



65
ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CACALOL Y SUS DERIVADOS. ELECTROQUIMICA Y
BIOQUIMICA DE UN NUEVO HERBICIDA

EXAMENES PROFESIONALES DE
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

NORMA ANGELICA MACIAS RUVALCABA



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. MIGUEL SALOMA TERRAZAS
VOCAL: DR. BLAS LOTINA-HENNSEN
SECRETARIO: DRA. MARTHA AGUILAR MARTÍNEZ
1er SUPLENTE: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
2do. SUPLENTE: M en C MARTHA YOLANDA GONZÁLEZ QUEZADA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

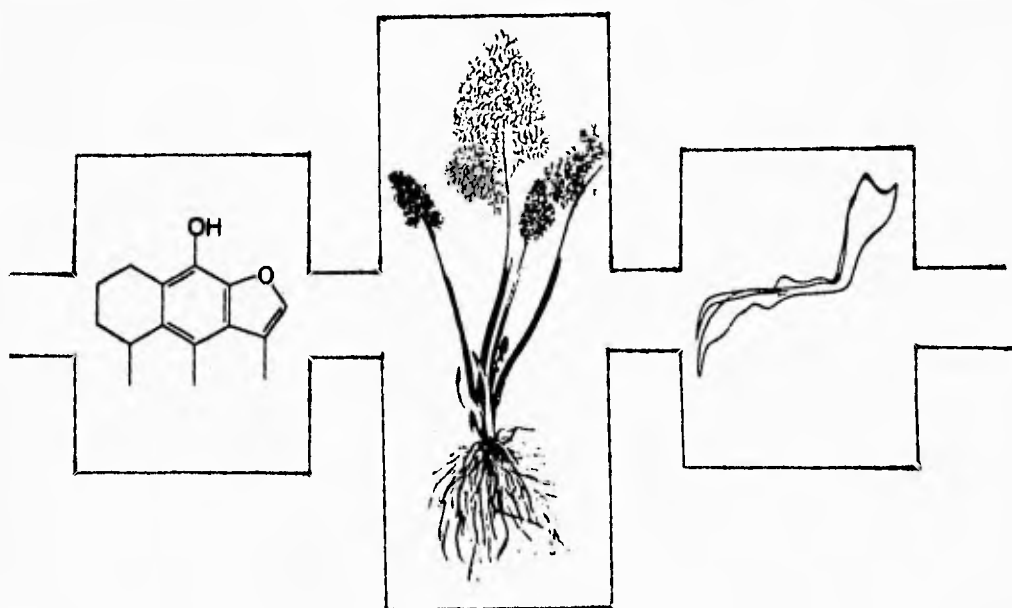
LABORATORIO 110, DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA, EDIFICIO B,
FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.
LABORATORIO 115, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, EDIFICIO E,
FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.
LABORATORIO 2-8, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.


ASESOR: DRA. MARTHA AGUILAR MARTÍNEZ


ASESOR TÉCNICO: DR. BLAS LOTINA-HENNSEN


SUSTENTANTE: NORMA ANGÉLICA MACÍAS RUVALCABA

**CACALOL Y SUS DERIVADOS. ELECTROQUIMICA
Y BIOQUIMICA DE UN NUEVO HERBICIDA**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

NORMA ANGELICA MACIAS RUVALCABA

AGRADECIMIENTOS

*Hago constar la valiosa asesoría y aportaciones del **Dr. Manuel Jiménez Estrada** en la realización de este trabajo.*

Mi más sincero agradecimiento al **Dr Blas Lotina-Hennsen** por su invaluable apoyo, por las aportaciones recibidas que son tan valiosas y que de no haber contado con ellas el trabajo no habría alcanzado su culminación. Por su ayuda, consejos, amistad y múltiples facilidades, que desinteresadamente me ha brindado y por su gran entusiasmo para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Miguel Saloma Terrazas** por sus observaciones, recomendaciones y comentarios durante la revisión de esta Tesis, con profunda admiración y respeto por su gran profesionalismo.

A todos **los profesores** de la Facultad de Química que estuvieron involucrados en mis años de estudio, por su tiempo, dedicación, ejemplo, motivación, entusiasmo y ánimo que me dieron para poder seguir la culminación de mi carrera

Al subprograma **127 "Formación Básica para la investigación"** por el apoyo económico proporcionado para la realización de esta tesis.

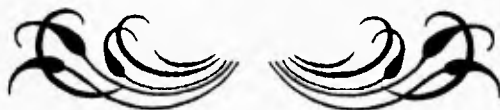
Con afecto y cariño a **Martha Otero** por su valiosa ayuda en la elaboración de este trabajo pero principalmente por tu sincera amistad



DEDICATORIAS

Dios.

*Gracias señor, por darme el soplo divino de la vida,
por los dones del entendimiento,
la paciencia y perseverancia
y por todas las satisfacciones que me has brindado.
Por se inspiración constante para superar
y vencer los obstáculos que se presentan día a día.
Por darme las fuerzas para seguir adelante,
por la fe que tengo en ti
que me hace sentir tu presencia
en cada una de las cosas que realizo,
por enseñarme a caer y poder levantarme,
por permitirme llegar hasta aquí,
por permitirme disfrutar de la vida y
de tu amor infinito,
y sobre todo por conservarme a mis padres
quienes son para mi ejemplo
de amor, dedicación y fortaleza.*



Con cariño y admiración para mis padres,
Martha y Alberto.

De que pasaré por esta vida solo una vez,
así que no me guardaré de expresarles mi más
profundo agradecimiento por hacer de mí
una persona de bien y por darme la seguridad
de contar incondicionalmente con su cariño,
porque siempre están conmigo cuando los necesito,
por poder contar en todo momento con sus consejos,
experiencias y dulces sonrisas
por compartir conmigo cada uno de mis triunfos,
alegrías, fracasos y tristezas,
porque con su amor y alegría me dieron la firmeza
durante la realización de un sueño que ahora se
vuelve una hermosa realidad y sin los cuales no
hubiera podido alcanzar mis metas,
por enseñarme a afrontar los problemas con entereza
a seguir adelante siempre con optimismo y tratando
de superarnos día con día,
por animarme siempre a perseguir mis sueños,
por su paciencia y comprensión inagotables,
por haber sabido guiarme por el mejor
de los caminos en esta vida
y por que estoy muy orgullosa de Ustedes.
Deseo sinceramente que Dios los llene toda su
vida de salud y bendiciones.

Mil gracias



De manera muy especial quiero dedicar esta tesis a la. **Dra Martha Aguilar** quien mas que un maestra y asesora es para mí una gran amiga.

Quiero expresarle mi mas profundo agradecimiento por su invaluable apoyo no solo durante la realización de este trabajo si no por poder contar con su apoyo incondicional en todo momento.

Agradezco infinitamente todas sus enseñanzas y consejos que han contribuido grandemente a mi formación profesional y personal.

Pero principalmente no encuentro palabras para expresarle mi agradecimiento por todo su cariño, amistad y comprensión inagotables, por las sinceras muestras de cariño que siempre me ha demostrado, por compartir conmigo cada uno de mis triunfos, fracasos, alegrías y tristezas y por impulsarme en cada una de las cosas que realizo, por escucharme, por tener siempre palabras que me reconfortan y me orientan., por enseñarme a ver la vida siempre con optimismo y a ver todo positivamente, por que gracias a su constante estímulo, confianza y fe que ha depositado en mí me da ánimos para seguir adelante y experimentar nuevos retos sin miedo al fracaso, por que me ha enseñado que no importa que mal salgan las cosas siempre aprenderemos algo nuevo y tendremos las bases para volver a intentarlo y finalmente lograr el éxito y porque tuve la gran suerte de ganar su amistad y aprender de Ud. Deseo sinceramente que Dios la llene de salud y bendiciones a usted y a su familia.
mil gracias



Con mucho cariño para todos mis hermanos: **Martha Lydia, Adriana Leticia y Jesus Alberto**: con todo el cariño que ellos merecen ya que me brindaron todo su apoyo y contribuyeron con su granito de arena para realizar una de las metas más importantes de mi vida, les deseo de todo corazón que puedan realizar sus sueños y que su camino este lleno de triunfos.

A **Papito Jesús** a quien llevo en mi corazón por ser inagotable fuente de cariño y apoyo. Por la preocupación que siempre me expresaste por que yo tuviera escuela. Mis deseos eran que compartieras conmigo estos momentos. Aun cuando has partido, se que desde el cielo me acompañas y compartimos la culminación de un deseo ahora realizado.

A **Mami Martita**, quien siempre me ha brindado su confianza, cariño, amor y ternura. Estoy muy orgullosa de ti, te aprecio y te quiero mucho.

A **Abue Col**, por la comprensión y el cariño que me ha brindado a lo largo de estos años.

A **toda mi Familia** por su ayuda y cariño que me han brindado y por que siempre han confiado en mi.



A **Donaji Gallardo**, por la sincera amistad que nos ha mantenido unidas durante tantos años, por todos los hermosos momentos que hemos compartido, gracias por tu compañía y amistad.

A mis "hermanitos" **Ricardo y Gerardo** por su amistad y cariño. Deseo que logren todas sus metas y que triunfen en todo lo que se propongan.

A cada uno de mis amigos por brindarme su confianza, cariño, por todos los momentos que hemos compartido y por su invaluable amistad, algo de lo más valioso que tengo. Gracias por su compañía y sincera amistad. **Adriana P., América D., Ignacio., Izela O., Lety H., Martha H., Nelly N., Raúl L.**

A todas las personas que me tendieron su mano. Aunque mi agradecimiento no este explícito en este papel lo está en mi corazón.



CONTENIDO

	página
Glosario de abreviaturas y símbolos	vii
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
3. PARTE EXPERIMENTAL	21
A. OBTENCION DEL CACALOL Y SUS DERIVADOS	23
I. Aislamiento del cacalol	23
II. Obtención de los derivados del cacalol	23
B. PARTE ELECTROQUIMICA	25
I. Preparación del medio bomba pH=7	25
II. Purificación del acetonitrilo	25
III. Preparación de la solución purificadora de nitrógeno	26
IV. Preparación del medio electrolítico polar	27
V. Preparación del electrodo saturado de calomel (ESC)	27
VI. Preparación y pulido de los electrodos	28
a) Electrodo de mercurio	28
b) Electrodo de platino	29
c) Electrodo de carbón glaseado	29
VII. Determinación de los potenciales de oxido-reducción por voltametría cíclica	30
a) Cacalol y sus derivados	30
b) Furano y fenol	32
VIII. Electrolisis del cacalol a potencial controlado en medio aprótico de LiClO ₄ 0.2 M en CH ₃ OH	32
IX. Electrolisis del cacalol a potencial controlado en medio prótico	33
C. PARTE BIOQUIMICA	34
I. Aislamiento de los tilacoides de los cloroplastos	34

II. Cuantificación de la clorofila	35
III. Medición de la velocidad de transporte de electrones	35
a) Medición del transporte de electrones no cíclico basal de H ₂ O a MV	36
b) Medición del transporte de electrones no cíclico fosforilante de H ₂ O a MV	37
c) Medición del transporte de electrones no cíclico desacoplado de H ₂ O a MV	37
d) Medición del transporte de electrones de H ₂ O a MV	38
e) Medición del transporte de electrones del fotosistema II desacoplado de H ₂ O a DCPIP	38
f) Medición del transporte de electrones en FSI de DCPIP a MV	39
IV. Medición del transporte de electrones en FSI de DCPIP a MV	40
V. Síntesis de ATP	42
4. RESULTADOS Y DISCUSION	43
A. RESULTADOS BIOQUIMICOS	43
I. Transporte de electrones	43
II. Síntesis de ATP	45
III. Reacciones parciales del transporte de electrones fotosintético	47
B. RESULTADOS ELECTROQUIMICOS	51
I. Medio prótico	51
II. Medio aprótico	60
a) Cacalol	60
b) 2-acetilcacalol	72
c) Acetato de cacalol	74
d) 2-acetilacetato de cacalol	78
e) Metilcacalol	80
C. CORRELACION DE RESULTADOS BIOQUIMICOS Y ELECTROQUIMICOS	92
5. CONCLUSIONES	96
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A₀	Clorofila aceptora de electrones
A₁	Filoquinona
AcOEt	Acetato de etilo
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ccf	Cromatografía en capa fina
CF₁	Factor de acoplamiento 1
CF₀	Factor de acoplamiento 0
Cit b_f	Complejo del citocromo b_f
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
DBMIB	dibromometilisopropil-p-benzoquinona
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DPC	1,5-difenilcarbazida
ENH	Electrodo normal de hidrógeno
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ESC	Electrodo saturado de calomel
Φ	Diámetro
F_d	Ferredoxina
FP	Ferredoxin-NADP⁺ oxido-reductasa
FSI	Fotosistema I

FSII	Fotosistema II
g	gramos
Hex	Hexano
hν	luz
hr	horas
Hz	Hertz
<i>i</i>_{pa}	Corriente de pico anódico
<i>i</i>_{pc}	Corriente de pico catódico
J	Constante de acoplamiento
KDa	Kilodaltones
M	Molar
m	multiplete
mL	mililitros
mM	Milimolar
MV	Metilviológeno
mV/s	Milivoltios por segundo
μ	Micras
μg	Microgramos
μM	Micromolar
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducida
nBu₄NBF₄	Tetrafluoroborato de tetrabutilamonio
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
P680	Centro de reacción del FSII
P680+	Centro de reacción excitado del fotosistema II
P700	Centro de reacción del FSI
P700+	Centro de reacción excitado del fotosistema I
PC	Plastocianina
Ph	Feofitina
PMS	Fenacina metosulfato
ppm	Partes por millón
QA	Plastoquinona

QB	Segunda plastoquinona
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	singlete
SiMo	Silicomolibdato de sodio
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
V	Voltios
Z	Residuo de tirosina de la proteína D1 del centro de reacción del FSII

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Debido a que en la época actual el crecimiento demográfico nacional y mundial no está en razón directa a la producción de alimentos, es necesario además de incrementar la producción agrícola, estudiar los mecanismos para lograr una mayor productividad de los cultivos y buscar métodos para eliminar las plagas que los amenazan. Una de ellas es el crecimiento de las malezas que compiten con los cultivos por el sol, el agua y los nutrientes del suelo. Para el control de las malezas, actualmente se ha extendido el uso de herbicidas orgánicos sintéticos, sin embargo, estos compuestos son tóxicos a diversas formas de vida.

Por todo esto, resulta de fundamental importancia estudiar productos naturales y/o sintéticos que presenten actividad herbicida y que a diferencia de los herbicidas utilizados en la actualidad no causen contaminación en suelos y plantas y que sean biodegradables y con baja toxicidad a las diferentes formas de vida en la escala biológica.

Previamente, se había encontrado que el cacalol actúa como herbicida inhibiendo el proceso de la fotosíntesis a nivel de la enzima que fotolisa al agua en la reacción de Hill. No obstante, sus derivados metilcacalol, acetato de cacalol y 2-acetilacetato de cacalol inhiben parcialmente el flujo de electrones en el tramo de la cadena redox comprendido entre P680 a QA. Estos resultados sugerían que el OH fenólico en el cacalol es importante para la inhibición de la enzima que cataliza el desprendimiento de O₂, ya que cuando se bloquea metoxilando o acetilando este efecto inhibitorio se pierde.

Para elucidar lo anterior en este trabajo se investigó el efecto en la fotosíntesis de un nuevo derivado fenólico del cacalol, el 2-acetilcacalol. Los resultados indicaron que este compuesto muestra el mismo sitio de acción en la reacción de Hill que el cacalol.

Debido a que hay una serie definida de similitudes, con respecto a la transferencia de electrones, entre las reacciones electroquímicas y las reacciones redox en vías metabólicas biológicas, esto nos condujo a estudiar los potenciales redox del cacalol y sus derivados por voltametría cíclica, para correlacionarlos con los potenciales redox de las enzimas de la cadena transportadora de electrones en la reacción de Hill del cloroplasto y así comprobar la localización del sitio de inhibición que estos compuestos presentan en el aparato fotosintético de cloroplastos obtenidos de *Spinacea oleracea* L. Se empleó la voltametría cíclica debido a su capacidad para distinguir entre los diversos estados de oxidación que afectan la reactividad y actividad biológica de una sustancia.

Se encontró que los potenciales de oxidación de los compuestos que presentan el grupo OH fenólico libre están cercanos al potencial de la enzima redox que fotolisa al agua, por lo que postulamos que la especie que inhibe esta enzima es el producto proveniente de la oxidación de la molécula, en tanto que los altos potenciales de oxidación mostrados por los otros derivados sugieren que estos últimos compuestos no experimentan una reacción redox en la reacción de Hill, sin embargo, debido a que se encontró que inhiben el tramo de P680 a QA se propone que su modo de acción pueda deberse a que actúan por inactivación, desplazamiento o interacción de uno o más intermediarios transportadores de electrones en la reacción de Hill. En estos compuestos los grupos metilo o acetato confieren la solubilidad necesaria para que puedan introducirse en la membrana y llegar al sitio blanco de ataque para la inhibición.

Los resultados mostraron que los compuestos que inhibieron a nivel de la fotólisis del agua fueron los más activos.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

El cacalol [9-hidroxi-3,4,5-trimetil-5,6,7,8-tetrahidronafto(2,3-b)furano] (figura 2.1). es un sesquiterpeno derivado de la furotetralina, el cual fue aislado en 1964 por Romo y col^(1,2) de las raíces de *Cacalia decomposita* A.Gray, un arbusto nativo del norte de México (figura 2.2) popularmente conocido como "matarique". Otras especies donde también se ha encontrado el cacalol es en *Cacalia adenostiloides*,⁽³⁾ *Cacalia diffinifolia*,⁽⁴⁾ *Cacalia hastata*,⁽⁵⁾ y *Cacalia ampullacea*⁽⁶⁾.

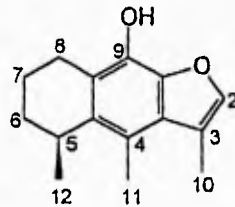


Figura 2.1 Estructura del cacalol

El té de raíces de *Cacalia decomposita* se emplea como remedio para el reumatismo^(7,8,9,10,11), resfriados⁽¹²⁾, dolor de espalda, ictericia, colicos en bebés, tónico y diurético^(7,13), contra la diabetes^(14,15), para enfermedades del riñón^(7,16) contra la malaria y la fiebre⁽¹⁰⁾. Los efectos de la infusión se deben probablemente al cacalol ya que es el más abundante de los compuestos cuantificados aunque no se ha demostrado directamente su efecto. Se ha encontrado también que el cacalol

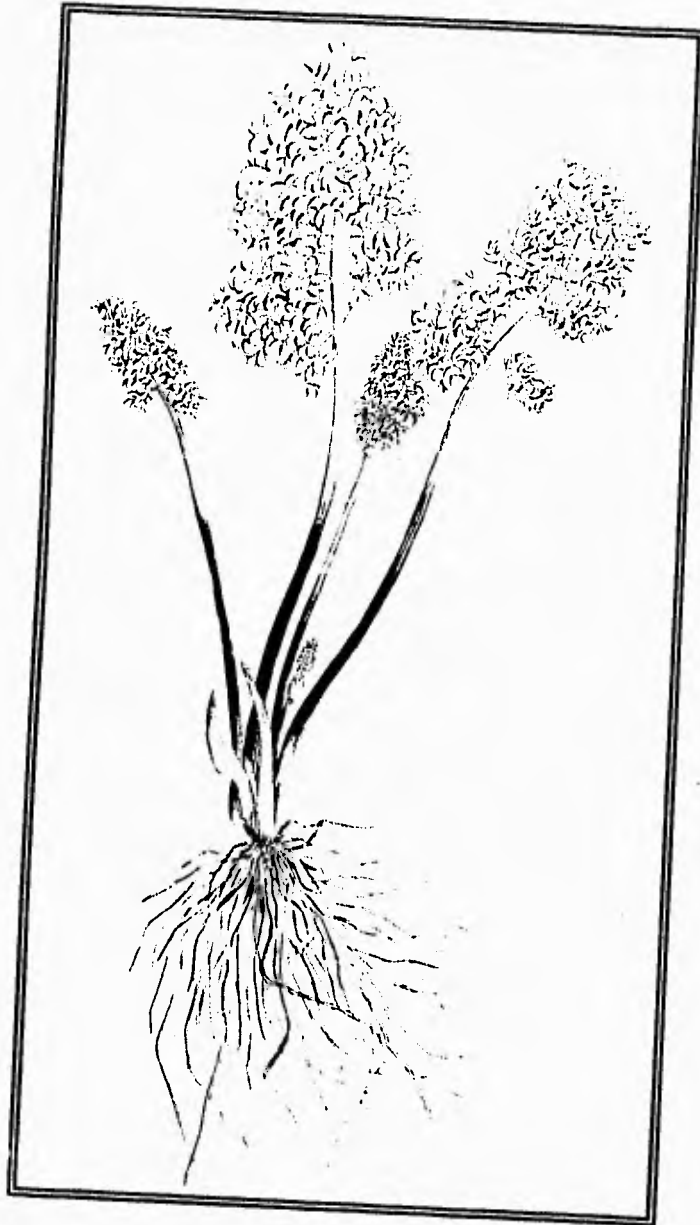


Fig. 2.2 *Cacalea decomposita* A. Gray

muestra actividad antimicrobiana contra algunas especies de hongos, bacterias y levaduras⁽¹⁷⁾.

Clasificación botánica:

División: fanerógamas

Subdivisión: angiospermas

Clase: dicotiledoneas

Subclase: simpétalas

Orden: campánula

Familia: compuestas

Subfamilia: tribu de las senecionides

Genero: Cacalia

Especie: decomposita

Sinonimia científica:

Senecio grayanus, Hemsley

Cacalea decomposita, A. Gray

Mesadenia decomposita, A. Gray

El papel biológico del cacalol en las plantas no es conocido, pero probablemente actúa como un agente aleloquímico. Los aleloquímicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas en forma natural como respuesta al ataque de depredadores tales como hongos, bacterias e insectos, así como para tratar de mantener libre de otras plantas su medio ambiente vital.

Las malas hierbas son nocivas para las plantas agrícolas debido a que crecen en zonas de cultivo, provocando reducción en la producción y calidad de éstos, ya que compiten por la biodisponibilidad de la luz solar, el agua y los nutrientes del suelo⁽¹⁸⁾. Debido a esto es necesario contar con formas eficientes para controlar las malezas.

Desde la antigüedad se utilizaban agentes químicos tales como el cloruro de sodio y el ácido sulfúrico para el control de las malezas. Posteriormente, se utilizaron otros compuestos como el arsenito de sodio, el disulfuro de carbono, algunos aceites de petróleo, clorato de sodio, dinitrofenol, y sulfamato de amonio. Más recientemente se empezaron a usar compuestos orgánicos, como el dinitrocresol (4,6 dinitro-O-cresol), carbamatos, dinitroanilinas, acetanilidas, triacinas, uracilos, ureas, sales cuaternarias de piridinio, compuestos haloalifáticos⁽¹⁹⁾, etc.

En 1940 se descubrió que los ácidos fenoxiacéticos en altas concentraciones actuaban como herbicidas, en cambio a bajas concentraciones actúan como reguladores del crecimiento de tipo auxínico, se aprovechó esta propiedad promotora de elongación celular para hacer estudios de síntesis y estructura-actividad de estos compuestos con el objeto de encontrar mayor potencia en la actividad auxínica y herbicida.

Los herbicidas orgánicos son los más utilizados para exterminar la maleza^[20], sin embargo estos compuestos han estado causando contaminación en suelos, agua, plantas y a los organismos de la escala evolutiva, debido a que la mayoría presentan baja biodegradabilidad y diferentes grados de toxicidad^[18].

Se conoce que las plantas producen y liberan al medio ambiente que las rodea uno o varios compuestos químicos llamados aleloquímicos, los cuales pueden interferir con el crecimiento y desarrollo de otras plantas, actuando de esta manera como herbicidas. Estos aleloquímicos pueden influir directamente en las asociaciones de plantas naturales o pueden actuar de una manera más sutil por inhibición de las simbiosis benéficas de microorganismos y plantas. Recientemente algunos científicos están probando los agentes alelopáticos (aleloquímicos) para su uso en agricultura. Los aleloquímicos son atractivos porque ellos son productos naturales sintetizados por plantas o microorganismos, los cuales son ambientalmente más seguros debido a que presentan biodegradabilidad^[21].

Los agentes alelopáticos pueden ser liberados de las plantas de diferentes maneras: a) volatilización de las hojas, b) disolución de las hojas y tallos por lluvias, niebla o por el rocío, c) exudación de compuestos de las raíces, d) liberación en los procesos de descomposición de las plantas muertas. También los microorganismos del suelo (actinomicetos, hongos y algas) juegan un papel importante en la síntesis y liberación de agentes tóxicos.

El nivel en que los aleloquímicos se producen está regulado genéticamente pero hay marcadas influencias del medio ambiente en la calidad y cantidad de los compuestos producidos por la planta y hay una gran variación en la capacidad de las plantas para producirlos. Los factores que afectan la producción de los aleloquímicos son principalmente las condiciones extremas entre las que podemos considerar, al estrés. Las plantas pueden estar sometidas a un gran número de condiciones de

stress, tales como cambios en: pH, presión atmosférica, iluminación, temperatura, salinidad, cantidad de agua y estado nutricional. El tipo y la edad de los tejidos de las plantas son extremadamente importantes para la producción de metabolitos secundarios, porque estos compuestos pueden ser almacenados en ciertos tejidos o producidos en un punto específico en el ciclo de vida de la planta, así como la capacidad de la planta para responder al stress a diferentes edades.

Los alelopáticos juegan un papel importante en la eliminación de la maleza que invade el campo abonado. Sin embargo, a la fecha no solo se han patentado dos compuestos producidos biotecnológicamente los cuales se utilizan comercialmente como plaguicidas, pero ninguno como herbicida.

Los compuestos aleloquímicos pueden actuar en varios sitios dentro de la célula para efectuar su acción alelopática (figura 2.3).

De la misma forma los herbicidas sintéticos pueden exterminar a las plantas de diferentes maneras, los sitios de ataque o interferencia de estos herbicidas pueden ser en cualquier paso enzimático de todas las vías bioquímicas y fisiológicas que poseen los diferentes tejidos, sin embargo, no están bien estudiados los sitios de ataque y los mecanismos de acción de todos los herbicidas existentes.

