DMBAQ > DFAQ. Sin embargo, teniendo en cuenta la inhibición diferencial de los isómeros de DFHMEAQ del resto de las quinonas (sección 6.2), se deducen dos aspectos:

1) El orden de inhibición decreciente a nivel del cyt b<sub>6</sub>/f es: (-) > (+)DFHMEAQ; y

2) El orden de inhibición decreciente a nivel del FS I es: DoHFAQ > DBAQ = DMBAQ > DFAQ.

En el primer caso las diferencias en el % de inhibición de la T.E. por parte de los isómeros de DFHMEAQ indican estereoespecificidad en la unión de esta quinona a al sitio donde inhibe; los isómeros son moléculas que difieren en su orientación espacial absoluta de los sustituyentes en uno o más carbonos

**Fig 15. Efecto de los derivados de p-benzoquinonas sobre la T.E.D.**



Los controles presentaron valores entre 535 y 630 microeq e-/(mg chl) (h).

Compuesto.	% de inhibición.
DFAQ	17 ± 2
DoHFAQ	77 ± 2
DBAQ	36 ± 3
DMBAQ	31 ± 2
(-)DFHMEAQ	53 ± 1
(+)DFHMEAQ	30 ± 3

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la T.E.D. por derivados de p-benzoquinona (5 repeticiones,  $\bar{X} \pm$  D.E.).

asimétricos (69), por tanto la estereoespecificidad refleja los requerimientos espaciales del sitio receptor de la molécula de inhibidor (2); así la estructura absoluta de (-) DFHMEAQ (figura 16) cumple mejor los requisitos estereoespaciales del sitio de unión para DFHMEAQ en el complejo proteico del cyt b<sub>6</sub>/f. Este fenómeno de la estereoespecificidad se ha reportado para diferentes inhibidores de G<sub>0</sub> en el FS II (23,34,35,53).

Para el caso del orden de inhibición en el FS I: En primer lugar, la separación por un carbono entre el amino y el fenilo de los sustituyentes en estas quinonas provoca un ligero incremento en la actividad inhibitoria de la T.E.; así, DFAQ inhibe un 17% en tanto DBAQ y DMBAQ presentan aproximadamente el doble de dicho % de inhibición, ésto puede deberse al aumento en la capacidad de reacomodo (movilidad) del fenilo, debida a la introducción del metileno; de esta forma, los fenilos de los sustituyentes de DBAQ

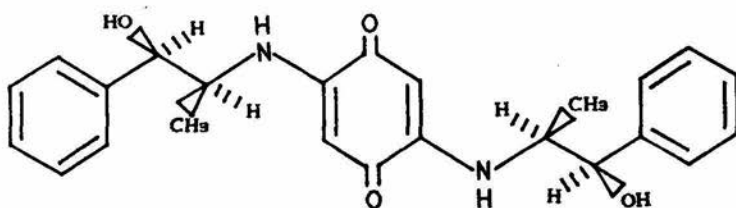


Figura 16. Estructura absoluta (espacial) de la (-)DFHMEAQ [1' (S), 2' (R)-DFHMEAQ].

y DMBAQ pueden orientarse de tal manera que se presente una mejor interacción (que la presentada por DFAQ) del núcleo diamino-p-benzoquinona, con regiones específicas del sitio de unión en el complejo proteico del FS I, de forma similar a lo encontrado para fenil-2-cianoacrilatos, inhibidores de la T.E. en el FS II (34). Por otra parte la comparación del % de inhibición entre DFAQ (17%) y DoHFAQ (77%), refleja que la sustitución de un hidrógeno por un hidroxilo (electrón-donante) en posición orto, en el fenilo de los sustituyentes de DFAQ, incrementa considerablemente la actividad inhibitoria; inicialmente pensamos que probablemente la densidad electrónica introducida por los hidroxilos en el núcleo 2,5-difenilamino-p-benzoquinona podía participar en la interacción con el sitio receptor en el FS I, incrementando así la inhibición de la T.E.; de manera similar al

efecto electrón-donante de sustituyentes aromáticos, favorable para la inhibición de la T.E. dependiente del FS II reportado para anilidas, ureas y carbamatos (52,83), cuyas estructuras generales son representadas en la figura 17.

