



Universidad Nacional Autónoma de México

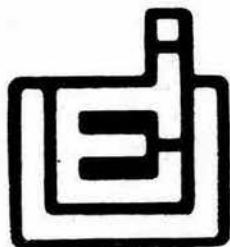
CAMPUS IZTACALA

BO 1273/96

Ej. 3

**“Efecto de Algunos N-Oxidos y 4-Hidroxidos
de Piridina sustituidos sobre la Fotosíntesis
en Cloroplastos de Espinaca (*Spinacea
Oleracea*)”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JOSE CRISTOBAL RODRIGUEZ TAPIA



Los Reyes Iztacala, Edo. de México

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**SOLO QUERIA VIVIR, SOLO QUERIA SER EL ACTOR DE MI PRESENTE ABRAZANDO
TODO Y DESTROZANDO MIS ENTRAÑAS...**

ALBERTO LOPEZ VILLARREAL

A MI MADRE:

CECILIA TAPIA ALARCON

A MIS HERMANOS:

MARTIN, JUAN Y ASUNCION.

A MIS TIAS

ASUNCION Y CONCHITA

A LOS CUATES...

AGRADEZCO A :

**CECILIA PEÑA Y EMANUEL ENRIQUEZ POR SU COPAÑERISMO
Y VALIOSAS ENSEÑANZAS.**

**TERESA SANTOYO CALDERON POR SU APOYO, IMPETU Y
SUEÑOS...**

**Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA
FORMA PARTICIPARON PARA LA REALIZACION DE ESTA
OBRA.**

DIRECTOR DE TESIS

DR. BLAS LOTINA HENNSSEN.

ESTUDIO REALIZADO EN EL LABORATORIO 112 DEL

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,

DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA,

FACULTAD DE QUIMICA.

UNAM

CD. UNIVERSITARIA.

INDICE TEMATICO

PAGINA

1.0 ABREVIATURAS	1
2.0 RESUMEN	2
3.0 INTRODUCCION	3
4.0 ANTECEDENTES	9
4.1 ESTUDIOS PREVIOS	9
4.2 FOTOSINTESIS	12
4.3 SINTESIS DE ATP	18
4.4 FOTOSISTEMA II Y I	24
4.5 CLASIFICACION DE HERBICIDAS	30
4.5.1 INHIBIDORES	31
4.5.2 DESACOPLANTES	31
4.5.3 INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGIA	32
4.5.4 DESACOPLANTES INHIBIDORES	32
4.5.5 ACEPTORES DE ELECTRONES	33
4.5.6 CARACTERISTICAS DE LOS COMPUESTOS DE PIRIDINA	34
5.0 OBJETIVOS	
5.1 OBJETIVO GENERAL	36
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	36
6.0 HIPOTESIS DE TRABAJO	37
7.0 MATERIALES Y METODOS	38
7.1 AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS	38
7.2 DETERMINACION DE CLOROFILA	39
7.3 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES	40
7.4 DETERMINACION DE REACCIONES PARCIALES	42
7.5 SINTESIS DE ATP	44
7.6 BOMBA DE PROTONES	46
7.7 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO METODOLOGICO	48
7.8 FORMULA ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS Y SSTITUIDOS DE PIRIDINA	49

	PAGINA
8.0 RESULTADOS Y DISCUSION	50
8.1 EFECTO DE LOS DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS	53
8.1.1 PIRIDINA	53
8.1.2 4-hidroxipiridina	55
8.1.3 3,5-dicloro-4-hidroxipiridina	56
8.1.4 3,5-dibromo-4-hidroxipiridina	57
8.1.5 4-mercaptopiridina	58
8.1.6 DISCUSION DEL EFECTO DE LOS DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE EL APARATO FOTOSINTETICO	61
8.2 EFECTO DE LOS N-óxidos DE Piridina	63
8.2.1 N-óxido de piridina	63
8.2.2 4-hidroxi-N-óxido de Piridina	64
8.2.3 3,5-dibromo-4-hidroxi-N-oxido de Piridina	65
8.2.4 4-nitro-N-óxido de Piridina	66
8.2.5 4-cloro-N-oxido de Pirdina	67
8.2.6 DISCUSION DEL EFECTO DE LOS N-óxidos de Piridina.	69
8.3 EFECTO DE LOS DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES.	71
8.4 EFECTO DE LOS N-OXIDOS DE PIRIDINA SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES.	76
8.5 RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.	80
9.0 CONCLUSIONES.	82
10.0 BIBLIOGRAFIA.	85