Varios autores han clasificado a los herbicidas orgánicos de acuerdo con sus efectos bioquímicos más importantes en las plantas. A continuación se dan algunos ejemplos.

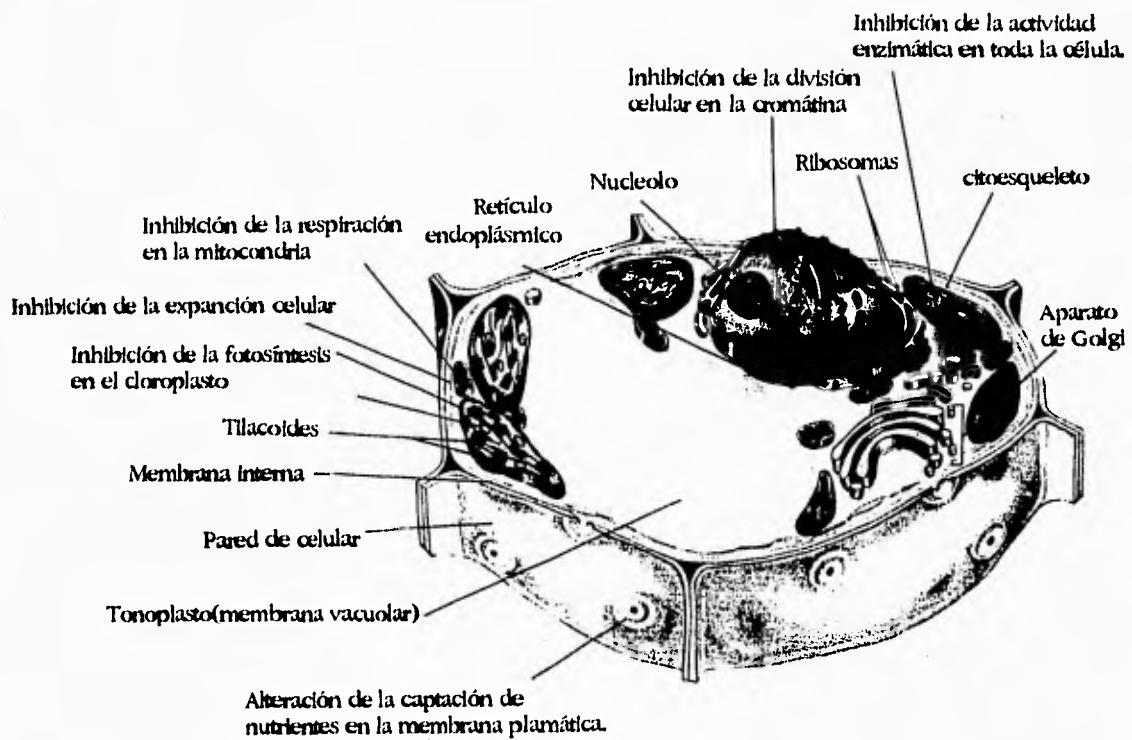
Moreland⁽²²⁾, clasifica las respuestas bioquímicas de los herbicidas bajo tres encabezados 1) respiración y transporte electrónico mitocondrial 2) fotosíntesis y reacción de Hill y 3) metabolismo de ácidos nucleicos y síntesis de proteínas.

King⁽²³⁾, clasifica la respuesta de los herbicidas como: inhibidores del crecimiento celular, reguladores del crecimiento e inhibidores de la fotosíntesis.

Percival y Baker⁽¹⁹⁾ concideran que la mayoría de los herbicidas utilizados actúan específicamente en la fotosíntesis, otros procesos metabólicos han sido identificados como blanco primario para la acción herbicida, estos son: división celular, elongación celular, metabolismo regulador del crecimiento de plantas y biosíntesis de lípidos.

Como podemos observar solamente el efecto de la inhibición de la fotosíntesis figura en todas las clasificaciones. Se sabe que aproximadamente el 50% de los herbicidas comerciales interfieren con algún paso de la fotosíntesis⁽²⁴⁾. Los

2.- Antecedentes



Los efectos en las membranas pueden incluir cloroplasto núcleo mitocondria y plasmalema.

fig.2.3 Sitios de acción de los aleloquímicos dentro de las células vegetales para su acción alelopática.

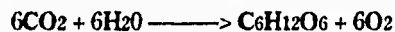
investigadores que diseñan, sintetizan y caracterizan nuevos herbicidas utilizan al cloroplasto como modelo biológico para lograr su objetivo, ya que la vía de la fotosíntesis en cloroplastos, es característica de algas y plantas, y los herbicidas que actúan a este nivel son los menos tóxicos para los mamíferos.

Los medios por los cuales los herbicidas pueden inhibir el proceso de la fotosíntesis incluyen: a) reproducción, desarrollo, estructura e integridad de los cloroplastos b) capacidad de síntesis de productos c) intervención en los caminos involucrados en la conversión de energía luminosa en energía química (reacción de Hill).

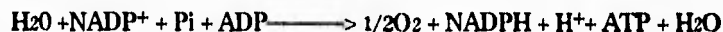
A continuación se describe brevemente el proceso de la fotosíntesis con objeto de entender mejor los sitios que bloquean los herbicidas al inhibir la fotosíntesis.

Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las algas y plantas superiores elaboran materia orgánica y producen O₂ a partir de CO₂ atmosférico, agua y energía solar.



El proceso de la fotosíntesis se divide en dos fases. La primera fase (reacciones luminosas) consiste en la captación de energía luminosa por los pigmentos que absorben luz convirtiéndola en energía química de ATP y reductores como el NADPH.



En la segunda fase (reacciones oscuras) los productos ricos en energía de la primera fase, el NADPH y el ATP, se emplean para la reducción de CO₂ a carbohidratos (figura 2.4), esta segunda fase puede representarse en términos generales por la siguiente reacción:

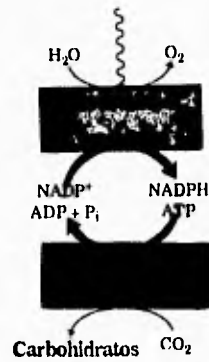


Fig 2.4 Las reacciones luminosas generan energía rica en NADPH y ATP a expensas de la energía solar. Estos productos son usados en las reacciones de fijación del carbono, para reducir el CO_2 a carbohidratos.

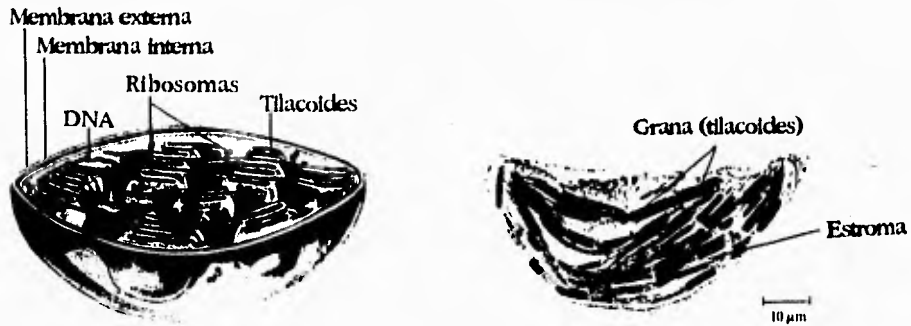
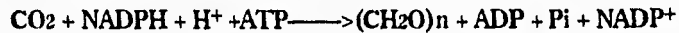


Fig. 2.5 a) Representación esquemática de la estructura de un cloroplasto b) micrografía electrónica de un cloroplasto.



Estas reacciones fotosintéticas se llevan a cabo en los cloroplastos.

Los cloroplastos tienen forma esférica elíptica o discoidal, tienen un diámetro de 4 a 10 μm y un grosor de 1 a 3 μm . Cada célula vegetal contiene de 20 a 40 cloroplastos. Un cloroplasto consta de una doble membrana externa llamada envoltura y una interna separadas por un espacio intermembranal. La membrana interna de la envoltura es una barrera permeable que regula el paso de los sustratos y productos de la fotosíntesis hacia dentro y fuera del cloroplasto. La membrana externa de la envoltura es permeable a todo tipo de moléculas y macromoléculas como las proteínas. La membrana interna del cloroplasto que se encuentra en el estroma es continua y está dispuesta en pliegues pareados llamados laminillas, las cuales se ensanchan a intervalos regulares para formar sacos membranosos aplanados o vesículas llamadas tilacoides que aparecen dispuestos en apilamientos llamados grana. El sistema del interior del organelo se llama estroma y contiene todas las enzimas involucradas en las reacciones oscuras (fijación del CO_2) (figura 2.5).

Las membranas tilacoidales están formadas por una bicapa lipídica en la que se encuentran integrados los diferentes complejos multiprotéicos (figura 2.6) requeridos para la reducción del NADP^+ y la síntesis de ATP, necesarios para la fijación del CO_2 ⁽²⁵⁾.

Las reacciones dependientes de luz son las que corresponden a la "reacción de Hill" o cadena transportadora de electrones, cuya función es generar un gradiente electroquímico de protones, que es usado en la fotofosforilación (figura 2.7).

La absorción de energía luminosa causa un flujo de electrones de un donador (agua) a un aceptor de electrones (NADP^+), el flujo de electrones del agua al NADP^+ se efectúa a través de una serie de enzimas redox transportadoras de electrones con potenciales redox que van de +0.82V a -0.32V con respecto al ENH, este flujo electrónico se efectúa en contra de un gradiente electroquímico, por lo que se requiere de dos eventos fotoquímicos, proporcionados por los fotosistemas I (P700) y II (P680).

El proceso de la fotosíntesis comienza cuando la luz llega a la superficie de los tilacoides y es absorbida por los pigmentos antena de la unidad fotosintética, la cual

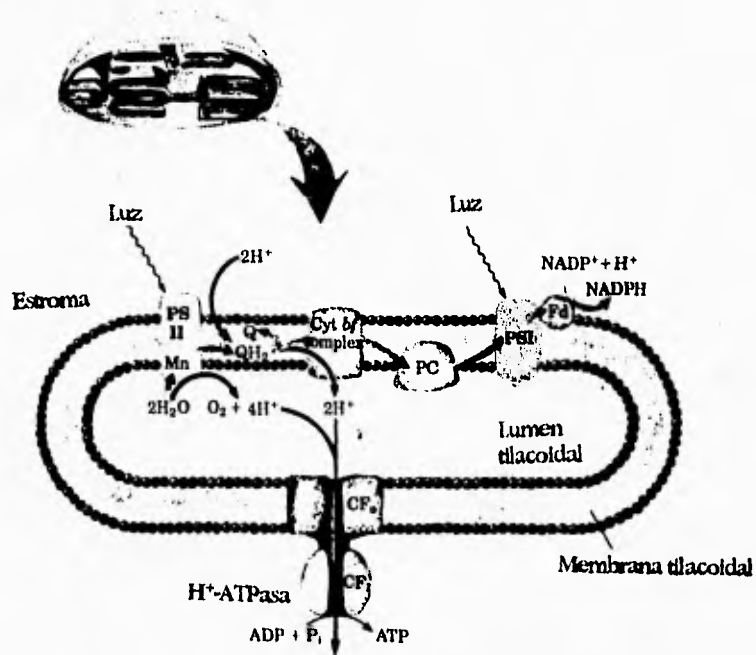


Fig 2.6 Distribución de los fotosistemas I y II, el complejo del citocromo bf y la ATP sintetasa en la membrana tilacoidal. El bombeo de protones inducido por la luz hace que el espacio interno sea ácido. El flujo de protones a través del CF₀ al lado del estroma origina la síntesis de ATP por la subunidad CF₁

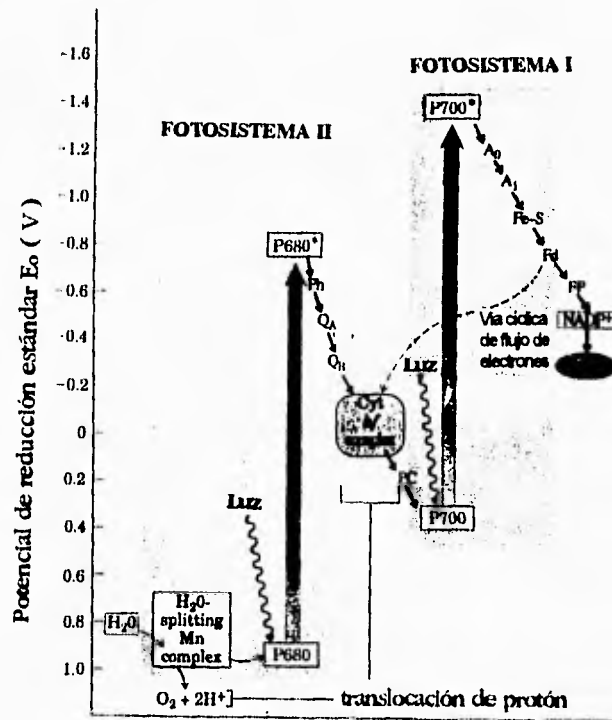
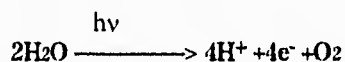
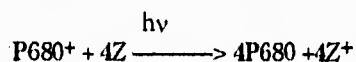


Fig 2.7 Diagrama energético del transporte electrónico fotosintético por la vía de los fotosistemas I y II, representado en función de los potenciales estándar de oxidorreducción de los pares interactuantes. Este esquema "Z" muestra el camino de la transferencia de electrones no cíclica desde el H₂O hasta el NADP⁺. La línea punteada representa la transferencia de electrones cíclica, la cual involucra únicamente al FSI; los electrones proyectados al aceptor primario del FSI pueden retornar al P700⁺ mediante el citocromo bf.

está formada por proteínas, clorofilas, carotenoides y otros pigmentos accesorios, estos compuestos absorben la energía luminosa transfiriéndola en forma de fotones hasta el centro de reacción de la unidad fotosintética, en donde la energía de un fotón se convierte en una separación de carga iniciando el flujo de electrones (figura 2.8) [26]. La absorción de un cuanto de luz por el fotosistema II (FSII) provoca la transferencia de un electrón a la feofitina Ph, como resultado el P680 ha quedado como un oxidante fuerte (P680⁺) por lo que debe volver a su estado reducido, los electrones necesarios para su reducción provienen de la fotólisis del agua. En este proceso 2 moléculas de agua son fotolísadas con 4 fotones o cuantos de luz produciendo 4 electrones, 4 protones y una molécula de O₂



Los cuatro electrones sustraídos del agua no pasan directamente a P680⁺, ya que este es aceptor de un solo electrón. El donador inmediato a P680⁺ es un residuo de tirosina (representado por el símbolo Z o Y) de una proteína D1 del centro de reacción del FSII, el cual pasa los electrones de uno en uno al centro P680⁺.



Este residuo de tirosina (Tyr) recobra su electrón perdido por oxidación de un grupo de 4 iones Mn del complejo enzimático de la fotólisis del agua. Este complejo con Mn es oxidado en una secuencia de 5 estados de oxidación representados por S₀, S₁, S₂, S₃, S₄. Después de 4 transferencias de electrones simples, cada una correspondiente a un fotón se produce una carga 4⁺ en el complejo de Mn (figura 2.9). Los electrones perdidos del centro de Mn pasan de uno en uno al residuo de Tyr(Z⁺) en la proteína del centro de reacción del FSII.

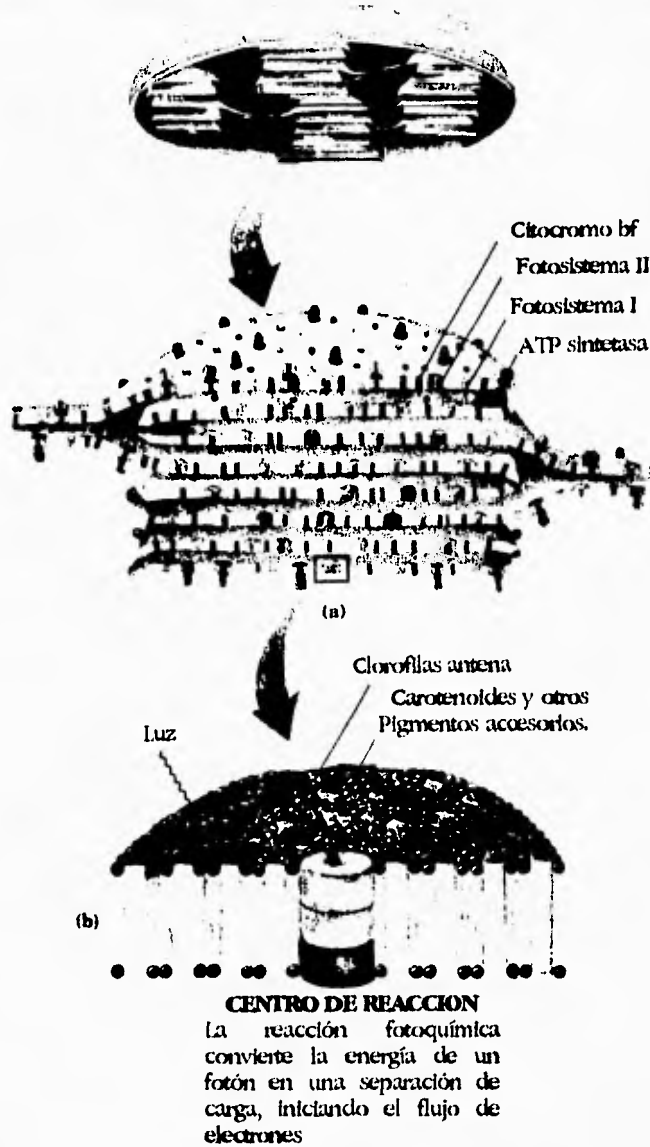


Fig.2.8 Organización de los componentes de la fotosíntesis en la membrana tilacoidal a) distribución de los fotosistemas I y II, ATP sintetasa y el complejo del citocromo bf. b) ampliación de un fotosistema mostrando el centro de reacción, clorofilas antena y pigmentos accesorios.

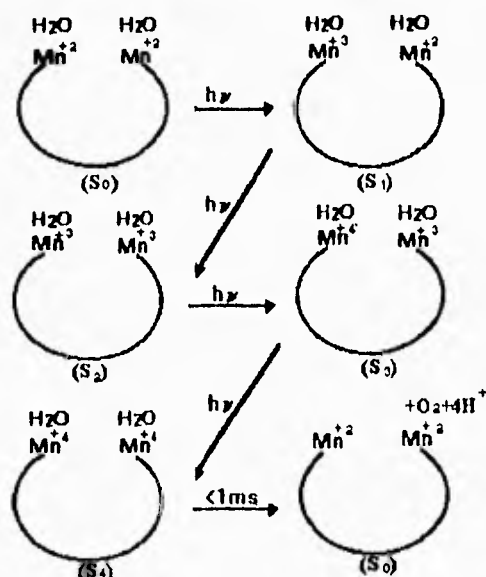
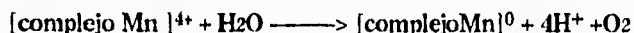


Fig 2.9 Modelo del proceso de oxidación de los iones Mn en el complejo enzimático de la fotólisis del agua.

En este estado (Mn⁺⁴) el complejo de Mn puede tomar 4 electrones de un par de moléculas de agua, liberando 4 protones y O₂

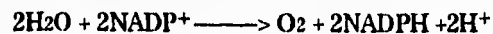


En el lado reducido del FSII la Ph reducida transfiere un electrón a una molécula de plastoquinona unida a un centro de proteína denominado QA reduciéndola a semiquinona QA⁻. QA⁻ transfiere su electrón a una segunda molécula de plastoquinona unida al sitio QB, cuando esta quinona es reducida a semiquinona presenta una mayor afinidad por el sitio QB, esta semiquinona formada permanece en el sitio QB hasta que QA es reducida por un segundo electrón del centro de reacción, la oxidación de QA⁻ provoca la reducción de QB a QB²⁻ la cual se protona para formar QBH₂. Cuando QB está completamente reducido puede dejar libre el

sitio QB para que otra molécula de plastoquinona pueda unirse y aceptar los siguientes pares de electrones^[23].

La plastoquinona reducida QBH₂ o plastoquinol viaja através de la membrana hacia la superficie interna del tilacoide, donde libera los protones dentro del tilacoide y transfiere los electrones al complejo del citocromo bf. El siguiente acarreador de electrones es la plastocianina (PC), esta dona los electrones al fotosistema I (FSI). El FSI oxidado P700⁺ se produce al ser excitado simultáneamente con P680, el P700 excitado dona electrones de uno en uno al acceptor primario del FSI, que se ha identificado como A₀, A₁, FAFB que contiene clorofila A, quinona y dos proteínas con centro Fe-S. Los electrones son transportados a la ferredoxina (Fd) la cual se encuentra en la cara externa de la membrana tilacoidal. La Fd es una proteína que contiene dos centros Fe-S, de aquí los electrones son transferidos a la ferredoxina NADP⁺ oxido-reductasa (FP), la cual contiene flavinadenina dinucleótido (FAD⁺) como cofactor, este último se reduce con dos electrones de la cadena y con dos protones que toma del medio externo para formar el FADH₂. Finalmente el NADP⁺ adquiere los electrones y un protón del FADH₂ para formar NADPH + H⁺. El transporte de electrones de la proteína con centro Fe-S al NADP⁺ se efectúa en favor de un gradiente electroquímico.

Podemos resumir que en la reacción de Hill se transportan electrones desde el agua hasta el NADP⁺ por cada molécula de agua oxidada, lo cual se puede representar mediante la siguiente reacción.



Flujo electrónico en la fosforilación cíclica.

En el transporte electrónico cíclico, los electrones son transferidos desde el P700⁺, el centro de reacción excitado del FSI, a la Fd, y luego al complejo del citocromo bf. Los protones son bombeados por este complejo a la vez que los electrones regresan al centro de reacción através de la PC, este flujo cíclico de electrones origina un gradiente de protones que contiene la energía libre para la síntesis de ATP. En este proceso se genera ATP sin la formación de NADPH y O₂ (figura 2.7).

Biosíntesis de ATP o fotofosforilación.

Con el paso de dos electrones a través de la membrana fotosintética, se genera un gradiente de pH al fotolizarse la molécula de agua y reducirse la plastoquinona en el exterior (estroma) y oxidarse en el interior (lumen) del tilacoide, a esta diferencia es a lo que se denomina "gradiente electroquímico de protones", además del gradiente de pH, se forma un gradiente químico de cationes Mg^{++} y K^+ .

La transferencia de H^+ inducida por la luz va acompañada por la transferencia en sentido contrario de los iones K^+ y Mg^{2+} , en consecuencia se mantiene la neutralidad eléctrica y no se genera un potencial de membrana. La suma de los dos componentes posee la energía necesaria para la síntesis de ATP. Cuando los protones son conducidos a través de la membrana tilacoidal por el CF_0 o bomba de protones, se genera energía que es utilizada por el factor de acoplamiento 1 (CF_1) para catalizar la formación de ATP a partir de la fosforilación del ADP por el Pi (figura 2.6)

Tipos de acción inhibitoria a nivel de la fotosíntesis

Los herbicidas e inhibidores no herbicidas que afectan las reacciones fotoquímicas en cloroplastos aislados se dividen en:^[29]

I. Inhibidores del transporte de electrones

Este tipo de compuestos actúan por interacción o desplazamiento de uno o más intermediarios transportadores de electrones en la reacción de Hill. Estos compuestos inhiben el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado, así como la síntesis de ATP.

Algunos de los compuestos que actúan por este camino incluyen: hidroxilamina, tris^[30,31], DCMU^[32], DBMIB^[29], KCN^[33], etc.

Un gran número de diferentes clases de compuestos químicos inhiben el transporte electrónico fotosintético por unión a un sitio localizado en el lado reductor del FSII.

Los inhibidores fotosintéticos de mayor importancia pertenecen a los grupos químicos de las ureas, triazinas, anilidas, triazinonas, piridazinonas, bencimidazoles, carbamatos, cianoacrilatos, pironas, naftoquinonas, nitrofenoles, etc. La inhibición de la transferencia de electrones en el lado reducido del FSII ocurre a través de un aceptor primario QA (una plastoquinona asociada a un centro de clorofila) y un aceptor secundario QB unido a una apoproteína de 33KDa. La acción inhibitoria se debe a la unión no covalente y reversible del herbicida a la proteína de 33KDa. La unión del herbicida puede provocar impedimento estérico (figura 2.10) o un cambio conformacional en el sitio QB, previniendo la unión y reducción del herbicida modificando las constantes cinéticas y termodinámicas de la enzima QB.

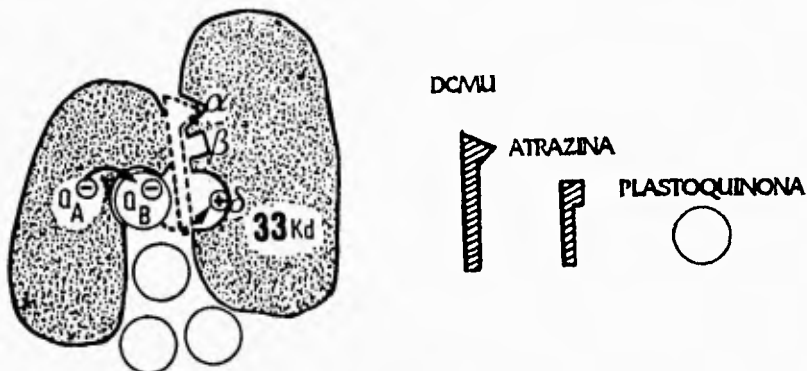


Fig 2.10 Visualización del sitio de unión de los herbicidas (DCMU y atrazina) a la proteína de 33Kd "Modelo de impedimento estérico"

La unión del herbicida al PSII y la inhibición de la reducción de QB probablemente promueven fitotoxicidad por suprimir la formación de ATP y NADPH. También provocan inhabilidad de la clorofila para disipar la energía luminosa, el exceso de energía luminosa ocasiona que la molécula de clorofila singulete se transforme a clorofila triplete, la cual introduce daños celulares a través de reacciones por radicales libres a partir de ácidos grasos no saturados. En presencia de oxígeno, se forman los

peróxidos de los lípidos destruyéndose la membrana y obteniéndose productos secundarios como el etano.

El resultado de la inhibición del flujo electrónico es que la fijación del CO₂ cesa y la planta muere por inanición ^[34]

II. Inhibidores de la transferencia de energía.

Este tipo de compuestos actúan directamente en el proceso de fosforilación, afectando directamente la actividad catalítica del CF₁ o CF₀ de la enzima de la fosforilación, por tanto, la velocidad de transporte de electrones en ausencia de ADP y Pi no se ve afectada. Algunos ejemplos son: Dio-9^[35] y N,N-diciclohexilcarbodiimida ^[36], piquerol ^[37], etc.