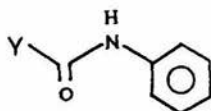


Figura 17. Estructura general de anilidas (Y= alquil), ureas (Y= alquilamino) y carbamatos (Y= alcoxi).

Sin embargo como las dos estructuras con índice mayor de inhibición de la T.E. presentan en común un hidroxilo separado por dos carbonos del nitrógeno, en los sustituyentes (DoHFAQ y (-)DFHMEAQ), aun cuando su sitio de inhibición no sea el mismo, sugirió la posibilidad de que ésta característica del sustituyente fuera importante para la inhibición.

Con la intención de discernir entre un efecto aromático electrón-donante y uno de sustitución en posición orto del hidroxilo en el fenilo de los sustituyentes de DoHFAQ, se evaluó el efecto de dos nuevas quinonas la DpHFAQ y la DoMxFAQ (ver estructura de los sustituyentes en la tabla 4); estas quinonas inhiben las T.E.B y T.E.A. (datos no mostrados), los resultados del efecto sobre la T.E.D. y las reacciones parciales (figuras 18 y 19) indican que el sitio de inhibición es el mismo presentado

por DoHFAQ. También se evaluó la T.E.D. a 250  $\mu$ M, con cinco repeticiones, de DpHFAQ y DoMxFAQ, usando a DoHFAQ como control (tabla 5). DpHFAQ inhibe el T.E.D. aproximadamente al doble que lo hace DFAQ (tabla 3), demostrando de esta manera la contribución electrón-donante de la sustitución aromática del hidroxilo, favorable para la inhibición de la T.E.; por otro lado, la diferencia en inhibición entre DoHFAQ y DpHFAQ refleja notoriamente como la sustitución en orto es más favorable para la inhibición que la correspondiente sustitución en para del fenilo; de lo anterior podría asumirse que la contribución electrón-donante de la sustitución aromática del hidroxilo es diferencial; sin embargo, el efecto exhibido por DoMxFAQ, que bajo la suposición de una simple contribución electrón-donante en orto favorable para la inhibición de la T.E., su actividad inhibitoria

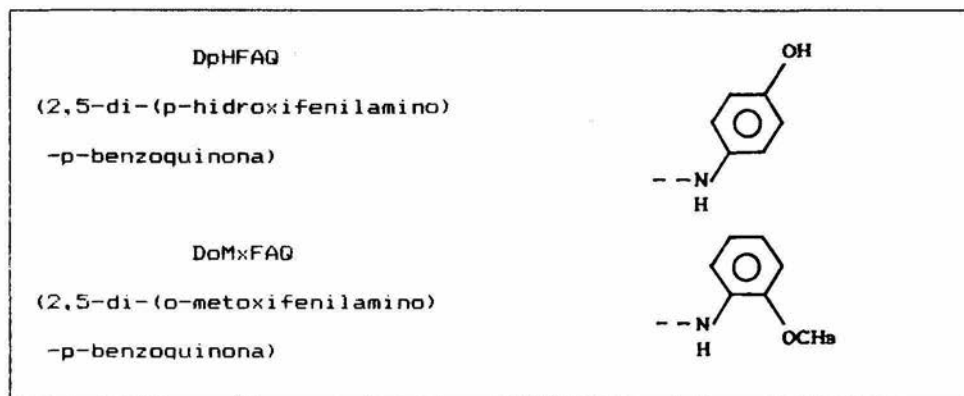
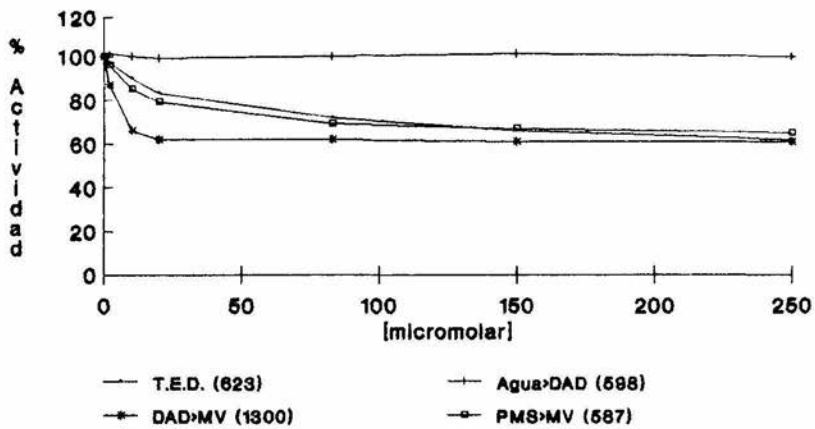