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIG.1 MEMBRANA TILACOIDE CON SUS SISTEMAS PIGMENTARIOS	14
FIG.2 ESQUEMA Z DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DE HILL Y BENDALL.	15
FIG.3 TOPOLOGIA DE LOS ACARREADORES DE ELECTRONES DEL FOTOSISTEMA II	25
FIG.4 CLASIFICACION DEL EFECTO DE HERBICIDAS SOBRE EL APARATO FOTOSINTETICO	30
FIG.5 ESQUEMA METODOLOGICO.	48
FIG.6 ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS.	49

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA 1.-EFECTO DE LA PIRIDINA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS.	53
GRAFICA 2.-EFECTO DE LA HP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS.	55
GRAFICA 3.-EFECTO DE LA DCHP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS.	56
GRAFICA 4.-EFECTO DE LA DBHP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS.	57
GRAFICA 5.-EFECTO DE LA MP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS.	58
GRAFICA 6.-EFECTO DE LA OP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS	63
GRAFICA 7.-EFECTO DE LA HOP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS	64
GRAFICA 8.-EFECTO DE LA DBHOP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS	65
GRAFICA 9.- EFECTO DE LA NOP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS	66
GRAFICA 10.- EFECTO DE LA COP SOBRE LAS ACTIVIDADES FOQUIMICAS	67
GRAFICA 11.- EFECTO DE LOS DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE EL FSI	72
GRAFICA 12.- EFECTO DE LOS DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE EL FSII	73
GRAFICA 13.- EFECTO DE LOS N-OXIDOS DE PIRIDINA SOBRE EL FSI	76
GRAFICA 14.- EFECTO DE LOS N-OXIDOS DE PIRIDINA SOBRE EL FSII	77

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1.- POR CIENTO DE INHIBICION DE DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS.	60
TABLA 2.- POR CIENTO DE INHIBICION DE N-OXIDOS DE PIRIDINA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS.	68
TABLA 3.- POR CIENTO MAXIMO DE INHIBICION DE DERIVADOS DE PIRIDINA DE SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES ASOCIADAS AL FSI-FS-II.	75
TABLA 4.- POR CIENTO MAXIMO DE INHIBICION DE N-OXIDOS DE PIRIDINA DE SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES ASOCIADAS AL FSI-FS-II.	78

1.0. ABREVIATURAS

A: Centro Fe-S del FSI

At: Filoquinona, aceptor electr. sec. del FSI

As: Chl a, aceptor electr. primario del FSI

ADP: Difosfato de Adenosina

ATP: Adenosin Trifosfato

Ca²⁺-ATPasa: ATPasa dependiente de Calcio

BNF: Bromonitrofenol

Qa: Aceptor electrónico primario FSII

Qb: Aceptor electrónico sec. del FSII

Chl: Clorofila

Cit-b: Citocromo-b

Cit-c: Citocromo-C

Cit-f: Citocromo-f

CO₂: Dioxido de Carbono

2,4-D Ácido 2,4-diclorofenilacético

DAD [2,3,5,6-tetrametil-1,4-fenildiamina]

DBMB [2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona]

DCMU: [3-(3,4-dicloro fenil metil urea)]

DPIP/ASC: Diclorofenol indofenol/ascorbato

EDTA: Ác. etilendiaminoacético

$\Delta \psi$: Potencial electrico

$\Delta \mu H^+$: Potencial electroquímico

FAD/FADH₂: Flavina Adenin Dinucleotido oxidado/reducido

FCCP: 4-trifluorometoxicarbonil cianida

FeCy: Ferricianuro de Potasio

FD: Ferredoxina

FX, FA y FB: Aceptores electrónicos primarios del

FES: Centro hierro azufre de la ferredoxina

FS-I: Fotosistema I

FS-II: Fotosistema II

F0-F1 (CF0-CF1, H⁺-ATPasa): Factor acoplante

H₂O → MV : Reacción de Hill

I: Feofitina

HEPES: Ac. hidroxietilpiperizina-N'-2-etanosulfónico

I₅₀: Conc. del 50 % de inhibición de la actividad del compuesto

Kcal/mol: Kilocalorias/mol

KD: Kilodaltons

MV: Metil viológeno

$\mu\text{eq/meq}$: Microequivalente/miliequivalente

NADP⁺/NADPH: Fosfato de Nicotina Adenina Dinucleotido

P-680: Centro de reacción del FSII

P-700: Centro reacción del FSI

PC: Plastocianina

PD: Fenilén diamina

Pi: Fosfato Inorganico

pKa: Costante de Disociación ácido

PMS: Fenacin Metasulfato

PQ/PQH₂: Plastoquinona oxidada/reducida

r.p.m.: Revoluciones por minuto

nm: Nanometro

teb: Transporte de electrones basal

tea: Transporte de electrones acoplado

ted: Transporte de electrones desacoplado

TEBHP 2,3,5,6-tetrabromo-4-hidroxi piridina

TRBFHP 2,3,5-tribromo-6-fluoro-4-hidroxi piridina

TECHP 2,3,5,6-tetracloro-4-hidroxi piridina

DCDFHP: 3,5-dicloro-2,6-difluoro-4-hidroxi piridina

TRCHP: 3,5,6- tricloro-4-hidroxi piridina (Pycliclor)