III. Desacoplantes.

Los desacoplantes son compuestos que desacoplan el transporte de electrones de la síntesis de ATP, por lo tanto, inhiben la velocidad de fosforilación sin inhibir la velocidad del flujo de electrones, mas bien su efecto es activarla. No obstante, en ausencia de uno o más de los componentes necesarios para la fosforilación (ADP, Pi o Mg) un desacoplador puede estimular la velocidad de flujo de electrones.

Los inhibidores desacoplantes son ácidos débiles lipofílicos los cuales en su forma aniónica atraviesan la membrana tilacoidal, tomando protones del medio interno, una vez protonado, viaja através de la membrana regresando a la superficie externa del tilacoide, donde libera el protón, dando como resultado la disipación del "gradiente de pH", el cual es la fuerza necesaria para la síntesis del ATP^[38].

IV. Aceptores de electrones

Son sustancias con potenciales rédox muy similares a los de alguna enzima rédox de la cadena transportadora de electrones, por lo que pueden competir con alguna de las enzimas rédox desviando el transporte de electrones de su camino natural.

Algunos de estos compuestos se usan para el estudio de reacciones parciales de la cadena redox, por ejemplo: MV ^[39], ferricianuro de potasio, fenacina metosulfato (PMS) ^[40], etc.

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos y reactivos.

La evaporación de las fracciones se realizó en un rotavapor RE 120 Buchi®. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y se reportan sin corregir. Las determinaciones electroquímicas se determinaron en un potencióstato galvanostato Princeton Applied Research (PAR)® modelo 173 acoplado a un programador universal PAR modelo 175. Los voltagramas cíclicos se graficaron en un registrador X-Y Hewlett-Packard® modelo 7004B. Se utilizó un aparato de ultrasonido Cole-Parmer® 8851 para el lavado de los electrodos. Se utilizaron electrodos de Pt y Au de Bioanalytical Systems Inc. (bas)® para voltametría cíclica.

La homogenización de las hojas de espinaca se hizo mediante una licuadora Osterizer®. Los cloroplastos se centrifugaron en una centrifuga Sorval® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge Du Pont Instruments. Para sedimentar las proteínas y residuos de los cloroplastos se utilizó una centrifuga clínica modelo CL, Hoffman-Pinther & Bosworth S.A. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman® DU 650. Para la determinación de la velocidad de transporte de electrones se utilizó un electrodo de Clark conectado a un oxímetro YSI 5300 Biological Oxigen Monitor y a un registrador Beckman®. Todas las mezclas de reacción se iluminaron con una lámpara de proyector (Gaf 2660). La medición de la síntesis de ATP se realizó en un potenciómetro Corning® modelo 12 con escala expandida, utilizando un microelectrodo combinado marca Orion®. Los cambios de pH se registraron en un registrador Gilson®.

3.- Parte Experimental

Todas las mezclas de reacción se iluminaron con una lámpara proyector de 250 watts através de una lente de Izawa, la cual consta de una solución de sulfato de cobre al 1%.

Para la extracción del cacalol del material vegetal se utilizó hexano grado técnico, el cual fué destilado antes de ser utilizado. El acetato de etilo, metanol y acetona utilizados fueron marca J.T. Baker®. Para la cromatografía se utilizaron placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254 de Merck®.

El pulido del electrodo de Pt requirió alumina con un tamaño de partícula de 0.05μ marca Buehler® Ltd. En tanto que para el pulido del electrodo de Au se utilizó pasta de diamante de 6.0μ marca Leco®. Para la formación de la amalgama de Hg se utilizó mercurio marca J.T. Baker®, el cual fue previamente tridestilado. El pentóxido de fósforo (P_2O_5), metavanadato de amonio (NH_4VO_3), Cloruro de calcio granulado (desecante) y el Zn metálico granulado utilizados para la purificación del acetonitrilo fueron marca Merck® y se utilizaron tal cual vienen del frasco. El acetonitrilo utilizado para las determinaciones electroquímicas fue marca Merck® el cual se secó y destiló sobre P_2O_5 antes de ser utilizado. El tetrafluoroborato de tetrabutilamonio (nBu_4NBF_4) y el perclorato de litio ($LiClO_4$) utilizados como electrolitos fueron marca Aldrich. Para burbujear las soluciones, se utilizó nitrógeno gas marca Infra®. El furano y fenol utilizados para la voltametría cíclica fueron marca Aldrich®, previo a su utilización el furano se purificó por destilación.

La sacarosa, cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de amonio (NH_4Cl), ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) utilizados para las determinaciones bioquímicas fueron marca Merck®. El metilviológeno (MV), adenosina difosfato (ADP), Silicomolibdato de sodio, 1,5 difenilcabazida (DPC), 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP), dibromo-metil-isopropil-p-benzoquinona (DBMIB), 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) y ácido ascórbico utilizados como inhibidores donadores y/o aceptores de electrones fueron marca Sigma®.

A. OBTENCION DEL CACALOL Y SUS DERIVADOS

I. Aislamiento del cacalol.

El cacalol se aisló de las raíces de *Cacalia decomposita* A.Gray "matarique" como se describe en ⁽¹⁾.

750 g de raíz de matarique se extrajeron 3 veces con 800 mL de hexano, dejando entre cada extracción un periodo de 12 hr, al término de éstas se filtró y concentró a sequedad, obteniéndose un aceite café-rojizo con olor característico. De éste extracto se pesaron 10 g con los cuales se procedió a realizar la separación de los constituyentes por cromatografía en columna. Para la cromatografía en columna se utilizó una columna de vidrio de 60 cm de altura por 15 cm de diámetro empacutada con 300 g de alúmina como adsorbente. La elución se llevó a cabo con hexano previamente destilado, se colectaron fracciones de 400 mL, las cuales se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares.

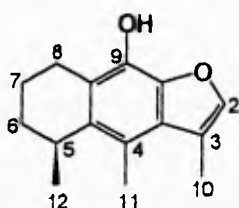
Las fracciones combinadas fueron las siguientes:

De las fracciones 1-40 se obtuvo un aceite café-rojizo, el cual no se identificó; de las fracciones 41-132 se obtuvieron unos cristales ligeramente amarillos los que se lavaron con pentano, obteniéndose 0.72 g de cacalol puro con un p.f 87-90°C y un Rf= 0.6 en el sistema (Hexano/AcOEt 8:2) ; de las fracciones 133-484 se obtuvieron 0.35 g de cacalol menos puro p.f 83-88 °C; el análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones 485-576 mostró la presencia de cacalol, además de otros compuestos más polares, sin embargo, en estas fracciones el cacalol ya no cristalizó.

II. Obtención de los derivados del cacalol.

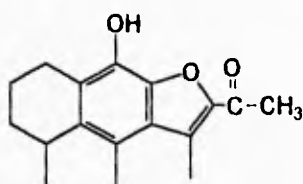
Los derivados del cacalol, 2-acetilcacalol, acetato de cacalol, acetilacetato de cacalol y metilcacalol, (figura 3.1) se prepararon y caracterizaron de acuerdo al método descrito por Romo y *et.al* ^(1,2).

3.- Parte Experimental

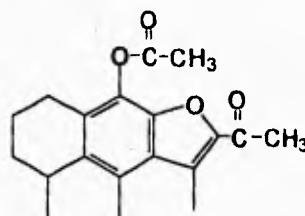


Cacalol

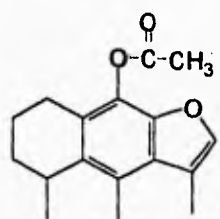
(9-hidroxi-3,4,5 trimetil-5,6,7,8-tetrahidro(2,3-b) furano)



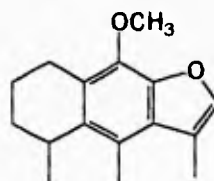
2-acetilcacalol



Acetato de 2-acetilcacalol



Acetato de cacalol



Metilcacalol

Figura 3.1 Estructuras del cacalol y sus derivados

B. PARTE ELECTROQUIMICA.

I. Preparación del medio bomba pH=7 (medio acuoso)

Reactivo	Concentración	PM g/mol	g/L
KCl	40mM	74.5	2.9800
MgCl ₂	5mM	203.3	1.0160
tricina	1mM	172.2	0.1722

Se mezclaron los reactivos anteriormente especificados y se ajustó el pH a 7.0 utilizando KOH y/o HCl.

Dado que los compuestos ensayados son insolubles en medio acuoso se utilizó una solución compuesta de 30% CH₃CN(v/v)/70% medio bomba pH 7.

II. Purificación del acetonitrilo.

Como disolvente no acuoso aprótico polar se utilizó acetonitrilo, y se purificó de la siguiente manera ⁽⁴¹⁾:

Dos litros de acetonitrilo se secaron sobre 200 g de cloruro de calcio, eliminándose así parte de la humedad, posteriormente, se destiló sobre 35 g de pentóxido de fósforo, usando un equipo de destilación fraccionada. El punto de ebullición obtenido a presión normal fue de 71-72 °C; una vez obtenido el cuerpo de la destilación se guardó inmediatamente en frascos sellados a los cuales se les agregaron 100 g de malla molecular #3 ,previamente secada a 100°C, para eliminar la humedad que pudiera tomar del ambiente. El acetonitrilo anhidro se utilizó inmediatamente después de destilarlo.

III. Preparación de la solución purificadora de nitrógeno.

La solución purificadora de nitrógeno se realizó de acuerdo con lo reportado en la literatura^[42].

2 g de metavanadato de amonio (NH_4VO_3), se disolvieron en una solución acuosa de ácido clorhídrico (25 mL HCl concentrado/250 mL de H_2O) calentándose hasta disolución completa. La solución resultante, de color verde, se transfirió a la torre de lavado de nitrógeno (figura 3.2), en seguida se añadió Zn amalgamado para reducir al vanadio al estado 2⁺, finalmente la solución se burbujeo con nitrógeno durante varias horas hasta obtener una coloración violeta. El burbujeo del gas nitrógeno proporciona un método muy conveniente para remover el oxígeno por deareación de la muestra con gas nitrógeno pre-purificado.

Preparación de la amalgama de Zn

10 g de granalla de zinc se colocaron en un vaso de precipitado y se cubrieron con agua desionizada, se le añadieron dos gotas de HCl concentrado y se añadió mercurio en cantidad suficiente hasta lograr la amalgamación de todas las granallas de Zn.

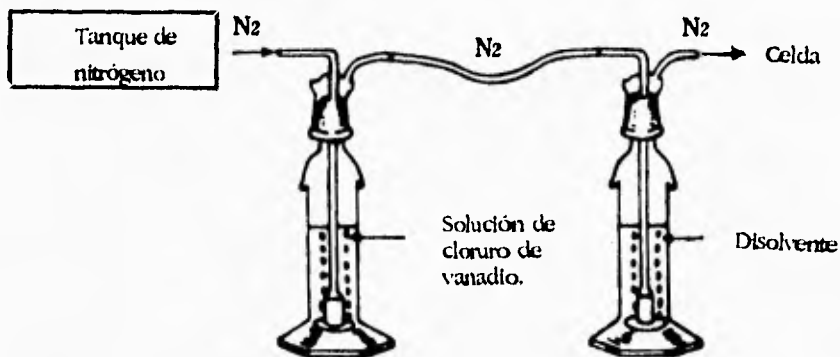


Figura 3.2. Esquema del equipo utilizado para la purificación del gas nitrógeno.

IV. Preparación del medio electrolítico aprótico polar.

Para las determinaciones electroquímicas en medio aprótico se utilizaron 2 diferentes medios electrolíticos, se utilizó una solución de tetrafluoroborato de tetrabutilamonio ($n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$) 0.1 M en acetonitrilo (CH_3CN) previamente destilado sobre P_2O_5 , así como también una solución de perclorato de litio (LiClO_4) 0.2 M en metanol (CH_3OH), el metanol fue utilizado tal cual viene del frasco.

Previo a la preparación de las soluciones, el $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ se secó en la estufa a 86°C durante 120 hr, el LiClO_4 se seco a 110°C por 48 hr, ambos medios fueron burbujeados durante 20 min con nitrógeno previamente pasado por la solución purificadora de nitrógeno.

V. Preparación del electrodo saturado de calomel (ESC).

Para la elaboración del ESC se requirió de un dispositivo de vidrio en forma de "H", con las siguientes especificaciones (figura 3.3)^[43]

En la parte derecha de la "H" (1) se colocó aproximadamente 1 cm de Hg puro tridestilado hasta cubrir el alambre de Pt ocluido en el vidrio. Sobre el mercurio se depositó una suspensión de 2 g de Hg_2Cl_2 (calomel) en 5 mL de una solución saturada de KCl, una vez que todas las partículas de calomel suspendidas se han depositado en la superficie del Hg, se llenan los dos compartimentos (1) y (3) de la "H" con una solución saturada de KCl y se tapa para evitar que se evapore la solución.

Una vez preparado el electrodo de calomel se colocó la punta del vidrio poroso (vócor) en una solución saturada de KCl por un tiempo de 2 hr con la finalidad de estabilizar al electrodo. Cuando no está en uso el electrodo de calomel, la punta del vidrio poroso debe estar siempre sumergida en una solución de KCl saturado.

3.- Parte Experimental

- 1.- Tubo de vidrio de 5.0 cm de largo por 10 mm de diámetro.
- 2.- Tubo de vidrio de 1.5 cm de largo por 5 mm de diámetro
- 3.- Tubo de vidrio de 7.5 cm de largo por 5 mm de diámetro
- 4.- Vitor (vidrio poroso de 2 mm de diámetro y 2 mm de grosor)
- 5.- Alambre de Pt.

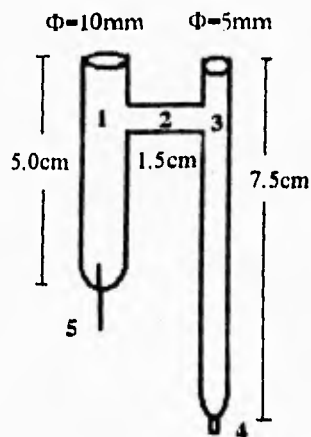


Figura 3.3 Esquema de la "H" de vidrio requerida para la preparación del electrodo saturado de calomel.

VI. Preparación y pulido de los electrodos.

La preparación y pulido de los electrodos se realizó de acuerdo con lo reportado ^[43].

a) Electrodo de mercurio

El electrodo de mercurio consiste de un electrodo de Au cubierto de una película de Hg.

Para la preparación del electrodo de Hg se utilizó un electrodo de Au el cual se pulió primero frotando la superficie del electrodo con un movimiento circular sobre pasta de diamante, posteriormente se lavó el electrodo con agua destilada y se pulió durante 2 a 3 minutos sobre una pasta de alumina en agua, en seguida el electrodo se lavó con suficiente agua destilada y se colocó durante 2 min en el aparato de ultrasonido para eliminar completamente la alumina que hubiese quedado. Finalmente se enjuagó con acetona y se dejó secar.

Una vez pulida y seca la superficie del electrodo de Au, se sumergió en un vaso conteniendo una pequeña cantidad de mercurio puro tridestilado, después de 1 minuto se sacó el electrodo y el exceso de mercurio fue removido con una toalla de papel. El resultado es una superficie lisa y brillante y con un terminado tipo espejo. La preparación del electrodo de Hg se realizó previa a cada determinación. Para aplicar una superficie fresca de Hg la amalgama anterior fue removida por medio de pulido del electrodo sobre una lija fina especial para pulido de electrodos.

b) Electrodo de platino

Para el pulido del electrodo de platino se preparó una pasta de alúmina (0.05μ) con agua destilada, el electrodo se frotó suavemente con movimiento circular durante 1 a 2 minutos, posteriormente se lavó el electrodo con suficiente agua destilada y se colocó durante 2 minutos en el aparato de ultrasonido para eliminar completamente cualquier residuo de alúmina. Finalmente se enjuagó con acetona y se dejó secar resultando una superficie brillante y con terminado tipo espejo. Este procedimiento se repitió antes de registrar cada voltograma, para evitar que los voltogramas fueran modificados por depósito de material en el electrodo de trabajo.

c) Electrodo de carbón vidriado (Glassy carbon)

El método para el pulido del electrodo de C vidriado es el mismo que el descrito para el electrodo de platino.

VII. Determinación de los potenciales de oxido-reducción por voltametría cíclica.

a) Cacalol y sus derivados

Los potenciales de oxido-reducción del cacalol y sus derivados (acetato de cacalol, acetato de 2-acetilcacalol, 2-acetilcacalol y cacalol metileter) se determinaron por voltametría cíclica en medio prótico y en medio aprótico de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN . Previo a esto, los medios electrolíticos se estudiaron por voltametría cíclica. El voltagrama cíclico del medio prótico se corrió tanto en dirección positiva como en dirección negativa para obtener los límites anódicos y catódicos dentro de los cuales fué posible trabajar. Para el estudio de la zona anódica se utilizó electrodo de platino como electrodo de trabajo y electrodo de Hg para el estudio de la zona catódica. En todos los casos se utilizó un alambre de Pt como electrodo auxiliar y electrodo saturado de calomel (ESC) como electrodo de referencia. El límite anódico obtenido en este medio fue de 1.2 V y el límite catódico fué de -1.8V.

El estudio del medio aprótico también se realizó haciendo el barrido tanto en dirección positiva como en dirección negativa. En todos los casos se utilizó un electrodo de Pt como electrodo de trabajo para el medio de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN , para el medio de LiClO_4 en CH_3OH se utilizó un electrodo de C vidriado como electrodo de trabajo; en todos los casos se utilizó como electrodo auxiliar un alambre de Pt y ESC como electrodo de referencia.

El sistema de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ - CH_3CN nos proporcionó un límite catódico de -1.5 V y un límite anódico de 2.5 V; para el sistema de LiClO_4 - CH_3OH se obtuvo un límite anódico de 1.6 V y un límite catódico de -0.6 V.

Todas las soluciones se prepararon 3mM en el medio electrolítico, previo a la preparación de las soluciones, la pureza de los compuestos se verificó por ccf, utilizando placas de aluminio Merck recubiertas con gel de sílice 60, se utilizó una mezcla de hexano-acetato de etilo (8:2) para realizar la elución, las placas se revelaron con luz UV de onda corta y solución de sulfato cérico. Las soluciones se

3.- Parte Experimental

prepararon inmediatamente antes de cada experimento. Se trabajó a temperatura ambiente en una celda de vidrio no dividida (figura 3.4)

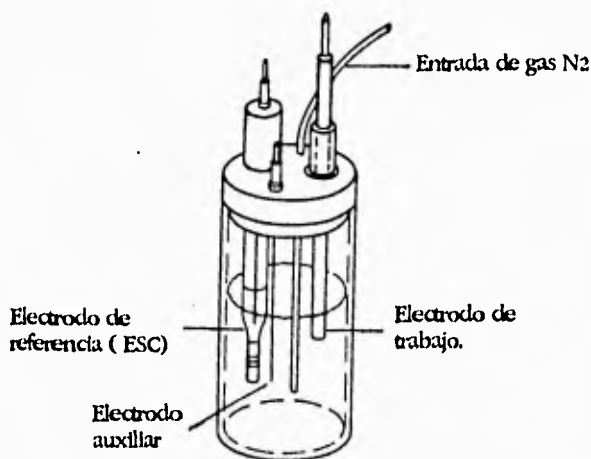


Figura 3.4 Celda electroquímica utilizada para voltametría cíclica

Los potenciales redox de todos los compuestos se obtuvieron midiendo la corriente i en el electrodo de trabajo como una función del potencial E (V) vs ESC y se pasaron a los valores correspondiente al potencial estándar de hidrógeno para fines comparativos con el medio biológico bajo estudio.

Los voltagramas cíclicos de los compuestos estudiados tanto en medio prótico como aprótico se corrieron a velocidades de 50,100, 150, 200 y 250 mV/s, haciendo el barrido tanto en dirección positiva como en dirección negativa.

Para el caso particular del cacalol se obtuvieron también los voltagramas cíclicos en medio aprótico de LiClO_4 0.2 M en CH_3OH , iniciándose el barrido en cero volts hacia dirección positiva, a velocidades de 50, 100, 150 y 200 mV/s.

b) Furano y fenol

Los potenciales rédox del furano y fenol se determinaron en medio prótico pH 7 y en medio aprótico de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN . Las soluciones de furano fueron 3 mM en el medio electrolítico, previo a la preparación de la solución el furano se purificó por destilación fraccionada p.eb 25°C ; las soluciones de fenol fueron 6 mM en el medio electrolítico, la pureza de los compuestos se verificó por ccf, las soluciones se prepararon y burbujearon con N_2 purificado inmediatamente antes de cada experimento.

Los voltagramas cíclicos de furano y fenol en medio prótico se registraron iniciando el barrido en cero hacia dirección positiva a una velocidad de 100 mV/s. Posteriormente se preparó una solución de furano 3 mM + fenol 6 mM y se registraron los voltagramas en medio prótico y en medio aprótico haciendo los mismos barridos que para furano y fenol.

VIII. Electrólisis a potencial controlado del cacalol en medio aprótico de LiClO_4 0.2 M en CH_3OH .

La electrooxidación del cacalol en medio aprótico se llevó a cabo a un potencial controlado de 1.2 V vs ESC. Se trabajó a temperatura ambiente en una celda dividida. La celda electrolítica consistió en un vaso de precipitado de 200 mL considerándosele como compartimiento anódico, en cuyo interior se colocó un vaso de porcelana porosa de 3.3 cm de diámetro interno y 7 cm de altura que hizo las veces de compartimiento catódico. El vaso de porcelana previno que las soluciones del ánodo y del cátodo se mezclaran pero permitió el paso de iones.

En el compartimiento anódico se colocó una solución de 200 mg de cacalol en 200 mL de LiClO_4 0.2 M en CH_3OH , allí se introdujeron: una barra de gráfite de

20 cm² como electrodo de trabajo, el ESC y un agitador magnético; en el compartimento catódico se colocó la solución de electrólito (a la misma altura que la solución de la celda anódica) y una lámina de Pt como cátodo, se cerró el circuito iniciándose la reacción.

El curso de la reacción se siguió por ccf. Al llegar al término de la corriente calculada (671.3 coulombios) se detuvo la reacción, sin embargo, se observó por ccf que todavía había materia prima por lo cual se pasó un 10% más de la cantidad total de corriente y se tomó una placa, se continuó así aumentando la cantidad de corriente gradualmente hasta que se observó por ccf que ya no había materia prima. El total de corriente que se paso fué de 820 C.

La mezcla de reacción se extrajo con 3 porciones de 25 mL de AcOEt, los extractos orgánicos se juntaron y secaron con sulfato de sodio anhidro, se concentraron a sequedad y el extracto obtenido se sometió a una cromatografía preparativa en capa delgada, empleando como sistema de elución, Hex:AcOEt (7:3). Como resultado del proceso anterior, se obtuvieron 2 bandas, una correspondió a la materia prima (cacalol) y de la otra, la que representaba el compuesto mayoritario se obtuvo el metoxicacalol.

IX. Electrólisis a potencial controlado en medio prótico.

La oxidación electroquímica del cacalol en medio prótico se llevó a cabo a un potencial controlado de 0.52 V vs ESC. Se utilizó aquí la celda anteriormente descrita. Como electrodo de trabajo y contraelectrodo se usaron láminas de platino con un área de 10 cm².

200 mg de cacalol disueltos en 10 mL de CH₃CN y aforados a 25 mL con medio prótico pH 7, se colocaron en el compartimento anódico agitándose magnéticamente. El compartimento catódico se llenó con la mezcla de CH₃CN/medio pH 7. La electrolisis se llevó a cabo a temperatura ambiente.

El desarrollo de la reacción se siguió por ccf. Durante el proceso se añadió más CH₃CN en ambos compartimentos, debido a que durante la reacción el disolvente se evaporaba. El ánodo se lavó con CH₃CN y acetona y se pulió a menudo debido a que

se formaba sobre su superficie un compuesto color amarillo que impedía el paso de la corriente, se pasaron un total de 77.5 C durante 91 hr. El análisis por ccf mostró que todavía había materia prima, sin embargo, la reacción se detuvo por que el paso de corriente era mínimo.

La mezcla de reacción del compartimento anódico se extrajo con 3 porciones de 25 mL de AcOEt, los extractos orgánicos se juntaron y secaron con sulfato de sodio anhidro, se concentraron a sequedad obteniéndose un extracto café, éste se sometió a una cromatografía preparativa en capa delgada, empleando como sistema de elución, Hex-AcOEt (7:3). Para este propósito se empleó una cromatoplaque de gel de sílice de (0.25 mm de espesor).

Como resultado del procedimiento anterior, se obtuvieron 12 bandas, de las cuales únicamente se separó la que representaba al compuesto mayoritario. De esta manera se obtuvieron 10 mg de un compuesto color café, el cual al estudiarlo por RMN-¹H mostró la presencia de un polímero, sin embargo, este compuesto no fué identificado.

C. PARTE BIOQUIMICA.

I. Aislamiento de los tilacoides de los cloroplastos.

Los tilacoides de los cloroplastos se aislaron como se describe en ⁽⁴⁴⁾. Los tilacoides se aislaron apartir de 30 g de hojas de espinacas frescas (*Spinacea oleracea* L.), verdes y turgentes. Todo el proceso de aislamiento se llevó a cabo en frío y en la obscuridad. Las hojas se lavaron con suficiente agua, para eliminar la tierra, se les quitó la nervadura central y el ápice, se cortaron en pequeños fragmentos y se colocaron en el vaso de la licuadora, previamente enfriado, conteniendo 150 mL de un medio que contiene sacarosa 400 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 20 mM y tricina 30 mM a pH 8 (medio de aislamiento), se homogenizó en la licuadora durante 5 segundos intermitentes.

3.- Parte Experimental

El homogenizado se filtró através de 20 capas de gasa para eliminar las células y fibras que no se molieron, el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min a 4°C., se desechó el sobrenadante y el sedimento que contiene los cloroplastos se lavó con el medio de aislamiento diluido 1:3 en agua y se centrifugó a 10,000 rpm. durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón obtenido, conteniendo los tilacoides, se resuspendió en 1 ml del medio de aislamiento.