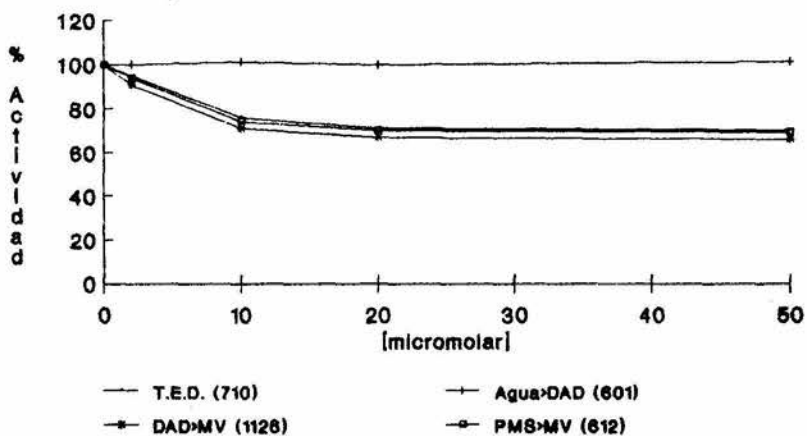
Tabla 4. Fórmula estructural de los sustituyentes, nombre y abreviación para los dos nuevos derivados de p-benzoquinonas.

Fig 18. Efecto de DpHFAQ sobre la T.E.D. y las Rxn indicadas.



En parentesis, la actividad del control de cada Rxn, en microeq e<sup>-</sup>/(mg chl) (h).

**Fig 19. Efecto de DoMxFAQ sobre la T.E.D. y las Rxn indicadas.**



**En parentesis, la actividad del control de cada Rxn, en microeq e<sup>-</sup>/(mg chl) (h).**



debería ser mayor o igual a la presentada por DoHFAQ (pues el alcoxilo (-OCH<sub>3</sub>) es un grupo ligeramente mejor electrón-donante, en sistemas aromáticos, comparado con el hidroxilo (69) ), y que al no suceder, indica la importancia del grupo hidroxilo en la posición orto en el fenilo de los sustituyentes; este requerimiento puede ser reflejo de la participación de puentes de hidrógeno en la interacción con el sitio receptor de DoHFAQ en el FS I, si bien no podemos descartar la participación de los electrones no apareados del oxígeno hidroxílico (los cuales son más reactivos que los electrones no apareados del oxígeno alcoxílico (69) ) en la formación de un complejo de transferencia de carga.

Compuesto	% de inhibición
DoHFAQ	80 ± 2
DpHFAQ	36 ± 3
DoMxFAQ	30 ± 2

Tabla 5. Porcentaje promedio de inhibición de la T.E.D. por derivados de p-benzoquinona. (cinco repeticiones,  $\bar{x} \pm$  D.E.)

## 7.0. CONCLUSIONES:

a) La forma de acción de los derivados de p-benzoquinonas estudiadas en éste trabajo fue fuertemente dependiente de la sustitución; Los resultados encontrados indican que DFAQ actúa como un inhibidor-desacoplante débil; y que DoHFAQ, DpHFAQ, DoMxFAQ, DBAQ, DMBAQ, (-) y (+)DFHMEAQ actúan como inhibidores de la T.E..

b) La presencia del grupo -NH-fenil en la sustitución 2,5 del núcleo benzoquinona es esencial en la actividad desacoplante de DFAQ, y la sustitución de un grupo electrón-donador en posición orto y para del fenilo de los sustituyentes (DoHFAQ, DpHFAQ y DoMxFAQ) provoca pérdida de la actividad desacoplante; estos datos están de acuerdo al modelo de los desacoplantes amino aromáticos.