DBDFHP: 3,3,5-dibromo-2,6-difluoro-4-hidroxi piridina

DFBIHP: 2,6-difluoro-1,3-diiodo-5-bromo-4-hidroxi piridina

DFDIHP: 2,6-difluoro-3,5-diiodo-4-hidroxi piridina

MP: Mercaptopiridina

HP: Hidroxi piridina

DCHP: 3,5-diclorohidroxi piridina

DBHP: 3,5-Dibromohidroxi piridina

OP: N-Oxido de Piridina

HOP: 4-hidroxi piridina

NOP 4-nitro-N-oxido de Piridina

COP: 4-cloro-N-oxido de Piridina

DBHOP: 3,5-dibromo-4-hidroxi-N-oxido de Piridina

Tricina: N-tris(hidroxi metil)-metilglicina

2.0. RESUMEN

En la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria sobre las actividades fotoquímicas del aparato fotosintético, se evaluó el efecto de algunos derivados y N-óxidos de Piridina sustituidos encontrandose que los primeros a excepción de la Mercaptopiridina (desacoplante) son inhibidores del transporte de electrones a nivel del FS-II, mientras que los segundos lo hacen en el FS-I.

Además se observó que el grupo -OH en los derivados de Piridina potencia la capacidad de inhibición en el FS-II y para los N-óxidos de Piridina posiblemente forma una estructura tautómerica que se asemeja a PQ posibilitando su efecto.

Finalmente la sustitución en el anillo de Piridina en 3 y 5 por grupos halógenos es un factor que puede incrementar la liposolubilidad de ambos grupos de compuestos potenciando su capacidad inhibitoria.

3.0. INTRODUCCION.

La agricultura es la actividad en la cual el hombre en un ambiente dado, maneja los recursos naturales, la calidad y cantidad de energía disponible, y los medios de información, para producir y reproducir los vegetales que satisfacen sus necesidades de alimentación, salud y vestido (45).

Desde su origen, la agricultura ha presentado problemas de plagas como los insectos, hongos y malezas. Las malezas se han generalizado y diversificado al correr del tiempo conforme los sistemas antropógenos de producción agrícola han establecido el monocultivo extensivo e intensivo como único procedimiento dentro de la agricultura (15 y 30).

Las malezas son producto de la actividad del hombre y constituyen una de las plagas de mayor importancia para la humanidad, pues la afectan en su bienestar físico y económico (30). Por lo tanto, maleza es un concepto antropocéntrico, y representa a todas las plantas que dañan directa o indirectamente al humano(3).

Las malezas dañan a los cultivos agrícolas en sus diferentes estadios de desarrollo en forma directa, manifestandose en una

reducción tanto del vigor como de la población de cultivo, debido a la competencia por agua, luz, espacio, nutrientes; fenómenos de alelopatía y parasitismo; además, las malas hierbas también pueden ser hospederas de insectos, patógenos, roedores u otros animales perjudiciales al cultivo (2).

El daño ocasionado por las malas hierbas en los campos agrícolas es de un factor que limita considerablemente la producción en México, repercutiendo fuertemente sobre la economía del campesino disminuyendo el rendimiento obtenido de sus productos (30).

A través del tiempo los agricultores han venido eliminando las malas hierbas de sus cultivos por medio de diversas prácticas y métodos de control, entre los que se encuentran los manuales, que consisten en arrancar las malas hierbas con implementos manipulados directamente (machete, azadón, coa o tarpala); los mecánicos, que van desde el arado de reja hasta equipo mas sofisticado, como el azadón mecánico rotatorio o la cultivadora múltiple accionada por un tractor (7). El control biológico que reduce y mantiene la densidad de las poblaciones de plantas nocivas por medio del manejo específico de enemigos naturales, como parásitos, depredadores y patógenos (7); el control cultural, que se basa en las prácticas de aplicación; por ejemplo, la rotación de cultivos

fuertemente competitivos, cultivos con densidades de siembra adecuadas, inundamiento del suelo, siembras en seco y húmedo, etc. (7); finalmente el control químico, que consiste en el combate de malezas, por medio del uso de herbicidas que son compuestos que matan o inhiben su crecimiento normal (7, 14, 22, 30, 66 y 81).