II. Cuantificación de la clorofila.

La cuantificación de la clorofila se realizó de acuerdo al método Arnon ^[45]. Esta determinación se realizó por duplicado, se tomó una alícuota de 30 µL de tilacoides y se aforó a 5 mL con acetona al 80% (en agua v/v), se agitó vigorosamente y se mantuvo en la obscuridad por 5 min para permitir la extracción y solubilización de la clorofila, así como para evitar la degradación por la luz.

A continuación se centrifugó en una centrífuga clínica, a velocidad máxima durante 5 min, con el fin de sedimentar proteínas y otros residuos de los cloroplastos. Al sobrenadante obtenido se le determinó la absorbancia a 663 nm y 645 nm, utilizando como blanco acetona al 80 %.

La concentración de clorofila se obtuvo aplicando la siguiente ecuación.

$$[\text{Clorofila}] = 8.05(A_{663}) + 20.29(A_{645})$$

$$[\text{Clorofila}] = \text{conc. } \mu\text{g mL}$$

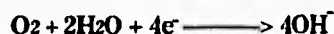
III. Medición de la velocidad de transporte de electrones.

Basados en el hecho de que por efecto de la luz hay fotólisis del agua y que por cada mol de agua que cede dos moles de electrones al sistema oxidoreductor de la cadena fotosintética, se liberan dos moles de protones del agua al medio interno del tilacoide, liberándose 0.5 moles de oxígeno molecular, los cuales se difunden al medio de reacción. La concentración de oxígeno en el medio de reacción se midió en un monitor de oxígeno, que consiste en un electrodo tipo Clarck.

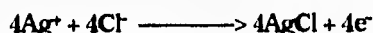
El sistema de Clarck^[46] está formado de dos electrodos :

3.- Parte Experimental

Cátodo de platino: en este electrodo el oxígeno es reducido por la reacción.



Anodo de plata: donde ocurre la siguiente reacción.



Ambos electrodos están en contacto con una solución concentrada de KCl, que a su vez están cubiertos por una membrana de politetrafluoretileno que está en contacto con el medio de reacción y es permeable al oxígeno. El flujo de corriente resultante en la celda electrolítica es proporcional a la concentración de O₂ en la muestra, los cambios de corriente detectados por el electrodo se traducenidos a voltaje por un oxímetro, el cual se conecta a un registrador Beckman.

Todas las mezclas de reacción se iluminaron con luz actínica de una lámpara de proyector. El haz luminoso se hizo pasar através de 5 cm de una solución de sulfato de cobre al 1% (lente de Izawa) que sirve como filtro luminoso y de calor.

El medio basal que se utilizó para medir el transporte de electrones fue 3 mL de medio que contiene sacarosa 100 mM, MgCl 25 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM (pH 8). En todos los casos se adicionó la cantidad de tilacooides equivalente a 60 µg de clorofila.

En este experimento se manejaron las siguientes condiciones experimentales.

a) Medición del transporte de electrones no cíclico basal de H₂O a MV.

Medio basal + metilviológeno (MV) 50 µM + compuesto a ensayar en concentraciones crecientes. El MV se adicionó como aceptor artificial de electrones, ya que acepta electrones a nivel de los centros Fe-S del FSI^[39] (figura 3.5).

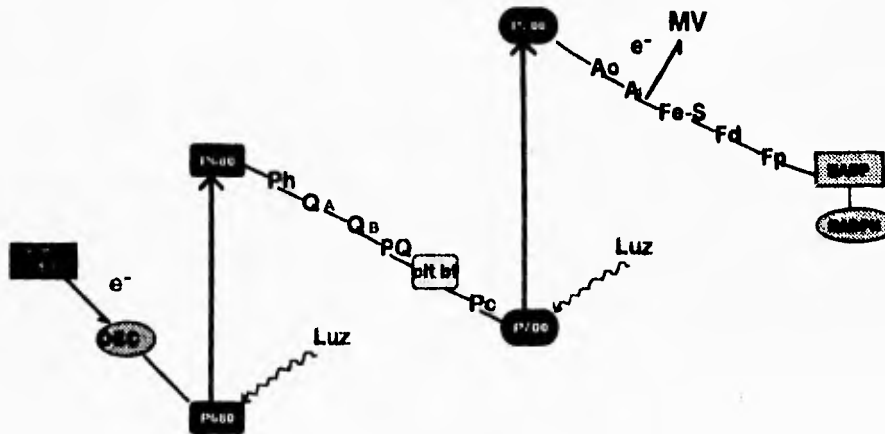


Figura 3.5 Medición del transporte de electrones de H₂O a MV

b) Medición del transporte de electrones no cíclico fosforilante de H₂O a MV

Medio basal + MV 50 μM + ADP 1 mM + Fosfato de potasio dibásico 3 mM + compuesto a ensayar a concentraciones crecientes.

c) Medición del transporte de electrones no cíclico desacoplado de H₂O a MV

Medio basal + MV 50 μM + NH₄Cl 5 mM (como desacoplante) + compuesto a ensayar a concentraciones crecientes.

Para las determinaciones que a continuación se mencionan se utilizó el siguiente medio basal: sorbitol 100 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM (pH 8).

d) Medición del transporte de electrones de H₂O a SiMo

Medio basal + SiMo 100 μM + DCMU 10 μM + NH₄Cl 5 mM + compuesto a ensayar a concentraciones crecientes. El SiMo funciona como aceptor de electrones antes del nivel Q, aceptor primario de electrones en el FSII, el DCMU inhibe el flujo de electrones en FSII (figura 3.6) ⁽⁴⁷⁾

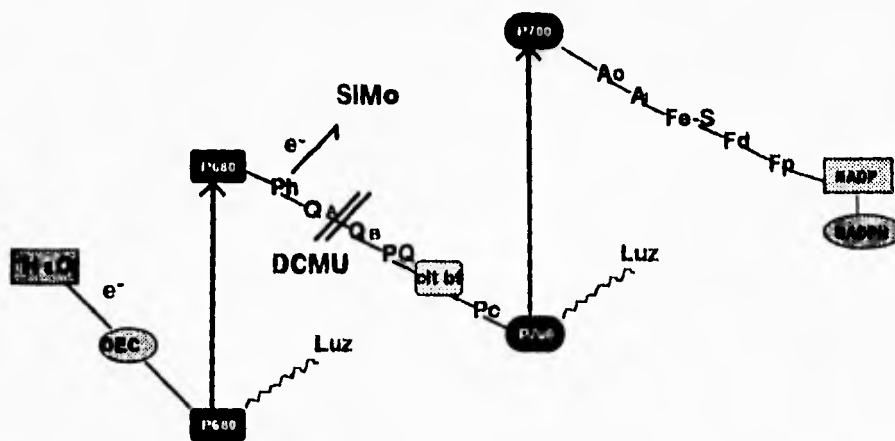


Figura 3.6 Medición del transporte de electrones de H₂O a SiMo

e) Medición del transporte de electrones del fotosistema II desacoplado de H₂O a DCPIP

Medio basal + ferricianuro de potasio K₃Fe(CN)₆ 300 μM + DCPIP 50 μM + DMBIB 1 μM + NH₄Cl 5 mM + compuesto a ensayar a diferentes concentraciones

El DMBIB se adicionó para impedir el paso de los electrones hacia FSI ⁽⁴⁸⁾. El DCPIP/K₃Fe(CN)₆ se utilizó como aceptor final de electrones ⁽⁴⁹⁾ (figura 3.7)

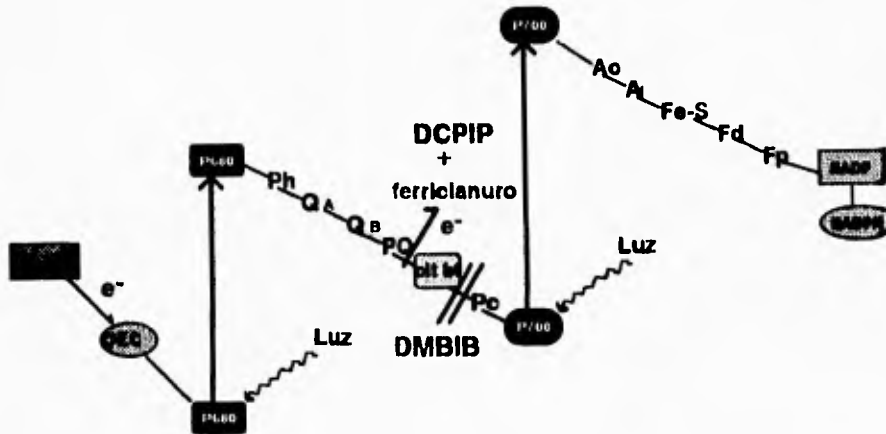


Figura 3.7 Medición del transporte de electrones de H₂O a DCPIP

f) Medición del transporte de electrones en FSI de DCPIP a MV

Para determinar el efecto de estos compuestos en FSI se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Medio basal + MV 50 μ M + DCMU 10 μ M + DCPIP 100 μ M/ascorbato 300 μ M + compuesto a ensayar

El DCMU se empleó como inhibidor de la enzima Q_B [32] para impedir el flujo de electrones de FSII. El DCPIP/ascorbato se utilizó como donador de electrones a nivel del complejo b/f [50] y MV como aceptor final de electrones[39]. (figura 3.8).

Controles. Los controles se realizaron al inicio y al final de cada experimento, estos consistieron en la mezcla de reacción mencionada para cada experimento a excepción del compuesto a ensayar.

Titulación. Se realizó de la siguiente manera: medio de transporte (sorbitol 100 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM, tricina 15 mM pH 8) + 10 μ L de K₃Fe(CN)₆ mM + tilacoides equivalentes a 60 μ g de clorofila en 3 mL del medio, posteriormente se iluminó el tiempo necesario para que el K₃Fe(CN)₆ se consumiera totalmente, esta

3.- Parte Experimental

determinación nos permitió obtener la cantidad de oxígeno desprendido en μeq de electrones transportados al consumirse $10 \mu\text{L}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 40 mM . Esta velocidad se tomó como referencia cuando se utilizaron otros sistemas en donde el aceptor de electrones era otro compuesto diferente.

En el caso del ferricianuro de potasio se observó una producción neta de oxígeno por la donación de electrones del agua a la cadena fotosintética.

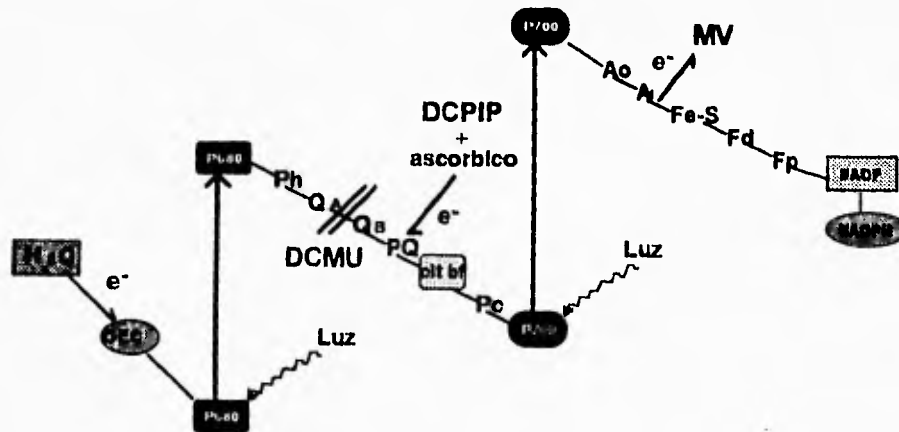
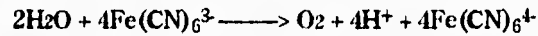


Figura 3.8 Medición del transporte de electrones en FSI

IV. Medición de la velocidad de transporte de electrones de DPC a DCPIP por método espectrofotométrico.

En esta determinación se utiliza DCP como donador y el DCPIP/ascorbato como aceptor de electrones. En la figura 3.9 se muestra el fragmento de cadena rédox que se determinó en este experimento^[51].

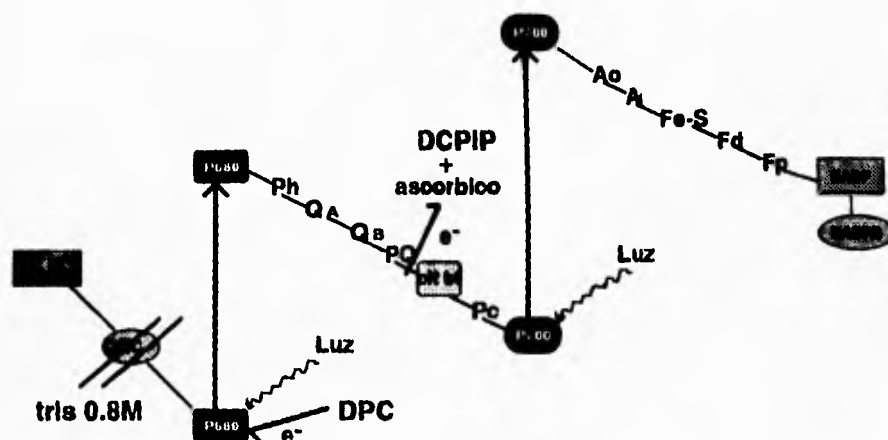


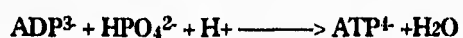
Figura 3.9 Medición del transporte de electrones de DPC a DCPIP.

Para inhibir al complejo de la fotólisis del agua, los tilacoides se incubaron en la oscuridad por 40 min con Tris 0.8 M (pH 8) a 4°C, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 min y se resuspendieron en 1 mL del medio de transporte, finalmente se determinó la concentración de clorofila como se describió anteriormente.

El medio de reacción contenía: 3 mL del medio basal, NH₄Cl 5 mM, DPC 200 μM, DCPIP 100 μM, compuesto a ensayar a diferentes concentraciones y la cantidad de tilacoides equivalentes a 60 μg de clorofila, se agitó y se leyó la absorbancia a 600 nm. A continuación se iluminó por 1.5 min y se volvió a determinar la absorbancia, con el ΔAbs obtenido y aplicando la ley de Lambert-Beer se determinó la velocidad de transporte de electrones.

V. Síntesis de ATP

La medición de la síntesis de ATP se realizó mediante la técnica reportada por Dilley^[52]. Se sabe que durante la síntesis de ATP a pH 8, se consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada mediante la siguiente reacción:



La medición del cambio de protones en el medio de reacción se determinó a pH entre 8.0 y 8.1, se utilizó un electrodo combinado conectado al potenciómetro con escala expandida, el cual se conectó al registrador gráfico.

El medio de reacción contiene: MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, tricina 1 mM (pH=8), MV 50 µM, ADP 1 mM, K₂HPO₄ 3 mM, compuesto a ensayar y el equivalente a 60 µg de clorofila.

El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un período de iluminación de 1min, el H⁺ producido se cuantificó por titulación con una solución estándar de HCl 0.01 N. El medio de reacción se iluminó con una lámpara de proyector de 250 watts através de una lente de Izawa.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSION

A. RESULTADOS BIOQUIMICOS

I. Transporte de electrones

Con objeto de caracterizar el efecto del 2-acetilcacalol en las diferentes actividades fotosintéticas, se adicionaron concentraciones crecientes del compuesto en las actividades de flujo de electrones basal, fosforilante y desacoplado, además de la síntesis de ATP y se compararon los valores con el control (sin adición del compuesto a caracterizar).

La figura 4.1 muestra que el transporte de electrones fotosintético de H₂O a MV basal, fosforilante y desacoplado fué inhibido por concentraciones crecientes de 2-acetilcacalol, siendo el transporte de electrones desacoplado el más fuertemente inhibido, mostrando una inhibición del 80% a concentraciones de entre 60-100 μ M de 2-acetilcacalol. Estos resultados indican que el 2-acetilcacalol no actúa en su sitio blanco cuando los cloroplastos están en estado energizado, por consiguiente el blanco del 2-acetilcacalol experimenta un cambio conformacional cuando la membrana tilacoidal experimenta energización y desenergización durante la iluminación. Estos resultados muestran que el 2-acetilcacalol se comporta como un típico inhibidor del transporte de electrones, puesto que inhibió el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado. Al comparar la actividad del 2-acetilcacalol con la del 2-acetilacetato de cacalol bajo las mismas condiciones, la tabla I muestra que el 2-acetilcacalol es un inhibidor más potente de la reacción de Hill ya

4.- Resultados y discusión

que a una concentración de 100 μM el 2-acetilcacalol inhibió en un 80% el transporte de electrones desacoplado de H_2O a MV mientras que el 2-acetilacetato de cacalol inhibió esta actividad en solamente un 56%.

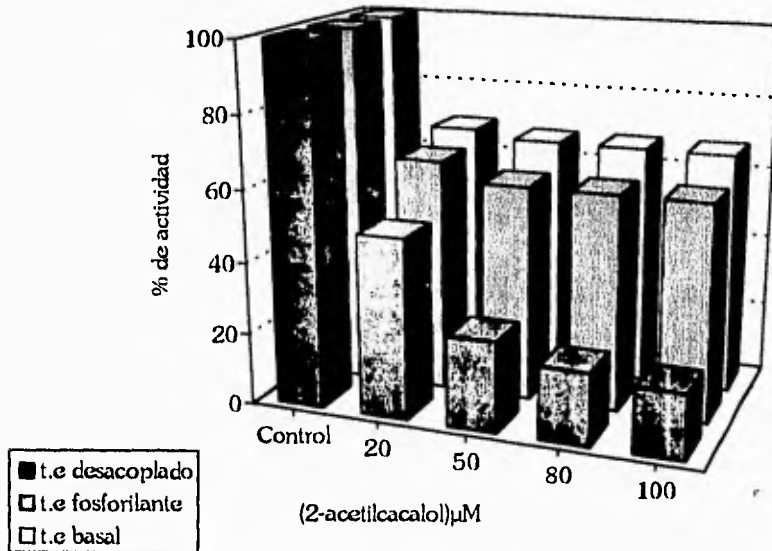


Figura 4.1 Efecto del incremento de la concentración de 2-acetilcacalol en el transporte de electrones de H_2O a MV, basal, fosforilante y desacoplado. Las velocidades del control en $\mu\text{e}^- \text{h}^{-1} \text{mgChl}^{-1}$ para el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado son: 338, 213 y 2500 respectivamente.

Tabla I. Efecto de la concentración de 2-acetilcocalol y 2-acetilacetato de cacalol en el transporte de electrones no cíclico de H₂O a MV basal, fosforilante y desacoplado.

Compuesto	Adición [mM]	% de inhibición		
		Basal	Fosforilante	Desacoplado
Control	0	0	0	0
2-acetilcocalol	20	38	35	50
	50	38	40	75
	80	38	40	80
	100	38	40	80
2-acetilacetato de cacalol	20	13	13	49
	50	13	25	56
	80	13	30	56
	100	13	30	56

II. Síntesis de ATP.

Los reactivos que bloquean el transporte de electrones también inhiben la síntesis de ATP debido a que por efecto de la generación del gradiente electroquímico transmembranal, la fuerza necesaria para la síntesis de ATP es dependiente de los electrones.

Los resultados muestran (figura 4.2) que la síntesis de ATP fue inhibida por la adición de concentraciones crecientes de 2-acetilcocalol. Al comparar la actividad de éste con la del 2-acetilacetato de cacalol, se observa que nuevamente el 2-acetilcocalol es un inhibidor más potente que el 2-acetilacetato de cacalol (tabla II). Debido a que el 2-acetilcocalol inhibió el flujo de electrones, la captación de protones y la síntesis de ATP, estos resultados confirman que actúa como inhibidor de la reacción de Hill.

4.- Resultados y discusión

Tabla II Efecto del 2-acetilcacalol y 2-acetilacetato de cacalol en la síntesis de ATP en presencia de MV a pH 8. La velocidad del control fue de 1592 y 1636 $\mu\text{moles ATP} \cdot \text{mgChl}^{-1}$.

Compuestos	Adición [mM]	síntesis de ATP [%]
Control	0.0	100
2-Acetil cacalol	20	50
	50	47
	80	44
2-Acetil acetato de cacalol	20	65
	50	50
	80	50

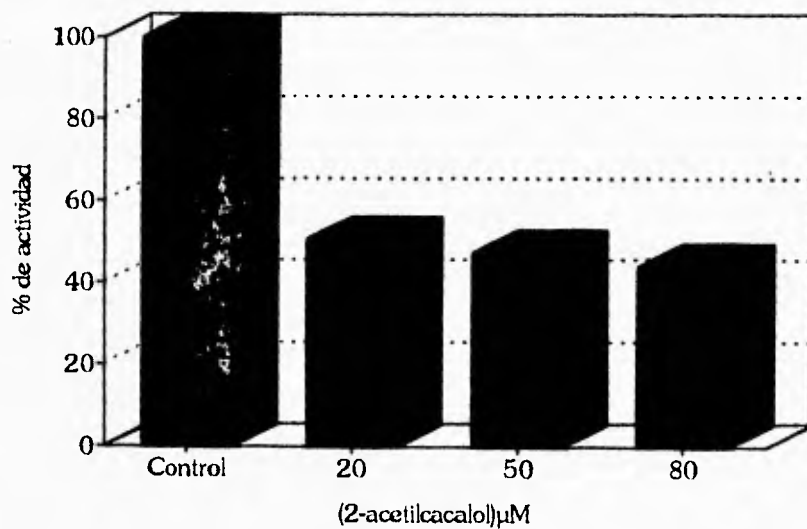


Figura 4.2 Efecto de la concentración de 2-acetilcacaol en la síntesis de ATP en presencia de MV a pH 8.

III. Reacciones parciales del transporte de electrones fotosintético.

Para localizar el sitio de inhibición del 2-acetilcocalol en la cadena rédox del cloroplasto se estudiaron pequeños fragmentos de la cadena fotosintética. Para ello se emplearon diferentes donadores y aceptores de electrones artificiales, así como inhibidores de la cadena rédox.

En primer lugar se estudió el efecto del 2-acetilcocalol en FSI y FSII, comparándolo con el efecto del 2-acetilacetato de cocalol. La actividad en el FSI se determinó empleando el sistema DCPIP/ ascorbato, como donador artificial de electrones a nivel de PQ y MV como aceptor final de electrones. El flujo de electrones provenientes del FSII se impidió por la adición de DCMU 10 μM . (figura 3.8).

La tabla III muestra que la actividad en el FSI no fue afectada por estos compuestos, por lo que el sitio blanco de inhibición de estos derivados del cocalol se localiza en el FSII.

Tabla III. Efecto del 2-acetilcocalol y 2-acetilacetato de cocalol en el transporte de electrones desacoplado en el fotosistema I de DCPIPred a MV. El valor del control fue: 542.85 y 428.57 $\mu\text{e}^{-}\text{h}^{-1} \text{mgChl}^{-1}$ respectivamente.

Compuestos	Adición [mM]	DCPIP - MV [%] actividad
Control	0.0	100
2-Acetil cocalol	20	110
	50	94
	80	105
2-Acetil acetato de cocalol	20	87
	50	106
	80	100

4.- Resultados y discusión

El transporte de electrones fotosintético en el FSII se midió en presencia de DCPIP/ $K_3[Fe(CN)_6]$ como aceptor final de electrones, en este caso el agua es el donador natural de electrones, para inhibir el flujo de electrones hacia el fotosistema I se adicionó DBMIB $1 \mu M$ (figura 3.6).

La figura 4.3 muestra que el 2-acetilcacalol es un inhibidor más potente de H_2O a DCPIP que el 2-acetilacetato de cacalol. A una concentración $80 \mu M$ el 2-acetilcacalol inhibe en un 77 % esta actividad, mientras que el 2-acetilacetato de cacalol inhibe en un 36 % esta actividad.

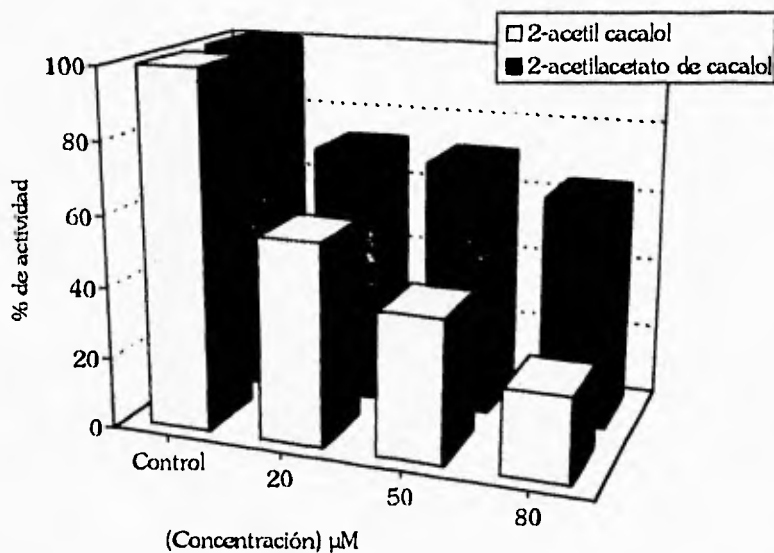


Figura 4.3. Efecto de la concentración de 2-acetilcacalol y 2-acetilacetato de cacalol en el transporte de electrones fotosintético desacoplado no cíclico de H_2O a DCPIP. El valor del control en $\mu e^- \cdot h^{-1} \cdot mgChl^{-1}$ fue 566 y 600 respectivamente

4.- Resultados y discusión

A continuación se estudió el efecto de estos compuestos en un fragmento más pequeño de la cadena rédox (figura 3.6) en el cual el agua es el donador natural de electrones y como aceptor final de electrones a nivel de QA se adicionó SiMo. Para inhibir el flujo de electrones después de QA se utilizó DCMU 10 μM [47]

En la figura 4.4 se muestra el efecto del 2-acetilcocalol en este tramo de la cadena rédox. Se observa que a una concentración 80 μM , el 2-acetilcocalol produce una inhibición del 76% en el transporte electrónico fotosintético de H_2O a SiMo

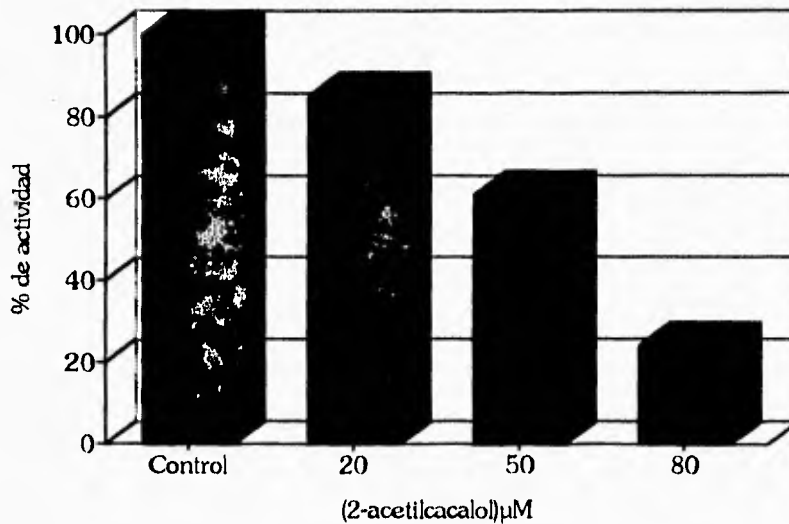


Figura 4.4 Efecto de la concentración del 2-acetilcocalol en el transporte de electrones fotosintético desacoplado de H_2O a SiMo

Para localizar el sitio de inhibición del 2-acetilcocalol en las enzimas redox del FSII, se midió el transporte de electrones desacoplado de DPC a DCPIP (fig 3.9), para este ensayo se utilizaron cloroplastos previamente envenenados con tris 0.8 M pH 8. El tratamiento de los cloroplastos con tris 0.8 M elimina algunos polipéptidos e iones

4.- Resultados y discusión

manganeso que son indispensables para la actividad del complejo de oxidación del agua [52] .