c) DFAQ, DoHFAQ, DpHFAQ, DoMxFAQ, DBAQ y DMBAQ, inhiben la T.E. en el FS I, probablemente en alguno de sus centros Fe-S o en Ar; en tanto que (-) y (+)DFHMEAQ inhibe la T.E. en el cyt b<sub>6</sub>/f, muy probablemente su centro Fe-S; la diferencia en el sitio de inhibición entre los primeros y la DFHMEAQ, puede ser reflejo de las diferencias en lipofilia (introducida por el alcohol alifático presente en los sustituyentes de DFHMEAQ).

d) La inhibición por DFHMEAQ fue estereoespecífica, siendo su isómero (-) el más eficiente en la interacción (e inhibición de la T.E.) con el sitio receptor en el complejo proteico del cyt b<sub>6</sub>/f.

e) La inhibición de la T.E. a nivel del FS I presenta dos aspectos:

1) cuando los sustituyentes 2,5 son -NH-fenil. la mayor inhibición requiere la presencia del grupo funcional hidroxilo (DoHFAQ) en posición orto; Además hay una pequeña contribución de sustitución electrón-donante aromática en orto y para del fenilo de los sustituyentes (DoHFAQ y DoMxFAQ) favorable para la inhibición de la T.E.

2) La separación del -NH- y el -fenilo (presente en DFAQ) con un átomo de carbono, provoca un pequeño incremento en la actividad (DBAQ y DMBAQ) inhibitoria de la T.E.; la cual suponemos se debe a una mejor interacción del núcleo 2,5-diamino-p-benzoquinona con el sitio receptor en el complejo proteico del FS I.

f) Los datos de este trabajo indican que la estructura importante para la inhibición de la T.E. es la mostrada en la figura 20, donde la característica esencial es un hidroxilo separado por dos átomos de carbono del nitrógeno, de los sustituyentes. Así, cuando el hidroxilo es aromático, la unión del derivado de p-benzoquinona se da en un blanco receptor en el FS I; y cuando el hidroxilo es alifático, el derivado de p-benzoquinona actúa en el cyt b<sub>6</sub>/f. Esta estructura (fig. 20) puede ser el modelo para la síntesis de nuevos derivados para la búsqueda de estructuras análogas (a los derivados de p-benzoquinonas aquí estudiados) con mayor potencia inhibitoria de la T.E. fotosintética.

g) Por último es importante remarcar la importancia de la inhibición de la T.E. en el FS I por p-benzoquinonas, ya que, no se han reportado en la literatura internacional; y además, se sabe que el uso indiscriminado por muchos años, del mismo tipo de herbicida, ha favorecido la aparición de biotipos de malezas

resistentes a los compuestos aplicados (57); entre éstos compuestos están los que inhiben la T.E. a nivel de  $Q_b$  (87). De acuerdo con lo encontrado en este trabajo, se plantea aquí, la posibilidad de explotar éste nuevo sitio de inhibición en la cadena redox del tilacoide, con derivados de p-benzoquinona, para combatir malezas resistentes a herbicidas inhibidores de la T.E fotosintética a nivel de  $Q_b$  en el FS II.

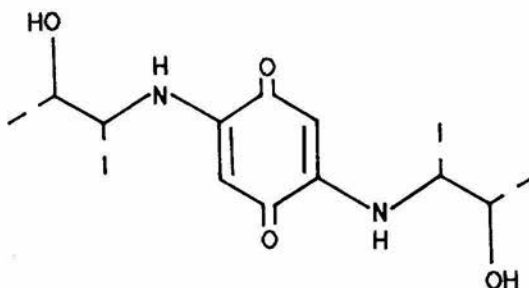


Figura 20. Estructura importante, propuesta para una mayor inhibición de la T.E., de los derivados de p-benzoquinonas aquí reportadas.