La figura 4.5 muestra que esta parte de la cadena fotosintética no es sensible a la inhibición por 2-acetilcacalol. Estos resultados indican que el sitio de acción del 2-acetilcacalol se localiza en el complejo de oxidación del agua, ya sea en el tetrámero de Mn o en alguno de los polipéptidos necesarios para que este complejo oxide al agua.

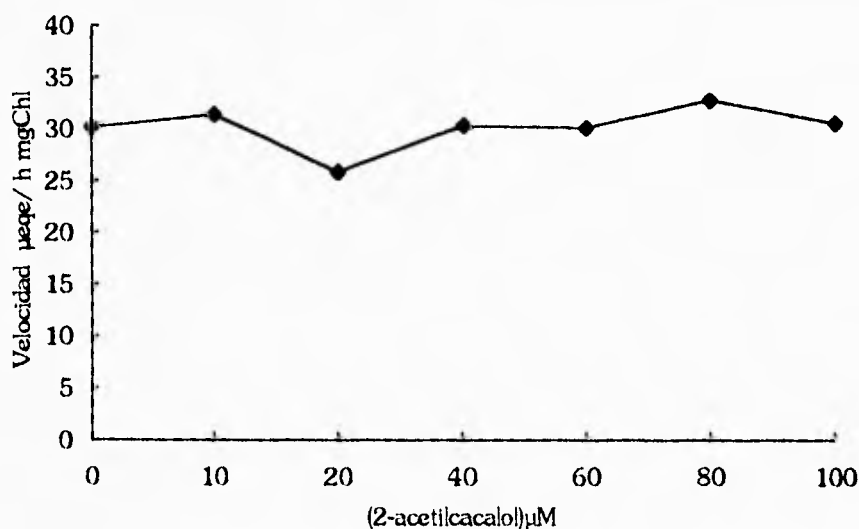


Figura 4.5 Efecto de la concentración del 2-acetilcacalol en el transporte de electrones fotosintético desacoplado de DCP a DCPiP. El valor del control fué de $30.2 \mu\text{eqe}\cdot\text{h}^{-1}\text{mgChl}^{-1}$

Estos resultados, muestran que tanto cacalol [1] como 2-acetilcacalol, muestran un comportamiento muy similar, ya que ambos inhiben el transporte electrónico fotosintético a nivel de la enzima que fotolisa al agua, mientras que los otros derivados: metoxicacalol, acilacetato de cacalol y acetato de cacalol inhiben el flujo

de electrones en alguna de las enzimas rédox que están localizadas en el tramo P680 a QA de la cadena redox del cloroplasto^[1].

B. RESULTADOS ELECTROQUIMICOS

Con objeto de explicar la diferencia que existe entre el sitio de inhibición en la cadena rédox de la fotosíntesis del cacalol y del 2-acetilcacalol con los otros derivados se determinaron por voltametría cíclica los potenciales rédox de estos compuestos. La estructura química del cacalol y sus derivados se muestra en la (figura 3.1). Todos estos compuestos presentan en común el anillo de tetrahidronaftofurano. Ellos difieren con respecto a la presencia o ausencia de un grupo acetilo o metilo en el OH fenólico y/o en la posición 2 del anillo de tetrahidronaftofurano,.

Dado que todas las enzimas rédox que componen la reacción de Hill están localizadas en la fase interna o externa de la membrana tilacoidal (figura 2.6) los sitios activos de estas enzimas pueden estar en contacto con el agua en la fase interna o externa de la membrana. Por estos antecedentes se determinaron los potenciales rédox de estos compuestos tanto en medio prótico, como en medio aprótico.

I. Medio Prótico.

Los voltagramas cíclicos del cacalol y sus derivados en medio prótico se iniciaron en cero voltios vs ESC, haciendo el barrido a 100 mV/s en dirección positiva llegando hasta 1.0 V vs ESC. Los resultados obtenidos indican que solamente el cacalol y el 2-acetilcacalol (figuras 4.6a y 4.7a) mostraron picos de oxidación en 0.60 y 0.65 V vs ESC respectivamente, ambos correspondientes a la oxidación del grupo fenólico de la molécula, ya que los otros derivados descritos en la figura 3.1, los cuales tienen bloqueado el OH fenólico no muestran picos de oxidación. Al invertir la polaridad del electrodo no se observó un pico catódico correspondiente, lo que mostró una reacción irreversible, debido a que el catión formado en 0.6 V vs ESC (esquema 1)^[53], proveniente de la oxidación del grupo fenólico de la molécula, experimentó una reacción química inmediata característica de los fenoles.

4.- Resultados y discusión

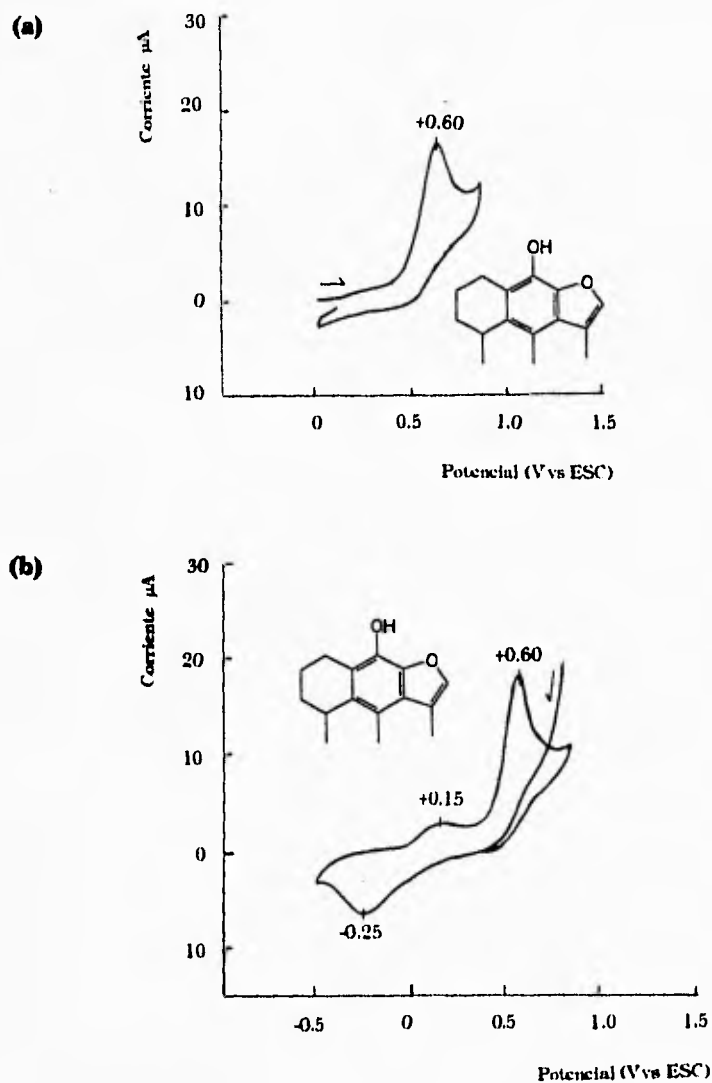


Figura 4.6 Voltagramas cíclicos del cacalol 3mM en una solución de 5 mM MgCl₂, 40 mM KCl y 30 mM Na⁺-tricina (pH=7)/ 30% (v/v) CH₃CN. Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) iniciando el barrido en 0.0 V en dirección positiva b) iniciando el barrido en +0.85 V en dirección negativa.

4.- Resultados y discusión

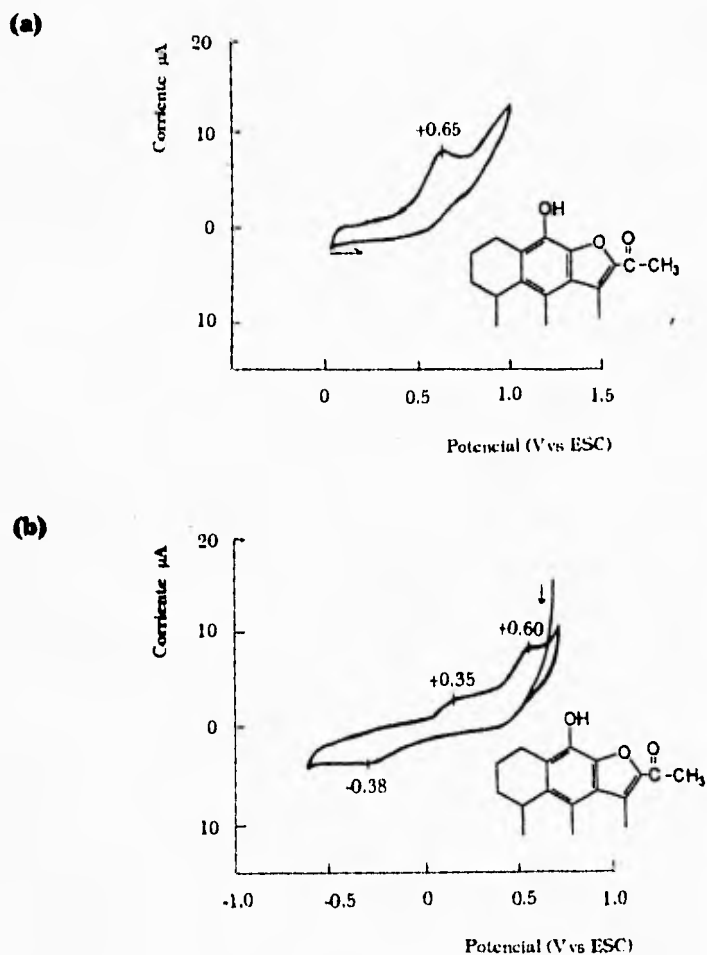
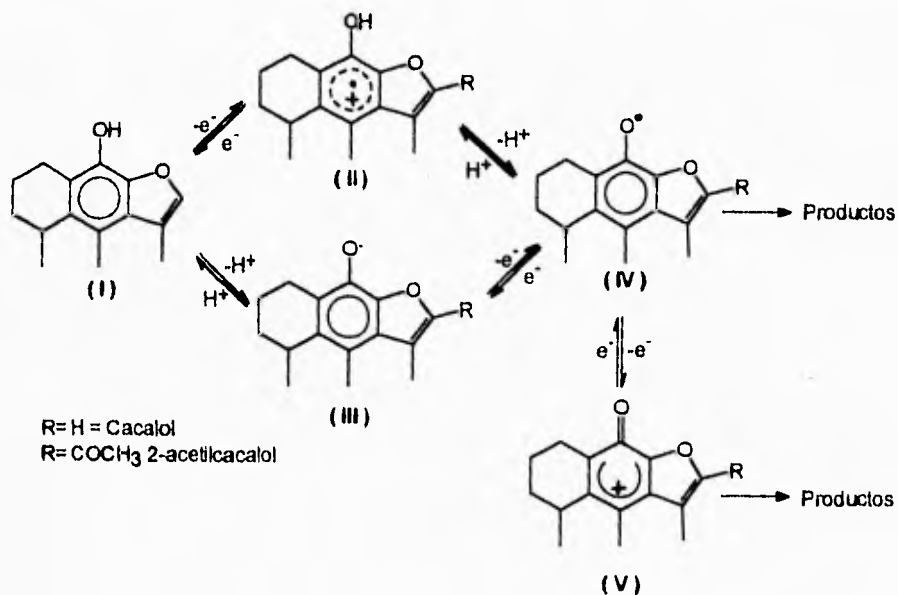
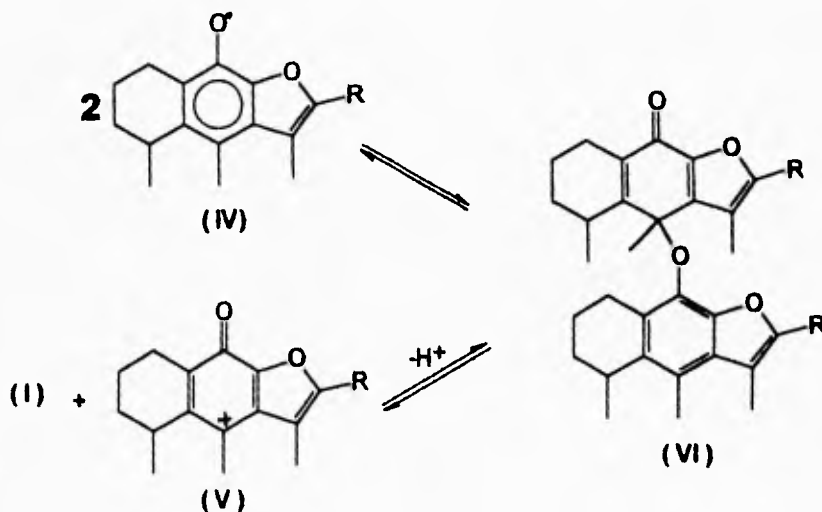


Figura 4.7 Voltagramas cíclicos del 2-acetilcalol 3mM en una solución de 5 mM MgCl₂, 40 mM KCl y 30 mM Na⁺-tricina (pH=7)/ 30% (v/v) CH₃CN. Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Velocidad de barrido 100 mV/s. a) iniciando el barrido en 0.0 V en dirección positiva b) iniciando el barrido en +0.85 V en dirección negativa.

Ha sido descrito en la literatura [53, 54] que en medios poco ácidos o en disolventes apróticos la desprotonación del catión radical (II) ocurre rápidamente al radical neutro (IV), el cual debido a su bajo potencial de oxidación puede ser oxidado al correspondiente ion fenoxonio (V) (esquema 1). Estos productos provenientes de la oxidación del grupo OH fenólico en el cacalol y 2-acetilcacalol, pueden llevar a cabo reacciones químicas de dimerización como las indicadas en el esquema 2.



Esquema 1



Esquema 2

Cuando el voltagrama cíclico del cacalol en medio prótico se inició en 0.85 V vs ESC en dirección negativa bajo las mismas condiciones, se observó un pico catódico en -0.25 V vs ESC acoplado a un pico anódico en 0.15 V (figura 4.6b). Al hacer barridos sucesivos de potencial entre 0.85 V y -0.5 V vs ESC se encontró que el i_{pa} y el i_{pc} aumentaban, estos resultados sugieren la posible formación de un oligomero ó polímero conductor del cacalol. Recientemente se ha reportado que la electropolimerización de fenoles conduce a la formación de películas poliméricas conductoras ó semiconductoras, así como también a la formación de compuestos diméricos electroactivos ^[55]

Cuando la electro-oxidación del cacalol se realizó en medio prótico a un potencial controlado de 0.52 V vs ESC, se observó que sobre la superficie del electrodo se depositaba un compuesto de color amarillo que impedía el paso de la corriente. El espectro de RMN-¹H de este compuesto mostró la presencia de un polímero. En el espectro de RMN-¹H se observan bandas anchas, características de este tipo de

4.- Resultados y discusión

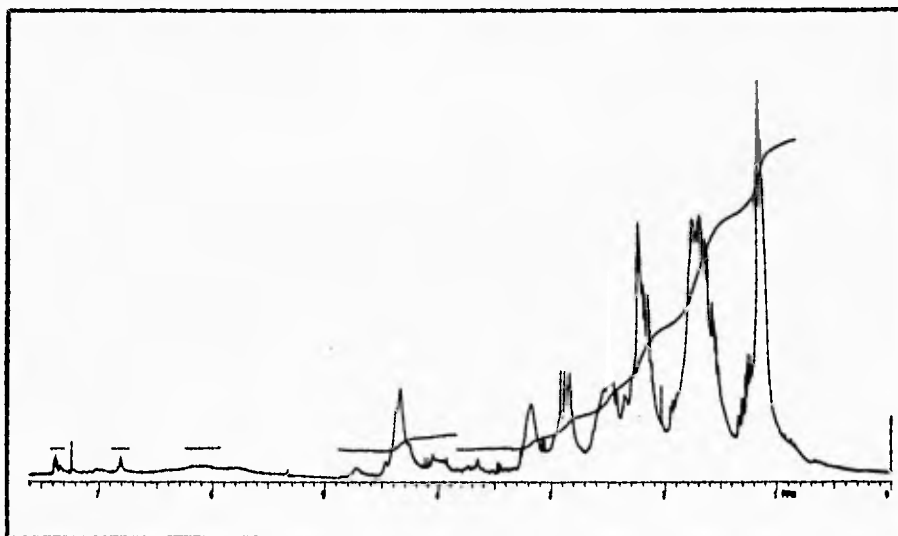
compuestos en: 1.18(m), 1.72(m), 2.22(m), 2.52(m), 2.85(m), 3.18(m), 4.32(m), 6.81(s, ancho) y 7.48(s, ancho) (espectro 1), sin embargo, la estructura de este polímero no fue identificada. Al comparar el espectro de este polímero con el espectro del cacalol (espectro 2, tabla IV) se observa que las bandas anchas observadas para el polímero aparecen en los mismos desplazamientos químicos que los observados para el cacalol, sin embargo se observa que en el espectro 1, el multiplete en 7.37 ppm (1H) correspondiente al protón furánico (H-7), es más pequeño que el observado en el cacalol, estos resultados muestran la evidencia de que la polimerización del cacalol en el medio prótico ocurre por el lado del anillo furánico.

Cuando el voltagrama cíclico del 2-acetilcacalol se hizo iniciando el barrido en 0.85 V vs ESC y haciendo el barrido en dirección negativa, se observó un pico catódico en -0.38 V vs ESC acoplado a un pico anódico en 0.35 V vs ESC (figura 4.7b), sin embargo, al hacer ciclados continuos no se observó que la cantidad de corriente catódica y/o anódica aumentara. Estos resultados mostraron otra evidencia de que la polimerización en el cacalol ocurrió por el lado del furano, ya que en el 2-acetilcacalol el cual está acetilado en la posición 2, no se observó la formación de una película conductora.

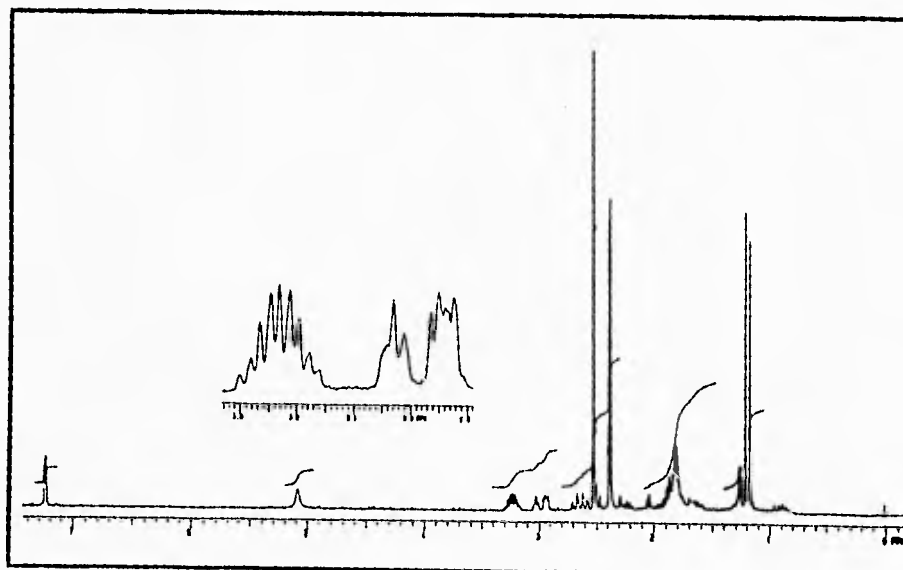
Cuando los voltagramas del cacalol y sus derivados se corrieron en medio prótico e iniciando el barrido en cero voltios hacia dirección negativa, en ninguno de los compuestos se observaron picos catódicos, mostrando que no experimentan reacción de reducción en el rango de potencial de 0 a -1.8 V vs ESC.

En la tabla V se muestran los valores de potencial de pico anódico y potencial de pico catódico (E_{pa} y E_{pc}) en V vs ESC obtenidos para el cacalol y sus derivados en medio prótico, así como sus valores correspondientes a ENH.

4.-Resultados y discusión



ESPECTRO 1. Espectro de H¹-RMN del oligomero proveniente de la electro-oxidación del cacalol en CDCl₃



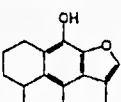
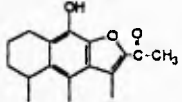
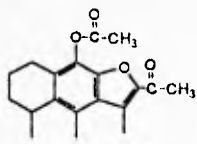
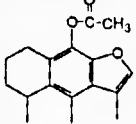
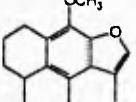
ESPECTRO 2. Espectro de H¹-RMN del cacalol en CDCl₃

Tabla IV. Constantes espectroscópicas para el cacalol

CACALOL			
Me-12	$\delta=1.17$ ppm	(d) $J=7$ Hz	(3H)
Me-11	$\delta=1.52$ ppm	(s)	(3H)
Me-10	$\delta=2.35$ ppm	(m)	(3H)
OH	$\delta=5.10$ ppm	(s)	(1H)
H-2	$\delta=7.29$ ppm	(m)	(1H)
H-5	$\delta=3.20$ ppm	(sextuplete)	(1H)
H-8	$\delta=2.65$ ppm	(m)	(2H)
H-6 y H-7	$\delta=1.82$ ppm	(m)	(4H)

4.- Resultados y discusión

Tabla V. Datos de voltametría cíclica de cacalol, metilcacalol, acetato de cacalol, acetato de 2-acetilcacalol y 2-acetilcacalol. Concentración 3mM en medio prótico de 30% CH₃CN(V/V)-70% de un buffer pH 7 de 5mM MgCl₂, 40mM KCl y 30mM Na⁺-tricina. Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Velocidad de barrido 100mV/s

Compuestos	Epa		Epc	
	Potencial de pico anódico		Potencial de pico catódico	
	Vvs ESC	Vvs ENB	Vvs ESC	Vvs ENB
Cacalol 	+0.60 +0.15	+0.824 +0.394	-0.25	-0.006
2-acetilcacalol 	+0.65 +0.25	+0.894 +0.494	-0.38	-0.136
Acetato de 2-acetilcacalol 	—	—	—	—
Acetato de cacalol 	—	—	—	—
Metilcacalol 	—	—	—	—

II. Medio Aprótico.

Los voltogramas cíclicos del cacalol y sus derivados en medio aprótico se corrieron en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN , iniciándose el barrido en cero voltios a una velocidad de 100 mV/s en dirección positiva hasta 2.5 V vs ESC, llegando hasta -1.5 V vs ESC y regresando a cero.

a) Cacalol

El voltagrama cíclico del cacalol (figura 4.8) muestra dos picos anódicos en 1.1 V y 2.1 V vs ESC, y un pico de reducción en -1.0 V durante el barrido de regreso, llegándose hasta -1.5 V vs ESC. Al cambiar la polaridad del electrodo se observó un pico anódico pequeño en -0.15 V vs ESC.

Cuando los voltogramas cíclicos del furano y fenol se corrieron en este mismo medio, bajo las mismas condiciones, se observó que el fenol muestra un pico de oxidación en 1.64 V (figura 4.9) mientras que el furano mostró un pico de oxidación en 1.98 V vs ESC (figura 4.10), en ambos casos se observa una reacción irreversible, ya que al invertir la polaridad del electrodo no observamos un pico catódico correspondiente. Los resultados muestran que la oxidación del grupo OH fenólico es más fácil que la del anillo furánico. Estos resultados sugieren que el pico anódico en 1.1 V vs ESC (figura 4.8) proviene de la oxidación del grupo fenólico del cacalol (esquema 1), el catión fenoxonio (V) formado, puede llevar a cabo las mismas reacciones de dimerización que en el medio prótico (esquema 2). No obstante, dada la alta reactividad del catión fenoxonio, este puede reaccionar con el acetonitrilo del medio dando el compuesto heterocíclico (VII) (esquema 3)⁽⁵³⁾. Se requiere estudiar más completamente esta estructura.

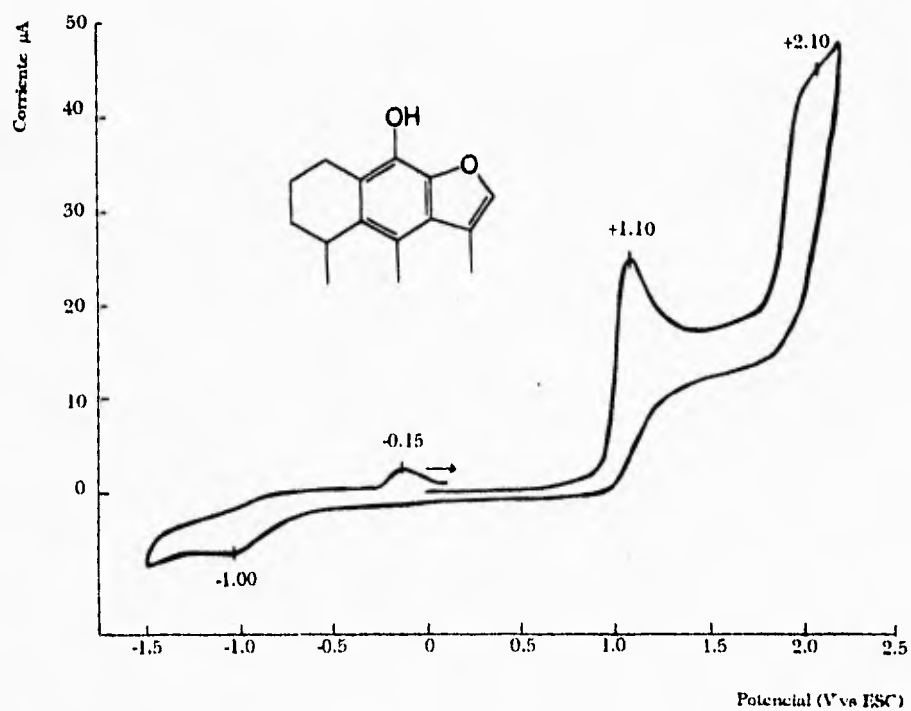


Figura 4.8 Voltograma cíclico de cacalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

4.- Resultados y discusión

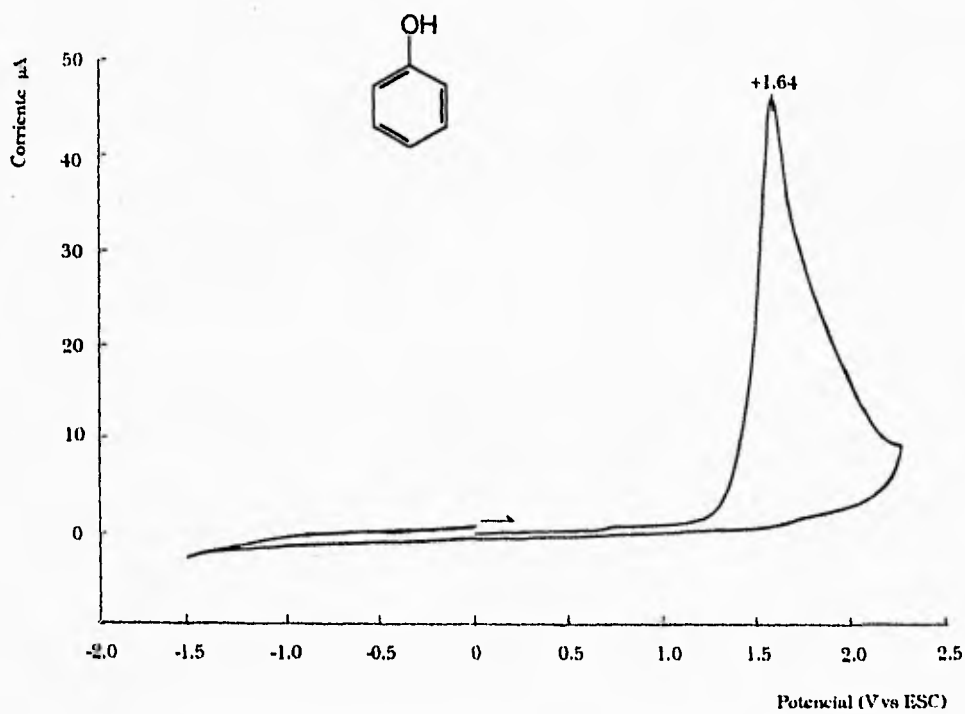


Figura 4.9 Voltagrama cíclico de fenol 6 mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

4.- Resultados y discusión

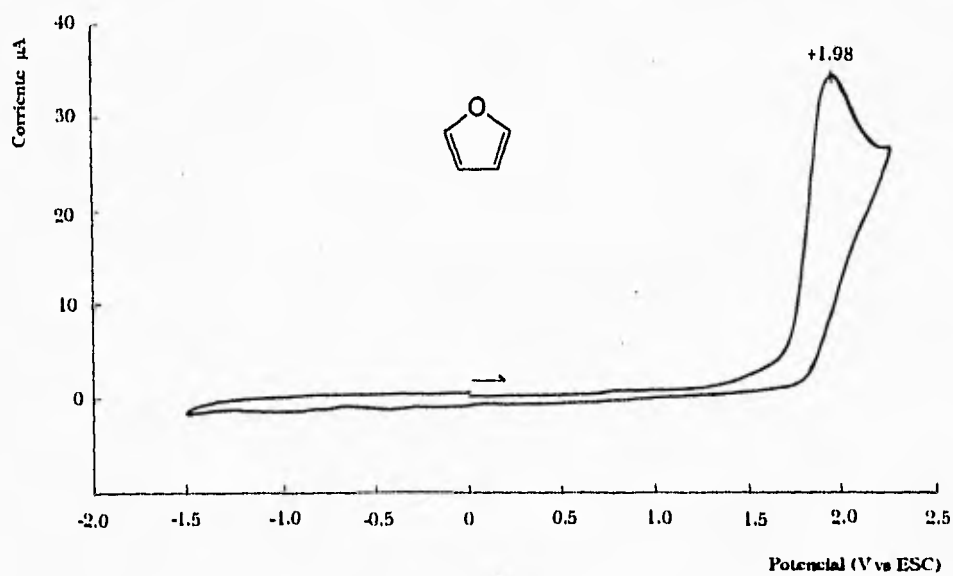
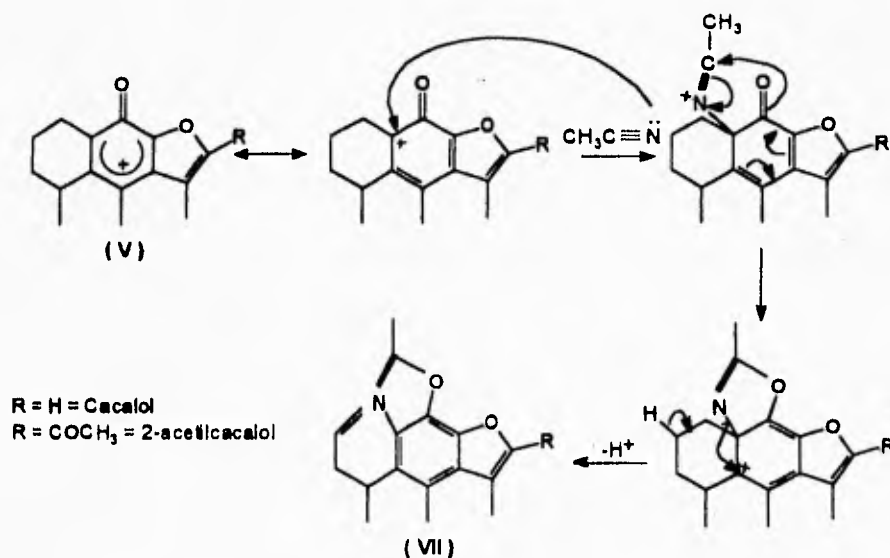


Figura 4.10 Voltograma cíclico de furano 3 mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.



Esquema 3

Evidencias de que el ión fenoxonio (V) es el producto de oxidación del cacalol en 1.1 V vs ESC, se han encontrado por el estudio de los productos de electro-oxidación del cacalol a potencial controlado de 1.2 V vs ESC en medio de LiClO₄ 0.2 M en metanol. El valor del potencial usado para la electrólisis a potencial controlado, se obtuvo de los datos de la voltametría cíclica del cacalol en este medio (figura 4.11). Como resultado de un ataque nucleofílico del metanol en posición 4 del catión fenoxonio (V) (esquema 4) se produjo el compuesto (VIII) (espectro 3, tabla VI)

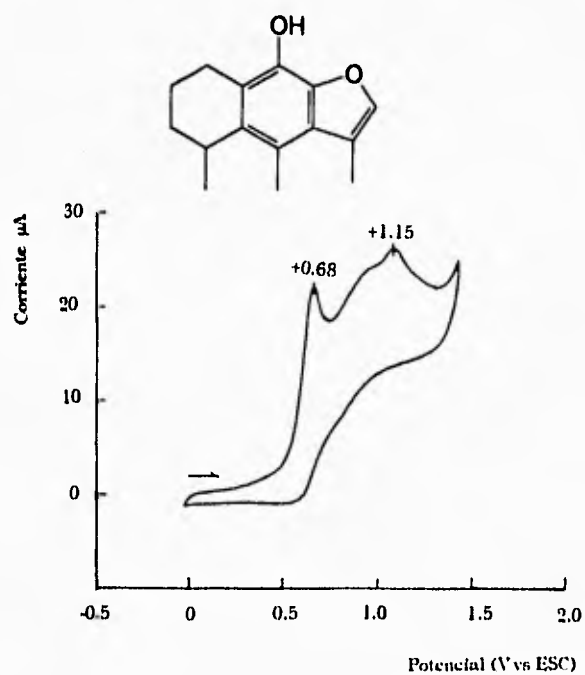
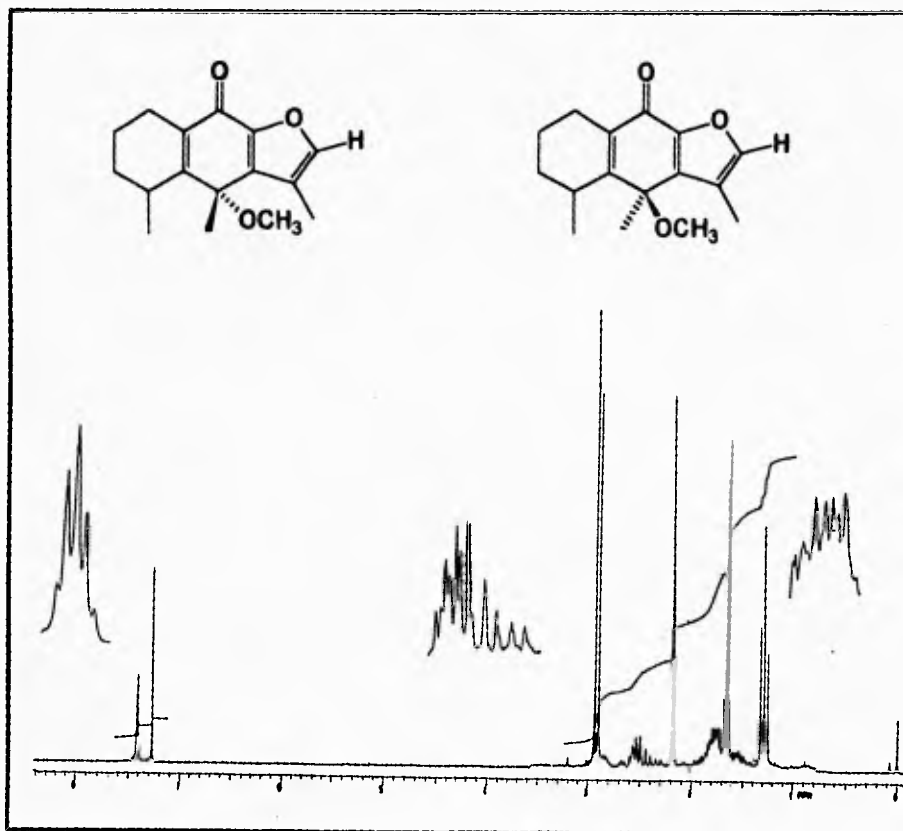


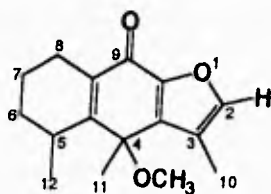
Figura 4.11 Voltograma cíclico de cacalol 3mM en una solución de LiClO_4 0.2 M en CH_3OH . Electrodo de trabajo C (glaseado). Referencia ESC. Potencial inicial 0.0 V vs ESC, haciendo el barrido a 100mV/s en dirección positiva.



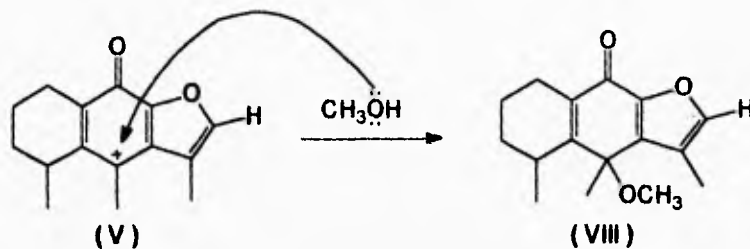
ESPECTRO 3. Espectro de H¹-RMN de la 4-metilcalona en CDCl₃

4.-Resultados y discusión

Tabla VI. Constantes espectroscópicas de la 4-metilcacaalona



Me-12	$\delta=1.26$ ppm	(d) $J=7$ Hz	(3H)
Me-12'	$\delta=1.31$ ppm	(d) $J=7$ Hz	(3H)
Me-11	$\delta=1.62$ ppm	(s)	(3H)
Me-11'	$\delta=1.67$ ppm	(s)	(3H)
Me-10	$\delta=2.18$ ppm	(m)	(3H)
MeO	$\delta=2.90$ ppm	(s)	(3H)
MeO'	$\delta=2.44$ ppm	(s)	(3H)
H-2	$\delta=7.40$ ppm	(m)	(1H)
H-5	$\delta=2.54$ ppm	(sextuplete)	(1H)
H-5'	$\delta=2.46$ ppm	(sextuplete)	(1H)
H-8	$\delta=1.75$ ppm	(m)	(2H)
H-6 y H-7	$\delta=1.60$ ppm	(m)	(4H)




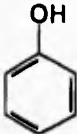
Esquema 4

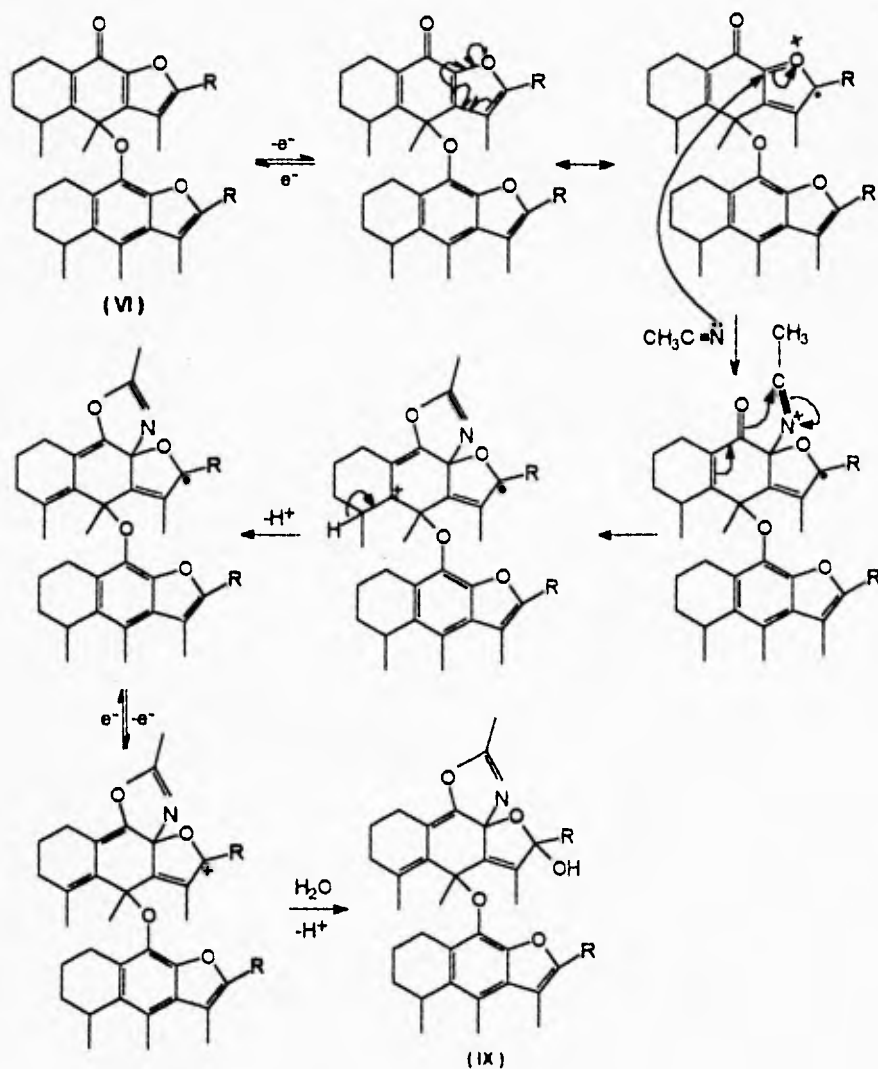
Al comparar los potenciales de oxidación del furano y del fenol observamos que la oxidación del furano ocurre a un potencial mayor que la oxidación del fenol (tabla VII). Estos resultados sugieren que el pico anódico en 2.1 V vs ESC en el voltograma cíclico del cacalol (figura 4.8) proviene de la oxidación del anillo furánico, al invertir la polaridad del electrodo no se observó un pico catódico correspondiente, lo que muestra una reacción irreversible debido a que el producto proveniente de la oxidación del cacalol en 2.1 V vs ESC puede llevar a cabo una reacción química, ya sea con el disolvente o con el agua, dado que el acetonitrilo es un disolvente muy higroscópico y puede tomar humedad del ambiente.

Cuando el producto proveniente de la oxidación del cacalol en 1.1 V vs ESC es el dímero (VI), la posterior oxidación del anillo furánico en 2.1 V nos proporcionaría los compuestos (IX) (esquema 5) y/o (X). (esquema 6)

4.- Resultados y discusión

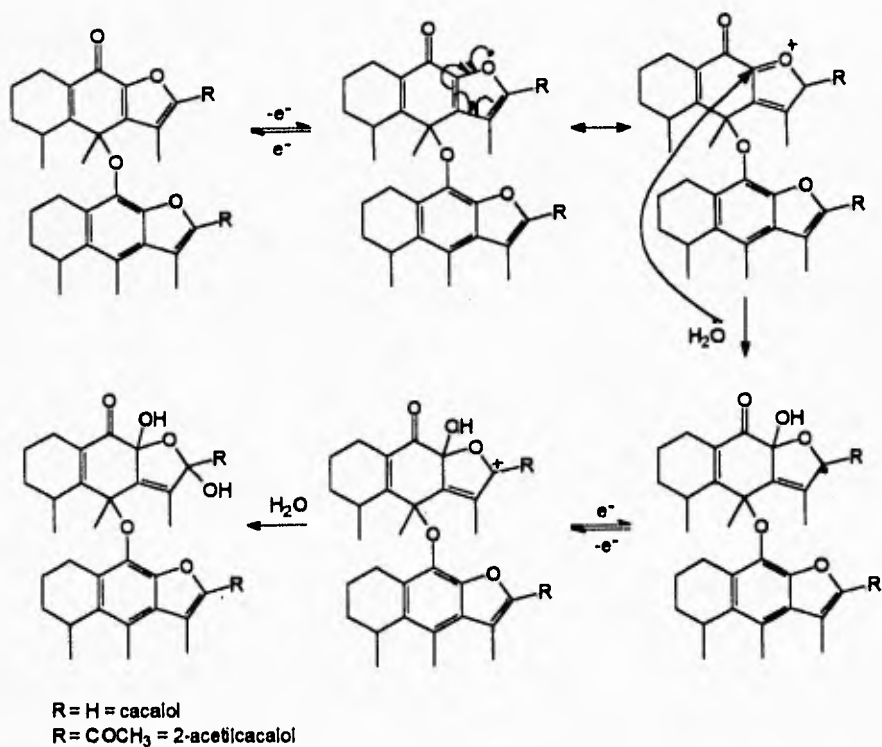
Tabla VII. Datos de voltametría cíclica de furano 3 mM y fenol 6 mM en medio aprótico de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Velocidad de barrido 100 mV/s

compuestos	Epa potencial de pico anódico		Epc potencial de pico catódico	
	V vs ESC	V vs ENH	V vs ESC	V vs ENH
Furano 	+1.98	2.224	—	—
Fenol 	+1.64	+1.884	—	—



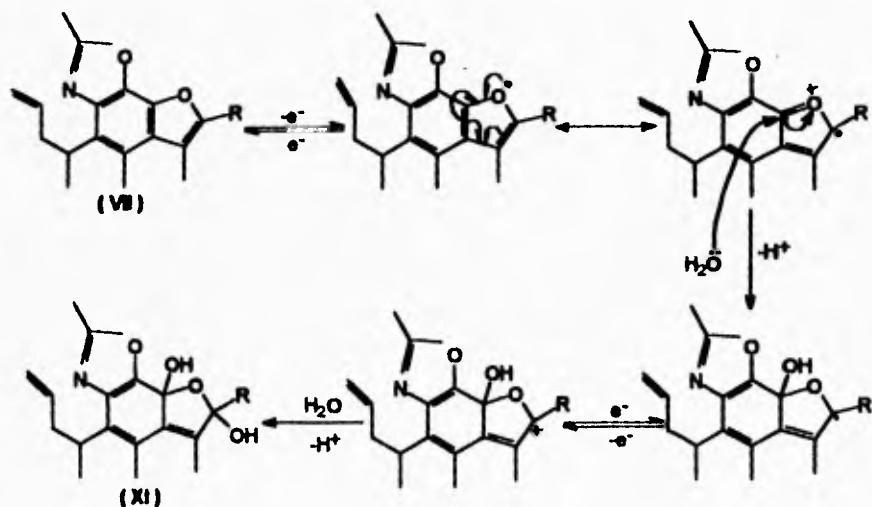
R = H = Cacalol
 R = COCH_3 = 2-aceticacalol

Esquema 5



Esquema 6

Si el producto de oxidación en 1.1 V vs ESC es el compuesto heterocíclico (VII), la oxidación del furano en 2.3 V vs ESC nos daría el compuesto (XI) (esquema 7)



R = H = Cacalol
R = COCH₃ = 2-acetilcacalol

Esquema 7

De estos resultados puede deducirse que el sistema del cacalol es electroquímicamente muy reactivo y puede experimentar gran cantidad de reacciones.

b) 2-acetilcacalol

El voltograma cíclico del 2-acetilcacalol (figura 4.12) muestra tres picos anódicos en 1.2, 1.4 y 2.3 V vs ESC. Los picos anódicos en 1.2 y 1.4 V vs ESC provienen de la oxidación irreversible de este compuesto por la pérdida de dos electrones al correspondiente ión fenoxonio (Vb). El pico anódico en 2.3 V vs ESC comprende la

4.- Resultados y discusión

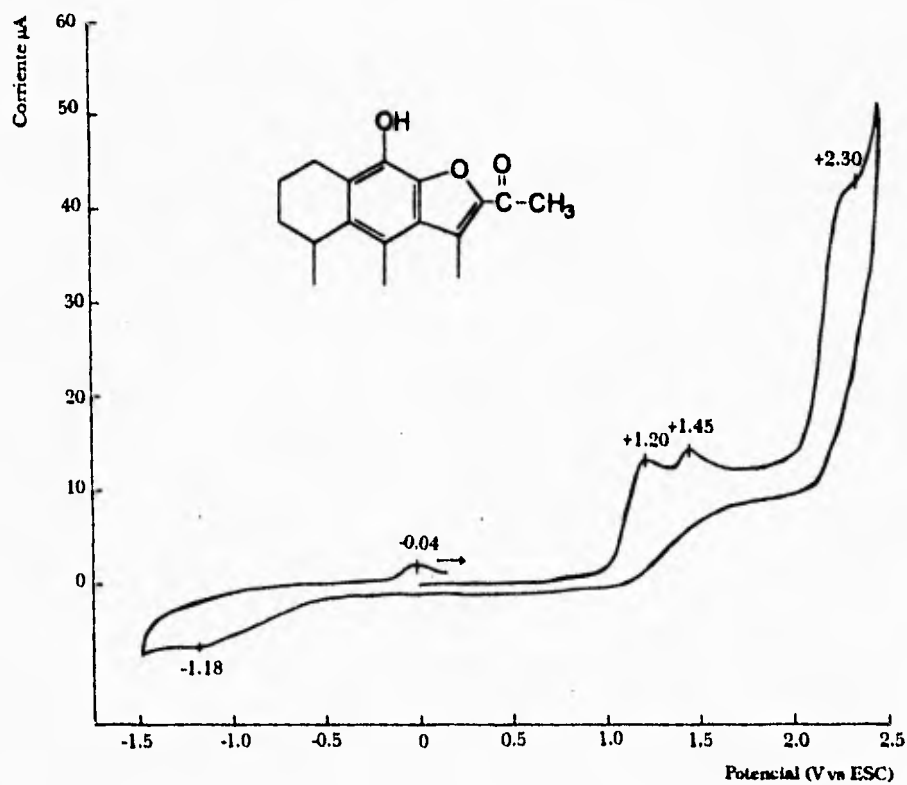


Figura 4.12 Voltograma cíclico de 2-acetilcalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

oxidación del anillo furánico en el 2-acetilcocalol. Las reacciones de oxidación que experimenta el 2-acetilcocalol son las mismas que en el cocalol, sin embargo, observamos que los potenciales de oxidación de este compuesto son más elevados que los potenciales correspondiente a la oxidación del cocalol en el mismo medio aprótico. El grupo acetilo en la posición 2 en el 2-acetilcocalol ejerce un fuerte efecto atractor de electrones lo que provoca que la pérdida de electrones para la oxidación del OH fenólico y del anillo de furano sea más difícil requiriéndose suministrar una mayor cantidad de energía que la necesaria para la correspondiente oxidación del cocalol. (1V= 23Kcal). Esto nos explica el hecho que los potenciales de oxidación en el 2-acetilcocalol sean más elevados que en cocalol mismo.