## B.O. BIBLIOGRAFIA:

1. Agudis, M.O. 1980. Congreso nacional de la ciencia de la maleza. 8-12 Nov. Torreon. Coahuila.
2. Alworth, W.L. 1972. Estereoquímica y su aplicación en bioquímica. Alhambra. España.
3. Anderson, J.M. 1986. Ann. Rev. Plant Physiol. 37:93-136.
4. Arnon, D.I. 1949. Plant Physiol. 24:1-15.
5. Arnon, D.I., y Tanq, M-S. 1985. Biochim. Biophys. Acta. 809:167-172.
6. Armstrong, F.B. 1989. Biochemistry. 3<sup>er</sup> ed. Oxford Univ. Press. Oxford.
7. Avron, M., y Sahavit, N. 1965. Biochim. Biophys. Acta. 109:317-331.
8. Asami, T., Takahashi, N., y Yoshida, S. 1986. Z. Naturforsch. 41c:751-757.
9. Asami, T., Takahashi, N., y Yoshida, S. 1987. Agric. Biol. Chem. 51:205-210.
10. Asami, T., Takahashi, N., y Yoshida, S. 1987. Agric. Biol. Chem. 51:2775-2780.
11. Asami, T., Yoshida, S., y Takahashi, N. 1986. Agric. Biol. Chem. 50:469-474.
12. Barber, J. 1987. En: The Biochemistry of plants. Vol 10:76-13. (Hatch, M.A., y Boardman, N.K. eds.). Academic. Frees. Londres, Nueva York.
13. Barr, R., Crane, F.L., Beyer, G. 1977. Eur. J. Biochem. 80:51-54.

14. Brian, R.C. 1979. En: *Herbicides*. Vol 1:1-54. (Audus, L.J. ed.) Acad. Press. Nueva York.
15. Bugg, M.W., Whitmarsh, J., Rieck, C.E., y Cohen, W.S. 1980. *Plant Physiol.* 65:47-50.
16. Camilleri, P., Kerr, M.W., Newton, T.W., y Bowley, J.R. 1989. *J. Agric. Food Chem.* 37:1509-1513.
17. Cohn, D.E., Cohen, W.S., y Bertsch, W. 1975. *Biochim. Biophys. Acta.* 376:97-104.
18. Cramer, W.A., Furbacher, P.M., Szczepaniak, A., y Tae, G-S. 1991. En: *Current Topic in Bioenergetics*. Vol 16:179-221. (C Lee ed.) Acad. Press. E.U.
19. Danks, S.M., Evans, E.H., y Whittaker, P.A. 1983. *Photosynthetic systems*. J. Wiley & Sons. Nueva York.
20. Dilley, R.A. 1972. En: *Methods in Enzimology*. XXIV (B):68-64. (San Pietro, A. ed.) Acad. Press. Nueva York.
21. Draber, W., Büchel, K.H., Timmler, H., y Trebs, A. 1974. En: *ACC. Symposium Series*. Vol 12:100-116. Washinton DC.
22. Draber, W., y Fedtke, C. 1979. En: *Advances in pesticide science*. Segunda Parte. (H. Geissbuhler, et al eds.). Pergamon Press. Nueva York.
23. Gardner, G., y Sanborn, J.R. 1987. *Z. Naturforsch.* 42c:663-669.
24. González, J.V. 1981. Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM.
25. Good, N.E. 1977. En: *Enciclopedia of Plant Physiology*. New Series. Vol 5:429-436. (Trebst, A y Avron, M. eds.) Springer-Verlag. Berlin, Nueva York.
26. Goul, J.M. 1976. *Eur. J. Biochem.* 62:567-575.