Solo en el caso del cocalol y del 2-acetilcocalol , se observa que durante el primer barrido de regreso hacia potenciales negativos aparecen unos picos catódicos en -1.0 V y -1.2 V vs ESC respectivamente. Al invertir la polaridad del electrodo se encontró que en ambos casos aparece un pequeño pico anódico en -0.15 V vs ESC, para el cocalol, y en -0.10 V vs ESC para el 2-acetilcocalol. Esto nos indica que la oxidación de estos compuestos a dado lugar a sustancias que se reducen irreversiblemente.

c) Acetato de cocalol

El voltograma cíclico del acetato de cocalol en medio aprótico (figura 4.13) muestra dos picos anódicos en 1.5 V y 1.95 V vs ESC. Electroquímicamente la oxidación anódica en 1.5 V vs ESC del acetato de cocalol produce el catión fenoxonio (V) ⁽⁵⁶⁾. El mecanismo para la formación de este catión involucra la pérdida sucesiva de dos electrones seguido de un paso químico en el cual hay ruptura de la unión O-C en el ester, liberándose el ión acetilo, el cual puede estabilizarse por resonancia o reaccionar con el acetonitrilo del medio (esquema 8)

4.- Resultados y discusión

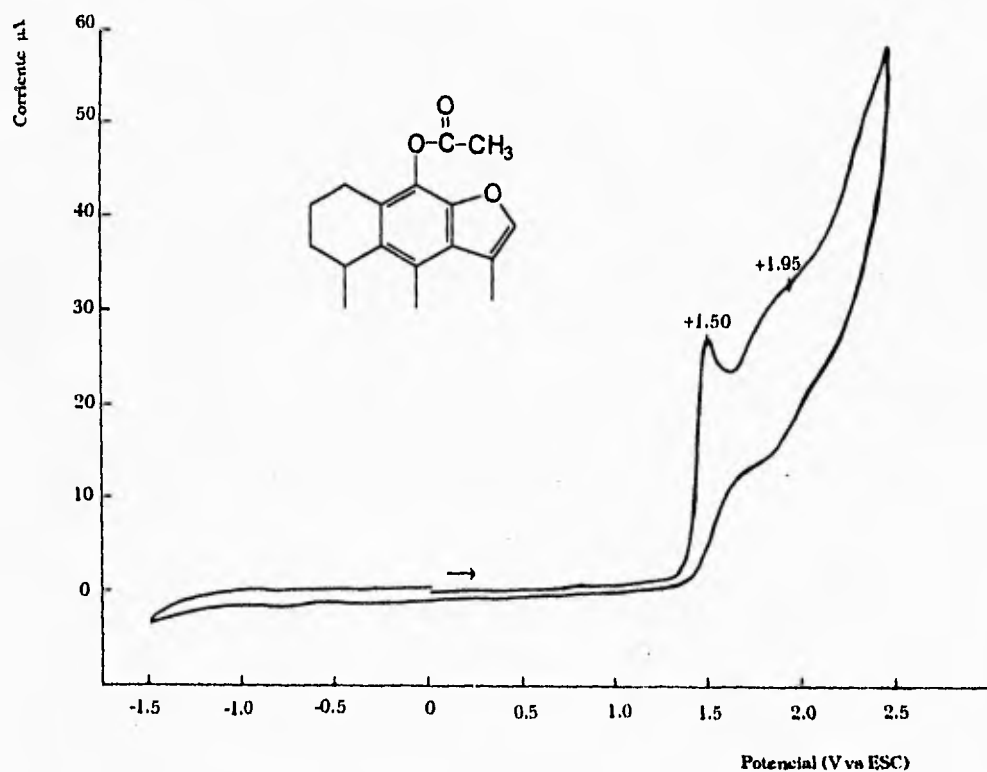
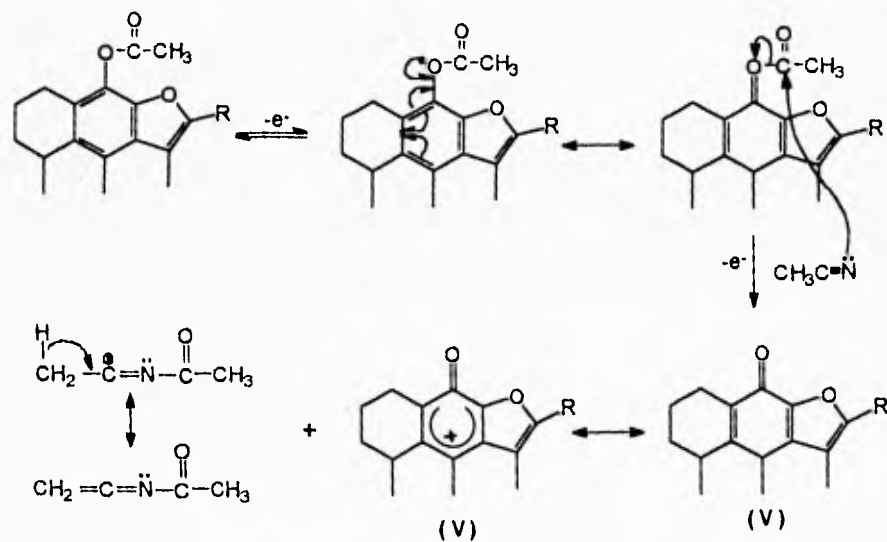


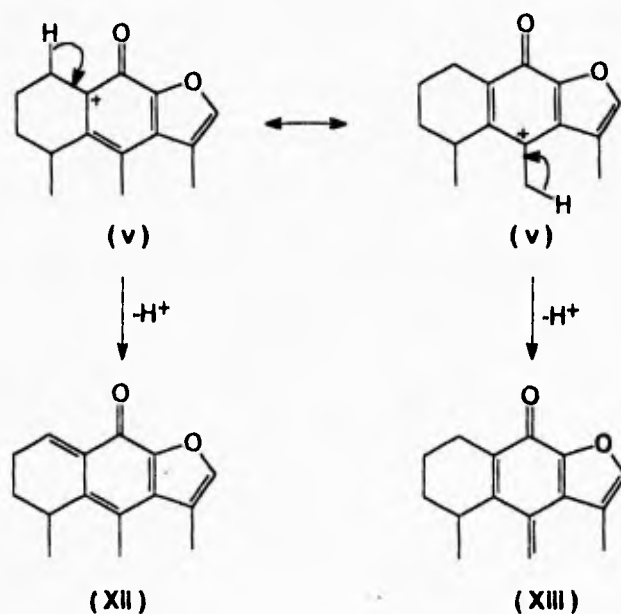
Figura 4.13 Voltagrama cíclico de Acetato de cacalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

4.- Resultados y discusión



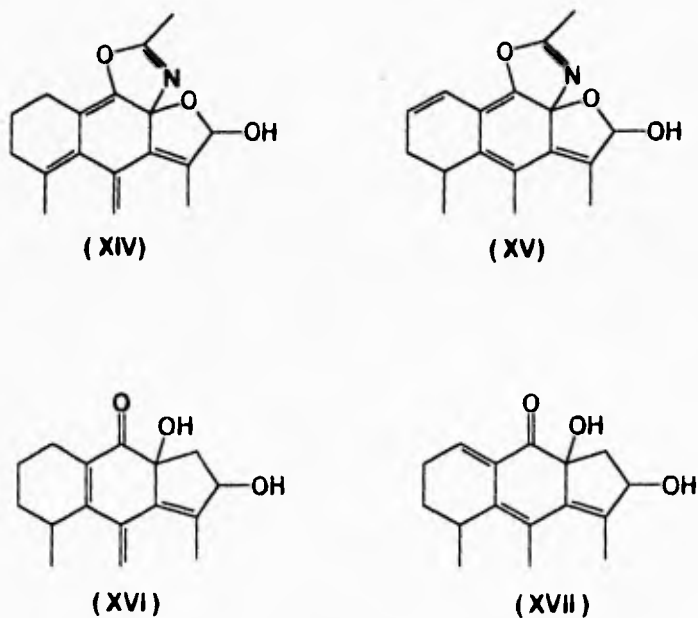
Esquema 8

En el medio electrolítico, dado que no hay entidades que puedan actuar como nucleófilos, el catión fenoxónio (V) puede reaccionar con el acetonitrilo del medio dando el compuesto heterocíclico (VII) (esquema 3), o puede perderse el protón adyacente al carbocatión dando los compuestos (XII) y/o (XIII) (esquema 9)



Esquema 9

La posterior oxidación del anillo furánico, en 1.95 V vs ESC, de los compuestos XII y XIII proporcionaría los compuestos XIV, XV, XVI y XVII (esquema 10) El mecanismo para la formación de estos últimos es el mismo que el mostrado en los esquemas 6 y 7.



Esquema 10

d) 2-Acetilacetato de cacalol

El voltograma cíclico del 2-acetilacetato de cacalol en medio aprótico (figura 4.14) muestra dos picos anódicos en 1.74 y 2.3 V vs ESC correspondientes a la formación del catión fenoxonio del acetilacetato de cacalol y a la oxidación del anillo furánico respectivamente. Ambas reacciones de oxidación se llevan a cabo por el mismo mecanismo propuesto para el acetato de cacalol. Nuevamente observamos que el grupo acetilo en posición 2 provoca que los potenciales de oxidación para el acetilacetato de cacalol sean más anódicos que los obtenidos para el acetato de cacalol, por el efecto fuertemente atractor de electrones del grupo acetilo.

4.- Resultados y discusión

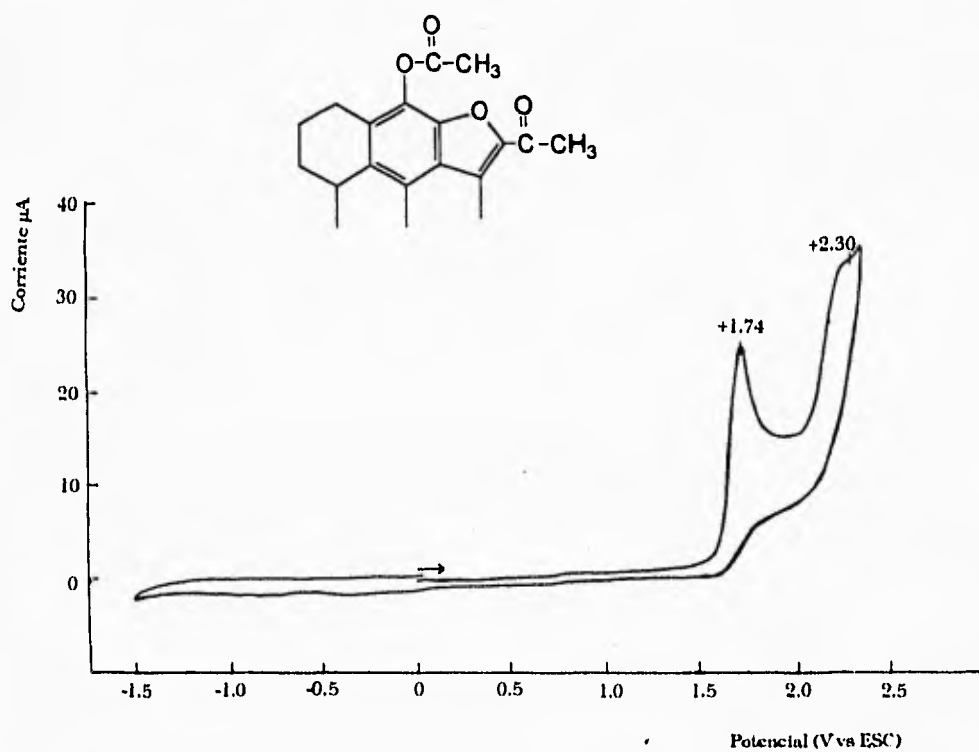
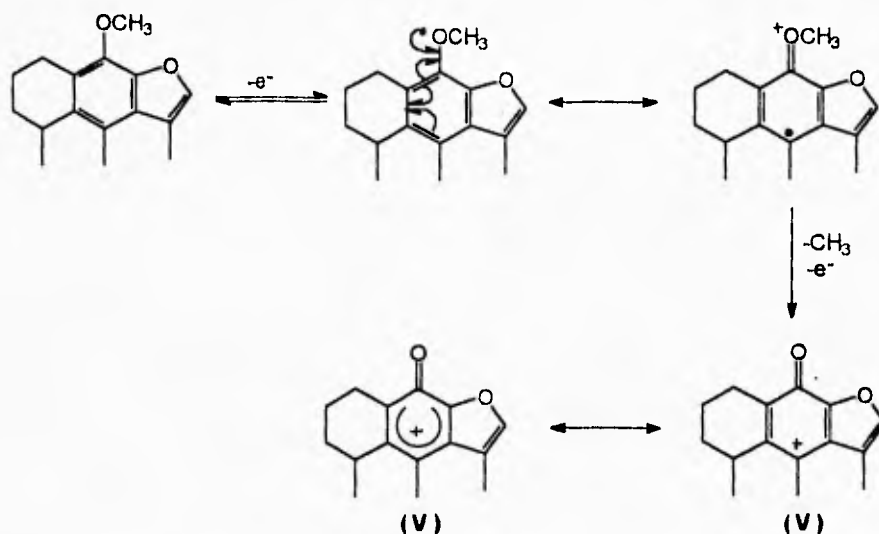


Figura 4.14 Voltagrama cíclico de Acetato de 2-acetilcalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

e) Metilcacalol

El voltograma cíclico del metilcacalol en medio aprótico (figura 4.15) muestra dos picos anódicos en 1.17 y 1.28 V vs ESC. A estos potenciales el grupo metoxi-fenol se oxida irreversiblemente, por pérdida de dos electrones, al correspondiente catión fenoxonio (V) [57,58,59], por un mecanismo similar a la oxidación que ocurre en acetato de cacalol y 2-acetilacetato de cacalol. El mecanismo propuesto para la oxidación del metilcacalol se muestra en el esquema 10.



Esquema 10

El catión fenoxonio proveniente de la oxidación del metilcacalol puede experimentar las mismas reacciones químicas que los otros derivados.

4.- Resultados y discusión

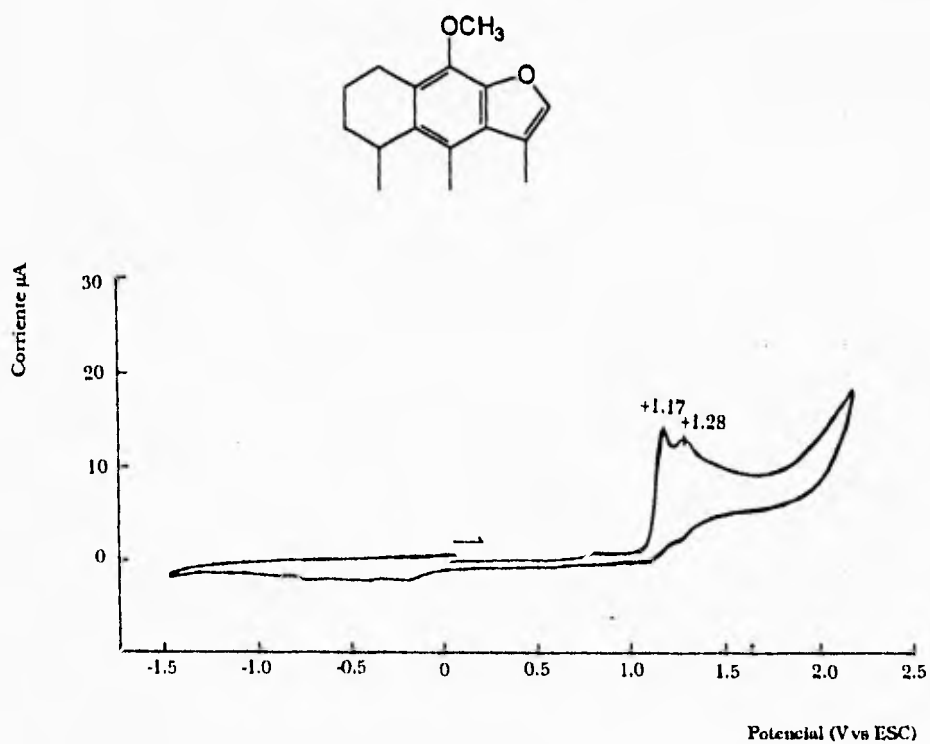


Figura 4.15 Voltagrama cíclico de Metilcalalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

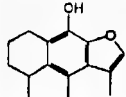
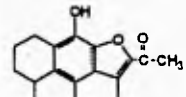
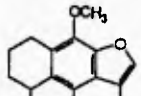
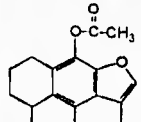
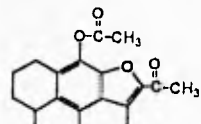
Al comparar los voltogramas cíclicos del cacalol y sus derivados, observamos que todos estos compuestos, a excepción del metoxicacalol muestran un comportamiento muy similar, ya que en todos los casos se obtuvieron picos anódicos en el rango de 1.1 a 1.7 V vs ESC correspondientes a la formación del catión fenoxonio (V) y otros picos a potenciales más anódicos en el rango de 1.95 a 2.3 correspondientes a la oxidación del anillo furánico. En la (tabla VIII) se muestran seleccionando , los potenciales de oxidación de la parte fenólica de la molécula y del anillo furánico.

Con el propósito de distinguir la diferente electroactividad de los sistemas fenólico y furánico en el cacalol y sus derivados, se hicieron los voltogramas cíclicos de estos compuestos en medio aprótico, haciendo el barrido a 100 mV/s hacia positivo e invirtiendo la polaridad del electrodo en 2.0V vs ESC, encontrándose que en todos estos compuestos aparecieron , a potenciales negativos, picos anódicos y catódicos (figuras 4.16 a 4.20). En la tabla IX se muestran los Epa y los Epc observados para el cacalol y sus derivados en V vs ESC, así como sus valores correspondientes a ENH . Estos resultados sugieren que cuando se llega a potenciales que afectan unicamente al sistema fenólico se producen intermediarios facilmente reducibles irreversiblemente y solo en el caso del cacalol se presenta un sistema reversible en -0.35 V y -0.15 V vs ESC. La figura 4.21 muestra claramente que el pico catódico en -0.35 V y el correspondiente pico anódico en +0.10 V vs ESC provienen de la formación del catión fenoxonio proveniente de la oxidación del cacalol en 1.10 V. Al hacer barridos sucesivos de potencial entre -0.5 V y 2.0 V vs ESC se encontró que los i_{pa} y i_{pc} aumentaban haciendo evidente la formación de un oligómero conductor del cacalol, lo que muestra un comportamiento característico de los fenoles^[53].

Como se mencionó anteriormente, en el medio prótico unicamente el cacalol y 2-acetilcacalol, mostraron picos anódicos correspondientes a la oxidación del grupo fenólico. Cuando los voltogramas cíclicos del furano y del fenol se hicieron en este mismo medio, observamos que unicamente el fenol mostró un pico de oxidación en 1.0 V vs ESC (figura 4.22), estos resultados confirman que el grupo OH fenólico en las moléculas del cacalol y del 2-acetilcacalol es el responsable de la reacción de oxidación observada. Los potenciales de oxidación en 0.6 V y 0.65 V vs ESC observados en el cacalol y en el 2-acetilcacalol respectivamente se encuentran a

4.- Resultados y discusión

Tabla VIII. Datos de voltametría cíclica de cacalol, metilcacalol, acetato de cacalol, acetato de 2-acetilcacalol y 2-acetilcacalol. Concentración 3 mM en medio aprótico de nBu₄NBF₄ 0.1 M en CH₃CN. Electrodo de trabajo platino. El barrido se incló en 0.0 V a 100mV/s dirección positiva hasta 2.5 V vs ESC, regresando hasta -1.5 V vs ESC y finalizando en 0.0 V vs ESC.

Compuestos	Sistema fenólico Potencial de pico anódico Epa		Sistema furánico Potencial de pico anódico Epa	
	V vs ESC	V vs ENH	V vs ESC	V vs ENH
Cacalol 	+1.10	+1.344	+2.10	+2.344
2-acetilcacalol 	+1.20 +1.43	+1.444 +1.674	+2.30	+2.544
Metilcacalol 	+1.17 +1.28	+1.414 +1.524		
Acetato de cacalol 	+1.50	+1.744	+1.95	+2.194
Acetato de 2-acetilcacalol 	+1.75	+1.994	+2.30	+2.544

4.- Resultados y discusión

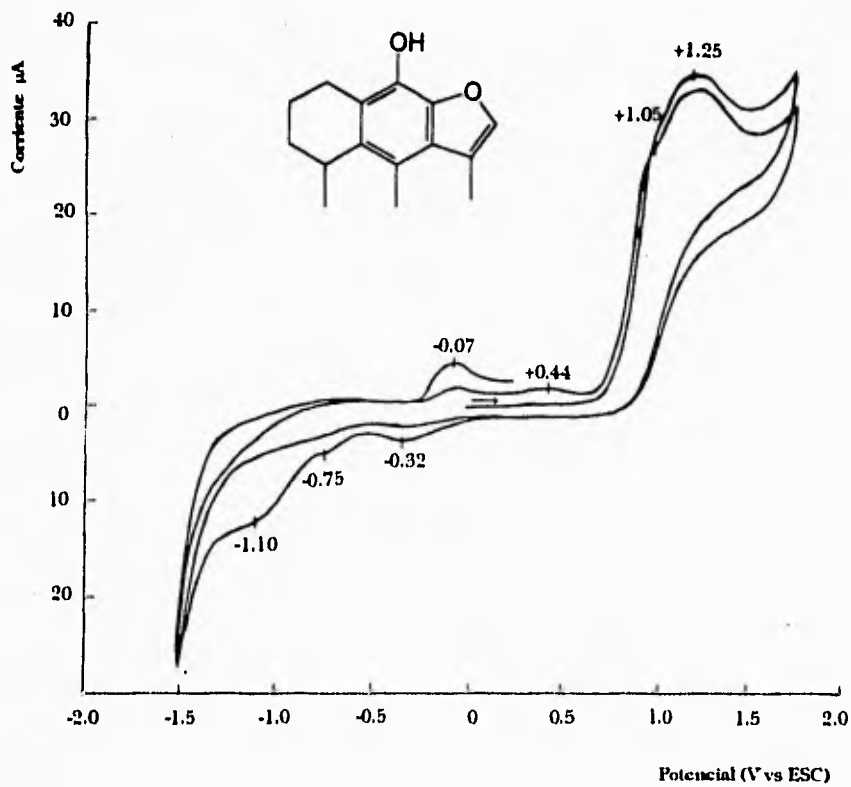


Figura 4.16 Voltograma cíclico de cacalol 3mM en una solución de nBu₄NBF₄ 0.1M en CH₃CN. Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

4.- Resultados y discusión

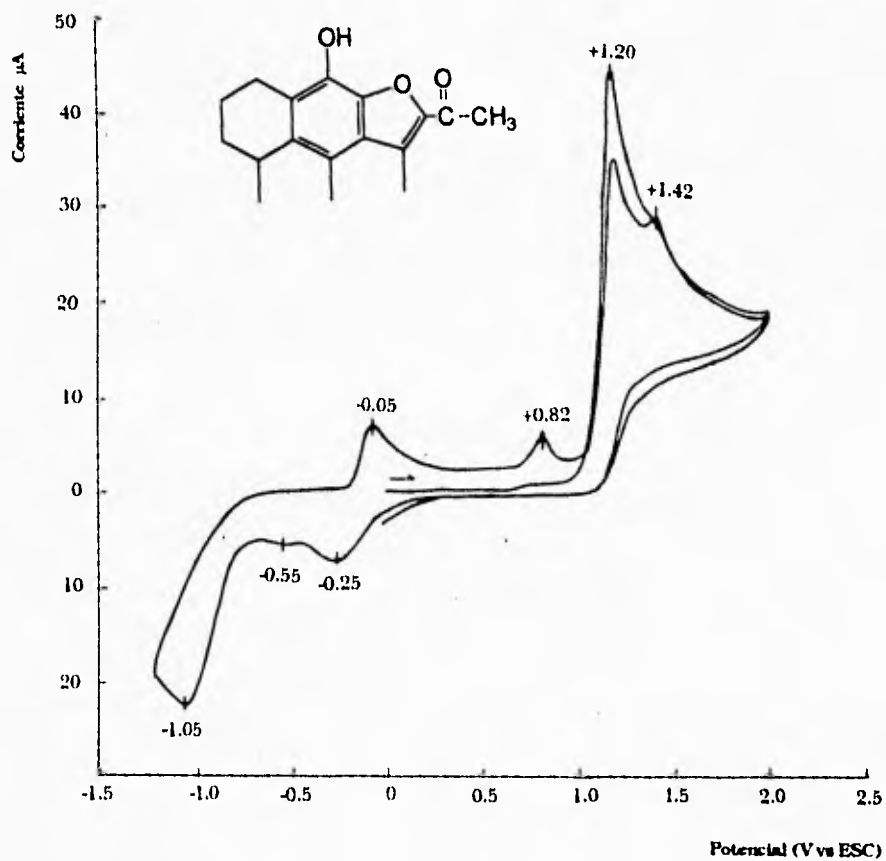


Figura 4.17 Voltograma cíclico de 2-acetilcalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

4.- Resultados y discusión

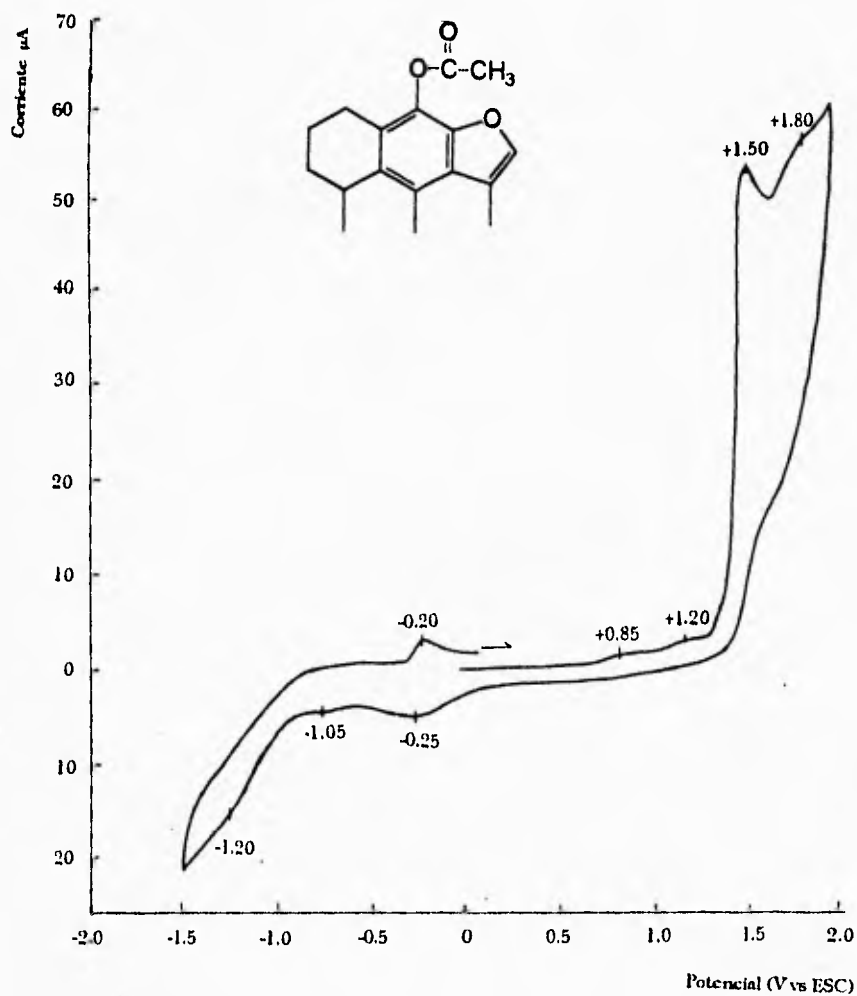


Figura 4.18 Voltagrama cíclico de Acetato de cacalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

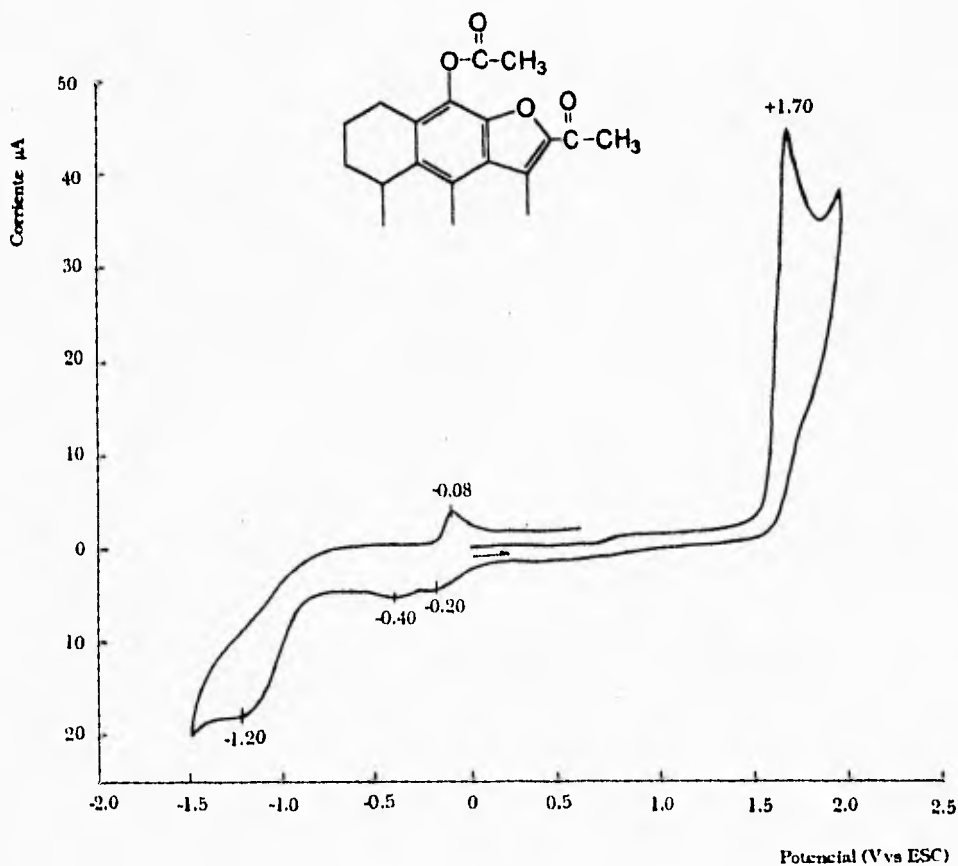


Figura 4.19 Voltograma cíclico de Acetato de 2-acetilcalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva.

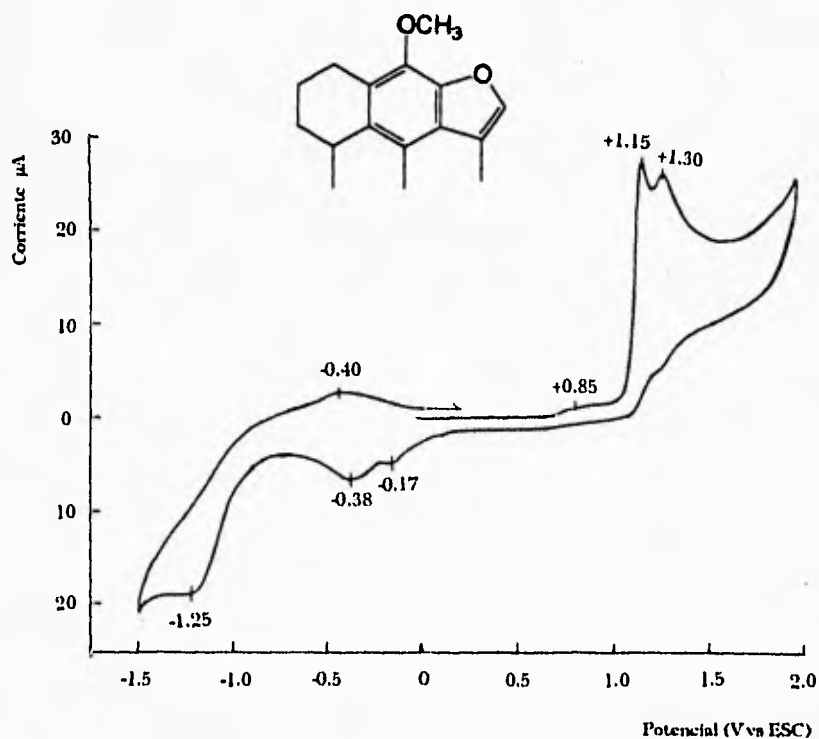
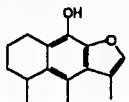
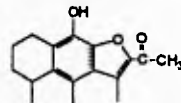
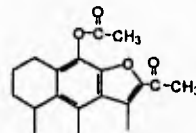
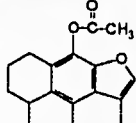
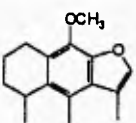


Figura 4.20 Voltagrama cíclico de Metilcalol 3mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Iniciando el barrido en 0.0 V vs ESC a 100 mV/s en dirección positiva

4. Resultados y discusión

Tabla IX. Datos de voltametría cíclica del cacalol, metilcacalol, acetato de cacalol, acetato de 2-acetilcacalol y 2-acetilcacalol. Concentración 3 mM en medio aprótico de nBu₄NBF₄ 0.1 M en CH₃CN. Electrodo de trabajo platino. El barrido se inició en 0.0 V a 100mV/s dirección positiva hasta 2.0 V vs ESC, regresando hasta -1.5 V vs ESC y finalizando en 0.0 V vs ESC.

Compuestos	Epa		Epc	
	Potencial de pico anódico		Potencial de pico catódico	
	V vs ESC	V vs ENH	V vs ESC	V vs ENH
Cacalol 	+1.05 +1.25 +0.44 -0.07	+1.294 +1.494 +0.684 +0.174	-0.32 -0.75 -1.10	-0.076 -0.506 -0.856
2-acetilcacalol 	+1.20 +1.42 -0.05 +0.82	+1.444 +1.664 +0.194 +1.064	-1.05 -0.25 -0.55	-0.806 -0.006 -0.306
Acetato de 2-acetilcacalol 	+1.70 -0.08	+1.944 +0.164	-0.20 -0.40 -1.20	+0.044 -0.156 -0.956
Acetato de cacalol 	+1.50 +1.80 +1.20 +0.85 -0.20	+1.744 +2.044 +1.244 +1.094 -0.044	-0.25 -1.05 -1.20	-0.006 -0.806 -0.956
Metilcacalol 	+1.15 -0.40 +1.30 +0.85	+1.394 -0.156 +1.544 +1.114	-0.38 -0.17 -1.25	-0.136 +0.074 -1.006

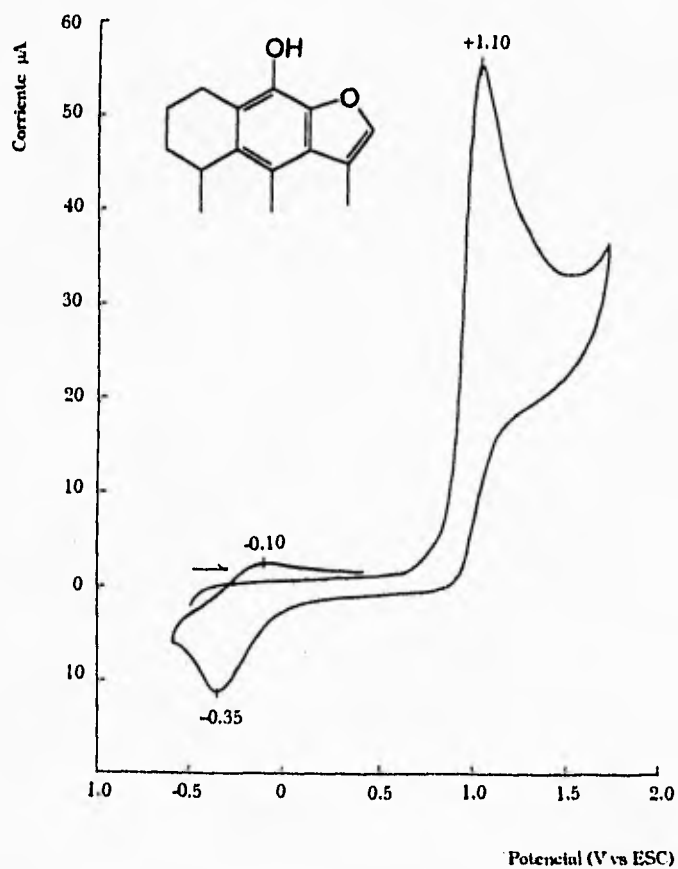


Figura 4.21 Voltagrama cíclico de Cacalol 3 mM en una solución de $n\text{Bu}_4\text{NBF}_4$ 0.1 M en CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia, ESC. El barrido se inició en -0.5 V vs ESC en dirección positiva a 100 mV/s

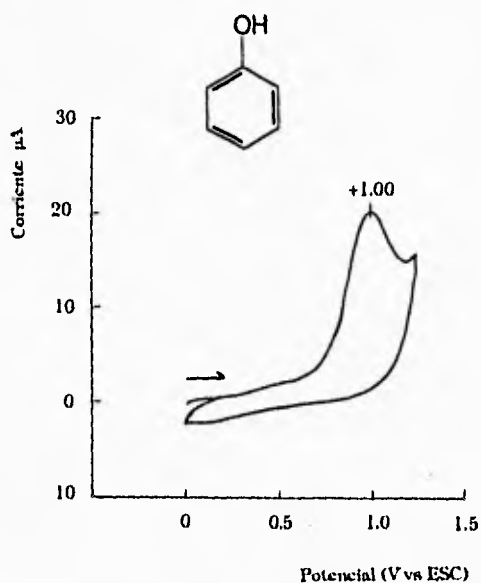


Figura 4.22 Voltograma cíclico de fenol 6 mM en una solución de 5 mM MgCl_2 , 40 mM KCl y 30 mM Na^+ -tricina (pH=7)/ 30% (v/v) CH_3CN . Electrodo de trabajo Pt. Referencia ESC. Velocidad de barrido 100mV/s. Potencial inicial 0.0 V vs ESC, haciendo el barrido en dirección positiva

potenciales más bajos que el observado para el fenol, esto se debe a que la presencia de los sustituyentes donadores de electrones, tales como el anillo furánico hacen más fácil la oxidación de la molécula. Dado que el rango útil de potencial en el medio prótico (de 0.0 V a 1.0 V vs ESC) es mas pequeño que el obtenido para el medio aprótico (de 0.0 V a 2.5 V vs ESC), en el medio prótico no fue posible observar los potenciales de oxidación correspondientes a los otros derivados del cacalol, ya que estos tienen potenciales de oxidación más altos.

C. CORRELACIÓN DE RESULTADOS BIOQUIMICOS Y ELECTROQUIMICOS.

La correlación de las reacciones electroquímicas con las reacciones biológicas (enzimáticas), es de gran utilidad para tener una mejor comprensión de las reacciones de transferencia de electrones en los sistemas biológicos, como es el caso de la fase luminosa de la fotosíntesis. En este trabajo, la correlación de los potenciales de oxidación determinados por voltametría cíclica con el efecto que ejercen el cacalol y sus derivados en las diferentes actividades de la fotosíntesis, sirvió para entender el mecanismo de acción de estos compuestos en el aparato fotosintético y determinar así su acción inhibitoria.

Es importante mencionar que hay gran variedad de similitudes entre las reacciones electroquímicas y las reacciones biológicas (reacciones enzimáticas).

1.- La transferencia de electrones tanto electroquímica como biológica involucra esencialmente procesos de transferencia heterógena de electrones. Electroquímicamente este proceso ocurre en la interfase electrodo-solución y bioquímicamente ocurre en la interfase enzima membranal-solución.

2.- Tanto las reacciones electroquímicas como las biológicas pueden efectuarse a pH similares y en presencia de fuerzas iónicas similares de electrolitos inertes.

3.- Los dos tipos de procesos pueden ocurrir efectivamente bajo condiciones no acuosas.

4.- Ambos tipos de reacciones pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente.

5.- En ambos procesos, ya sea sobre el electrodo o sobre el sitio activo de una enzima es probable que la molécula del sustrato deba adoptar una cierta orientación en el espacio con una geometría específica.

De acuerdo con los potenciales de oxidación obtenidos para el cacalol y el 2-acetilcacalol en 0.82 y 0.86 V vs ENH respectivamente (tabla V), observamos que estos potenciales de oxidación están muy cercanos al potencial de 0.82 V vs ENH, que es el potencial correspondiente de par rédox O_2/H_2O de la cadena transportadora de electrones en el cloroplasto. Esto nos explica el hecho de que solamente el cacalol y el 2-acetilcacalol inhiben el transporte de electrones fotosintético a nivel de la enzima que fotolisa al agua en la reacción de Hill.

En el medio aprótico observamos que tanto el cacalol como el 2-aceticacalol mostraron un pico de oxidación en 1.4 V vs ENH, pero dado que estos potenciales se determinaron en un medio de nBu_4NBF_4 0.1 M en CH_3CN , el cual no semeja las condiciones biológicas naturales en el cloroplasto, nos sugiere que este potencial en 1.4 V vs ENH es equivalente al potencial estándar del par rédox O_2/H_2O . Debido a que tanto el cacalol como el 2-acetilcacalol son insolubles en agua, esta propiedad física indica que estos compuestos inhiben por el lado apolar de la enzima, es decir, por el lado de la enzima que se encuentra embebido en la parte hidrofóbica de la membrana del tilacoide del cloroplasto.

Durante el proceso de la fotosíntesis en los cloroplastos, después que ha ocurrido la absorción de un fotón de luz por el FSII, P680 dona un electrón a la Ph, que es el primer aceptor de electrones en el FSII, dando como resultado que P680 quede con un hueco electrónico, convirtiéndose en un fuerte oxidante. Es posible que en el cloroplasto el cacalol y el 2-acetilcacalol, debido a que tienen potenciales de oxidación muy cercanos al par rédox O_2/H_2O sean oxidados por el FSII, dentro del p680 generando el mismo catión fenoxonio que el obtenido sobre la superficie del electrodo durante la voltametría cíclica. Dada la alta reactividad del catión fenoxonio, se sugiere que pueda reaccionar en algún sitio con la enzima que fotolisa al agua que físicamente está encontrada con p680 y de esta manera inhibir el flujo de electrones en la reacción de Hill (figura 4.23).

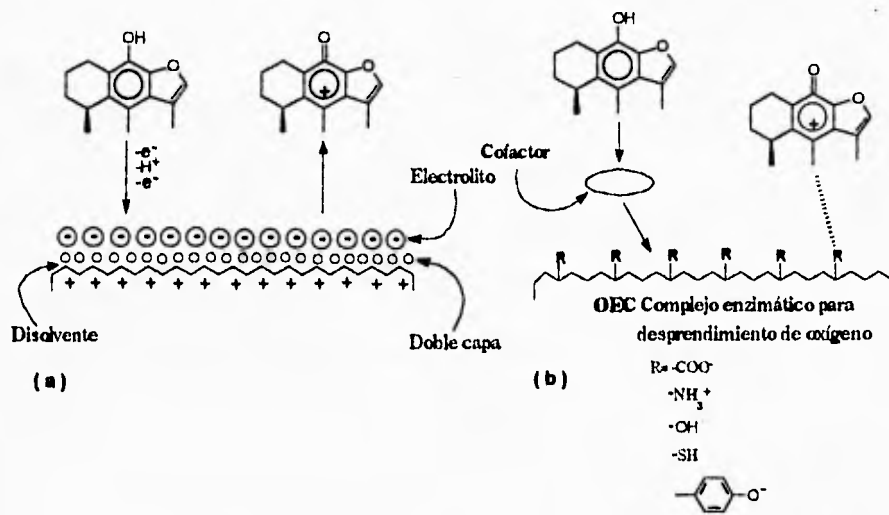


Figura 4.23 Esquema de la oxidación del cacalol (a) Oxidación electroquímica del cacalol ; (b) Oxidación del cacalol con la enzima.

Estos resultados indican que el grupo OH fenólico es importante para la inhibición a nivel de la enzima que fotolisa al agua en la fotosíntesis, ya que cuando se bloquea este grupo metoxilando o acetilando como en el metilcacalol, acetato de cacalol y 2-acetilacetato de cacalol cambia el blanco de ataque para la inhibición de la enzima que fotolisa al agua al tramo de la cadena rédox comprendido entre P680 y QA.

En el caso del acetato de cacalol y del 2-acetilacetato de cacalol observamos que estos muestran picos de oxidación a potenciales mucho más altos que el correspondiente al par rédox O₂/H₂O de la cadena transportadora de electrones. Los resultados nos explican el hecho que estos compuestos inhiben la cadena rédox del cloroplasto en un sitio distinto a la enzima que fotolisa al agua, y sugieren que al inhibir el tramo comprendido de P680 a QA, estos compuestos no experimentan reacciones de oxidación y/o reducción, ya que los potenciales rédox de las enzimas que componen la reacción de Hill están comprendidos de 0.82 a -0.32 V vs ENH.

4.- Resultados y discusión

Para el metilcacalol, observamos que este compuesto muestra potenciales de oxidación en 1.39 y 1.51 V vs ENH, estos valores están cercanos a los obtenidos para el cacalol y el 2-acetilcacalol. Se deduce que los sustituyentes metilo y acetato pueden modificar la solubilidad en la membrana y de esta manera pueden interactuar más eficientemente con la enzimas rédox localizadas entre P680 a QA . Esto requiere demostración directa por métodos espectroscópicos en condiciones de oxidación-reducción en presencia y ausencia de estos compuestos.

Debido a que ninguno de los derivados que tienen el grupo OH fenólico bloqueado inhiben la enzima que fotolisa el agua, estos resultados indican que además de tener un potencial de electro-oxidación semejante al del par rédox O_2/H_2O , se requiere que el grupo OH fenólico esté libre para efectuar la inhibición mediante una reacción de oxido-reducción.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se encontró que los resultados obtenidos por los métodos electroanalíticos y bioquímicos en el estudio del cacalol y sus derivados, como posibles herbicidas no tóxicos, coinciden en resaltar la acción del grupo OH fenólico como responsable de la inhibición de la fotosíntesis por una reacción de oxidación por P680⁺ y el ion fenoxonio formado reacciona en algún sitio de la enzima que fotolisa al agua. Los derivados que tienen al grupo OH fenólico bloqueado inhiben el tramo comprendido entre P680 y QA por un mecanismo distinto a reacciones de óxido-reducción. Los resultados mostraron también que el cacalol y el 2-acetilcacalol son inhibidores más eficientes que los otros derivados estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Romo J. & Joseph-Nathan P., *Tetrahedron*, 20, 2331(1964)
- 2.- Romo J. & Joseph-Nathan P., *Tetrahedron*, 22, 301(1966)
- 3.- Kuronayagi, M. & col., *Chem Pharm Bull.*, 33, 4792(1985)
- 4.- Inouye, Y., Uchida Y. & Karisawa H., *Chem. Lett.*, 2, 1317(1975)
- 5.- Hayashi, K., Natorigawa,T. & col., *Chem. Pharm.Bull.*, 20, 201, (1972)
- 6.- Joseph-Nathan, P., González & Negrete., *Phytochemistry*, 9, 1623(1970)
- 7.- Bye, R.A., *Economic Botany*, 40, 103(1986)
- 8.- Bye, RA & Linares, E., *Journal of Ethnobiology*, 3, 1-13 (1983)
- 9.- Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*, 6a. edición, Ediciones Botas México (1989)
- 10.- Pennington, C.W., *The Tarahumar of Mexico*. University of Utah Prees, Salt Lake City (1963)
- 11.- Pennington, C.W. *Medicinal Plants Utilized by the Tarahumar*, Imprenta Esparza, Chihuahua (1963)
- 12.- Bennet, W.C. & Zingg, R.M., *The Tarahumara: An Indian Tribe Of Northern Mexico*, Rio Grande Press, Glorieta, NM., (1976)
- 13.- Hicks, S. *Desert Plants and People*, Naylor Co., San Antonio, TX. (1966)
- 14.- Huxtable, R. J. , *Proceedings of the Western Pharmacological Society*, 26, 185 (1983).
- 15.- Zingg, R.M. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 22, 174(1932)
- 16.- Ford, K.C. *Las Yervas de la Gente: A Study of Hispano-American Medicinal Plants*, University of Michigan, Anthropological Paper , no. 60, Ann Arbor ,(1975)

- 17.- Jiménez, M., Cruz L., R., Valdés, J., León, J. R., Alarcón, G. & Esbeshterova B. *Rev. Latinoamericana de Química*, 23/1 y 22/4, 14-17(1992)
- 18.- Ashton, F. M. & Crafts, A. S., *Mode of Action of Herbicides*. John Wiley & Sons, Inc., New York , 1973, pp. 1-10
- 19.- Audus, L. J. *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*, Academic Press, London , 1964, pp. 1-33
- 20.- Alder, E. F., Weight, W. L. & Kin'nan G.C. *Chem Tech.*, 7(6),374 (1977)
- 21.- Alan, R. P. *Chemical & Engineering News*, 61, 34(1983)
- 22.- Moreland, D.E., *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 18, 365(1967)
- 23.- Baker, N. R. & Percival, M. P., *Herbicides*. Elsevier Science Publishers B.V, 1991, pp. 1-40
- 24.- Assche, C. J., *Advances on Pesticide Chemistry*, Part 3, Pergamon Press, Oxford, 1978, pp.494
- 25.- Ellis, R. J. *Chloroplast Biogenesis*. Cambridge University Press, London, 1984, pp.1-9
- 26.- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M.N. *Principles of Biochemistry*. Worth publishers, 1993 , pp. 571-579(
- 27.- Klein, M. P., Sauer, K. & Yachandra, V. K., *Photosynthesis Research*, 38, 265(1993)
- 28.- Debus, R. J. , *Biochim. Biophys Acta*, 1102, 269(1992)
- 29.- Moreland, D.E., *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 31, 597(1980)
- 30.- Vernon, L.P. & Shaw, E. R., *Plant. Physiol.*, 44, 1645(1969)
- 31.- Izawa, S. & Ort, D. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 357, 127(1974)
- 32.- Astier, Ch., Boussac, A. & Elienne Anne-Lise , *FEBS Letters*, 167, 321(1984)
- 33.- Ouitrakul, R. & Izawa, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 305, 105(1973)
- 34.- Pallet, K.E. & Dodge, A.D. *Pestic. Sci.*, 10, 216(1979)
- 35.- Guillory, R. J., & Racker, E., *J. Biol Chem.*, 240(12), 4822(1965)
- 36.- Mc Carty, R. E. & Racker, E., *J. Biol Chem.*, 242(15), 3435(1967)
- 37.- Mendoza, J. L., Jiménez, M. & Lotina-Hennsen, B. *Pestic. Sci.*, 40, 37(1994)
- 38.- Benz, R. & Mc Laughlin, S., *J. Biophys.*, 41, 381(1983)

- 39.- Zweig, G., Shavit, N. & Avron, M., *Biochim Biophys. Acta.*, 109, 332(1965)
- 40.- Mahler, H.R., & Cordes, E. H., *Biological Chemistry*, 1a. edición, Harper & Row, N.Y (1966)
- 41.- Coetzee, J.F., Cunningham, D. K., Mc Guire, D.K. & Padmanabhan. *Anal. Chem.*, 34(9), 1139(1962)
- 42.- Princeton Applied Research Corporation 1974, Printed in U.S.A. , Note 108.
- 43.- Catálogo Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, Indiana. Reprinted by permission.
- 44.- Takakoi, T., Torres Pereira & Packerl , *Biochim Biophys Acta*, 352, 160(1974)
- 45.- Arnon, D. I., *Plant Physiol.*, 24, 1(1949)
- 46.- Fork, D.C., *Methods in Enzymology* Vol. XXIV, Ed. Anthony San Pietro, Academic Press 113(1972).
- 47.- Gianquinta R. T. & Dilley, R.A. *Biochim. Biophys. Acta* , 387, 288(1975)
- 48.- Izawa, S., & Pan R. L., *Biochem. Biophys. Acta. Res Commun*, 83(3), 1171(1978)
- 49.- Gromet- Elhanan, Z. & Avron, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10 (3), 215(1963)
- 50.- Hauska, G. A., Mc Carty, R. E. & Racker, E., *Biochim. Biophys. Acta.*, 197, 206(1970)
- 51.- Dilley, R.A., *Methods in Enzymology*, Vol XXIV, Ed. Anthony San Pietro, Academic Press, 68(1972).
- 52.- Tamura, N., Cheniane, G., *Biochimica et Biophysica Acta*, 890, 179(1987)
- 53.- Hammerich, O., Svensmark, B. *Organic Electrochemistry*, Ed. Manuel M. Baizer, Marcel Dekker Inc., New York ,1991, pp. 615-650
- 54.- *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements. Organic section*, Ed. by Allen J. Bard, Vol. XI, Capítulo 2, New York , 1980, pp. 242-274
- 55.- Oyama, N., Ohsaka, T., Hirokawa, T. & Takanao, S. *J.C.S. Chem. Comm.*, No. 15, 1133(1987)
- 56.- Johnson, R. W., Bednarski, M.D., O'Leary, B. F. & Grover, E. R. *Tetrahedron Letters*, 22(38), 3715(1981).

Referencias bibliográficas

- 57.- Kotani, E., Takeuchi, N. & Tobinaga, S., *J.C.S. Chem. Comm.*, No. 15, 718(1972)
- 58.- Sainsbury, M. & Schinazi, R. F., *J.C.S. Chem. Comm.*, No. 12, 718 (1972)
- 59.- Russell Falck, J., Miller, L. L. & Stermitz, F. R., *J. Amer. Chem. Soc.*, 96(9), 2981(1974)