27. Graan, I., y Ort, D.R. 1985. Arch. Biochem. Biophys. 248:445-451.
28. Gregory, R.P.F. 1974. Biochim. Biophys. Acta. 368:228-234.
29. Haehnel, W. 1984. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:659-693.
30. Hall, D.O. 1976. En: Topics in Photosynthesis. Vol 1. (Barber, J. ed.) Elsevier/north-Holland. Londres.
31. Hauska, G. 1977. En: Encyclopaedia of Plant Physiol. New Series. Vol 5:253-265. (Trebst, A., y Avron, M. eds.) Springer-Verlag. Berlin, Nueva York.
32. Heytler, P.G. 1963. Biochemistry. 2:357-360.
33. Hipkins, M.F., y Baker, N.R. 1986. Photosynthesis transduction a practical approach. IRL Press. Oxford, Washington DC.
34. Huppatz, J.L., y Phillips, J.N., 1987. Z Naturforsch. 42c:674-678.
35. Huppatz, J.L., y Phillips, J.N. 1987. Z. Naturforsch. 42c:684-689.
36. Hurt, E., y Hauska, G. 1981. Eur. J. Biochem. 117:591-599.
37. Izawa, S. 1977. En: Enciclopedia of Plant Physiol. New Series. Vol 5:266-282. (Trebst, A., y Avron, M. eds.) Springer-Verlag. Berlin, Nueva York.
38. Izawa, S., y Good, N.E. 1972. En: Methods in Enzymology. Vol XXIV (B):355-377. (San Pietro, A ed) Acad. Press. Nueva York.
39. Izawa, S., Goul, J.M., Ort, D.R., Felker, P., y Good, N.E. 1973. Biochim. Biophys. Acta. 305:119-128.
40. Izawa, S., y Pan, R.L. 1978. Biochem. Biophys. Res. Comm. 83:1171-1177.

41. Kagawa, Y. 1984. En: *Bioenergetics*. (Ernster ed.) Elsevier Science Publisher. B.V. Londres.
42. Kakkis, E., Palmire, U.C. Jr., Strong, C.D., Bertsch, W., Hansch, C., y Schirner, U. 1984. *J. Agric. Food Chem.* 32:133-144.
43. Ke, B. 1972. *Biochim. Biophys. Acta.* 267:595-599.
44. Kouchkovsky, Y., y Kouchkovsky, F., 1974. *Biochim. Biophys. Acta.* 368:113-124.
45. Linscott, D.L. 1981. En: *Handbook of Pest Management in Agriculture*. Vol 3:75-112. (Pimentel, D. ed.) CRC Press. Florida USA.
46. Lotina-Hennsen, B., Albores-Velazco, M., y Garcia-Chávez, L. 1989. *Rev. Soc. Química de México.* 33:109-117.
47. Malkin, R. 1981. *FEBS LETTERS.* 131:169-172.
48. Malkin, R. 1982. *Biochemistry.* 21:2945-2950.
49. McCarty, R.E. 1977. En: *Encyclopedia of Plant Physiol.* New Series. Vol 5:436-447. (Trebst, A. y Avron, M. eds.) Springer-Verlag. Berlin, Nueva York.
50. Metz, J.G., Nixon, P.S., Rögner, M., Brudvig, G.W., y Diner, B.A. 1989. *Biochem.* 28:6960-6969.
51. Mill, J.D., Michell, P., y Schurmann, P. 1980. *FEBS LETTERS.* 112:173-177.
52. Mitsutake, K-i., Iwamura, H., Shimizu, R., y Fujita, T. 1986. *J. Agric. Food Chem.* 34:725-732.
53. Moreland, D.E., y Boots, M.R. 1971. *Plant Physiol.* 47:53-58.
54. Moreland, D.E., y Hilton, J.L. 1979. En: *Herbicides*. Vol 1:493-523. (Audus, L.J. ed.) Acad. Press. Londres.
55. Moreland, D.E. 1980. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:597-638.



56. Mutazarov, E.N., y Zolotareva, E.K. 1989. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 184:363-369.
57. Muzic, T.J. 1970. *Weed biology and control.* MacGraw-Hill. Nueva York, San Francisco.
58. Newman, J., y Jagendorf, A.T. 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16:562-567.
59. Nishimura, M., Ito, T., y Change, B. 1962. *Biochim. Biophys. Acta.* 59:177-182.
60. Nohl, H., Jordan, W., y Youngman, R.J. 1986. *Adv. in Free Biology and Medicine.* 2:211-279.
61. Dettmeier, W. 1979. *Z. Naturforsch.* 34c:1024-1027.
62. Dettmeier, W., Masson, K., y Santel, H.-J. 1987. *Z. Naturforsch.* 42c:693-697.
63. Dettmeier, W., Masson, K., y Dostatni, R. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 890:260-269.
64. Dettmeier, W., y Renger, G. 1980. *Biochim. Biophys. Acta.* 593:113-124.
65. Ort, D.R. 1978. *Eur. J. Biochem.* 85:479-485.
66. Ort, D.R. 1986. En: *Encyclopedia of plant physiology. New Series. Vol 5:7-58.* (Trebs, a. y Avron, M. eds.) Springer-Verlag. Berlin, Nueva York.
67. Ort, D.R., Izawa, S., Good, N.E., y Kromann. 1973. *FEBS LETTERS.* 31:119-122.
68. Ouitrakul, R., e Izawa, S. 1973. *Biochim. Biophys. Acta.* 305:105-118.
69. Pine, S.H., Hendricson, J.B., Craw, D.J., y Hammon, G.S. 1980. *Química Orgánica.* MacGraw-Hill. México.

70. Rebeiz, C.A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H.J., y Wu, S.M. 1984. *Enzyme Microb. Technol.* 6:390-401.
71. Redfearn, E.R., y Friend, J. 1962. *Biochem. J.* 84:34.
72. Reimer, S., Link, K., y Trebst, A. 1979. *Z. Naturforsch.* 34c:419-426.
73. Renger, G. 1971. *Biochim. Biophys. Acta.* 256:428-439.
74. Renger, G. 1986. *Physiol Vég.* 24:509-521.
75. Renger, G., Kayer, A., Dettmeier, W. 1987. *Z. Naturforsch.* 42c:698-703.
76. Ronal, L., y Ritter, Ph.D. 1989. *Understanding herbicide resistance in weeds.* Sandoz Crop Protection Corporation. USA.
77. Rurainski, H.J., Markgraf, T., y Borchert, S. 1985. *Biochim. Biophys. Acta.* 809:452-455.
78. Saba, S., Ouitrakul, R., Izawa, S., y Good, N.E. 1971. *J. Biol. Chem.* 246:3204-3209.
79. Sauer, K., Mathhis, P., Acker, S., y Van Best, S.A. 1979. *Biochim. Biophys. Acta.* 545:466-472.
80. Siow, K.S. y Unrau, A.M. 1968. *Biochemistry.* 7:3507-3512.
81. Stryer, L. 1988. *Biochemistry.* 3<sup>er</sup> Ed. W.H. Freeman and company. Nueva York.
82. Takahashi, Y., y Katoh, S. 1984. *Plant and Cell Physiol.* 25:785-794.
83. Takemoto, I., Yoshida, R., Sumida, S., y Kamoshita, K.J. 1984. *Pestic. Sci.* 9:517-525.
84. Trebst, A. 1972. En: *Methods in Enzimology.* Vol XXIV (B):146-165. (San Pietro, A. ed) Acad. Press. Nueva York.
85. Trebst, A. 1974. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:423-458.
86. Trebst, A. 1979. *Z. Naturforsch.* 34c:986-991.

87. Rev. Trebst,A., v Draber,W. 1986.En: Photosynthesis Research. Vol 10:381-392. (Nijhoff,M. ed.). Holanda.
88. Trebst,A., v Reimer,S.1973. Biochim. Biophys. Acta. 305:129-139.
89. Trebst,A., v Reimer,S.1976. Plant Science Letters. 6:21-24.
90. Van der Berg,G., v Brandse,M.1984. Z. Naturforsch. 39c:107-114.
91. Vermaas,W.F.J., v Arntzen,C.J.1983. Biochim. Biophys. Acta. 725:483-491.
92. Vermaas,W.F.J., Artzen,C.J., Gu,L.Q., y Yu,C.A.1983. Biochim. Biophys. Acta. 723:266-275.
93. White,C.G., Chain,R.K., y Malkin,R.1978. Biochim. Biophys. Acta. 502:127-137.
94. Wolf,F.T. 1966. Phytochem. 5:263-265.
95. Yoneyama,K., Asami,T., Crow,W.D., Takahahi,N., y Yoshida,S.1989. Agric. Biol. Chem. 53:471-475.
96. Yopp,J.H. 1985. En: Hanbook of Natural Pesticides. Vol 1:329-371. (Mandava,N.B. ed.) CRC Press. Florida USA.