Los herbicidas son compuestos fitotóxicos que interfieren con los procesos metabólicos de las plantas. Se sabe que sus sitios primarios de acción pueden ser cualquier enzima ó proteína que regule su actividad en una vía metabólica (27).

Hasta el momento los sitios de ataque mejor conocidos son en la formación de microtúbulos, biosíntesis de carotenos y el aparato fotosintético (18, 22, 27, y 81). Su efecto sobre el aparato fotosintético, se relaciona especialmente con: a) la inhibición de la cadena de transporte electrónico, a nivel del lado aceptor del Fotosistema II (enzima redox Q-b), complejo Cit-f y el lado aceptor del Fotosistema I (FS-I); b) inhibición de las reacciones de fotofosforilación, c) inhibición de la biosíntesis y fotodestrucción de carotenos y clorofilas; d) destrucción de componentes estructurales de la membrana por reacciones de peroxidación (18, 22, 31 y 81).

El 50% de los herbicidas comerciales inhiben el flujo electrónico redox a nivel de la enzima Q_B (14, 31 y 100). Estudios recientes muestran la existencia de dos grupos de compuestos inhibidores de la enzima Q_B (94 y 103). En el primer grupo figuran los del tipo ureas, como: uracilos, triazinas, aminotriazonas, piridazinonas, los cuales se unen competitivamente en un dominio común, de forma no covalente a una proteína de aproximadamente 32-34 KD del FS-II de la enzima Q_B (94 y 95). Mientras que el segundo grupo esta representado por fenoles como el ioxynil y 2-Bromo-4-nitrofenol, que se unen preferentemente a dos proteínas de 44 y 51 KD respectivamente, las cuales se encuentran uniendo moléculas de clorofila a y b del FS-II (87). Los compuestos fenolicos presentan cinéticas no competitivas de unión respecto a los compuestos del tipo de las ureas, lo que sugiere que dichos compuestos se unen a proteínas diferentes, (95 Y 110).

Paralelamente, se han realizado un gran número de estudios estructura-actividad biológica de acuerdo con el modelo propuesto por Hansch en compuestos del tipo de las ureas (40,41 y 42). Estos compuestos presentan en común una densidad de carga pi definida (polarizada) en el átomo de Nitrógeno o de Carbono Sp implicado en el enlace con la proteína receptora y un grupo lipofílico; por lo tanto, su potencia

inhibitoria esta gobernada predominantemente por parámetros electrónicos y lipofílicos (27, 42, 89 y 111); en tanto que para los compuestos fenólicos no tienen definida la distribución de la densidad electrónica en el átomo de unión a la enzima que inhiben (52). Así entonces, los compuestos fenólicos tienen diferente correlación estructura-actividad respecto a los del tipo de las ureas; siendo su potencia inhibitoria referida a parámetros estéricos (26,110).

Estudios de estructura-actividad en 2,6-dibromofenoles con diferentes sustituyentes en *para* (-NH₂, -NO₂, -CH₃) muestran que el grupo en la posición *para* debe ser fuertemente atractor de electrones y de tamaño pequeño, para lograr así un mayor efecto inhibitorio; esto indica que el protón del -OH del fenol necesita estar disociado para poderse unir al receptor proteínico e inhibir. Sin embargo, si el grupo en *para* es grande no le permitiría alcanzar al receptor por impedimento estérico, lo que sugiere que el sitio receptor es una hendidura o cueva de unión, donde el grupo en *para* mete electrones al anillo; el fenol esta protonado y este carece de actividad inhibitoria (4, 37 y 65).

Por otro lado, se ha reportado que ciertos derivados de hidroxipiridina halógeno sustituidas son inhibidores del FS-II de forma semejante a los compuestos fenólicos (37, 111 y 112).

Estas interfieren con la reducción de la plastoquinona por el FS-II, inhibiendo a la enzima redox Q_b y desplazan al metribuzin e ioxynil de la membrana tilacoide que se unen en sitios similares(107).

Por tanto el efecto de fenoles, y derivados de piridina no ha sido determinado con exactitud en lo referente a la fotofosforilación, Bomba de protones (H^+), Transporte de electrónes basal y desacoplado en muestras de cloroplastos. Por lo que en el presente trabajo, se determinó el sitio de acción y se caracterizó el efecto de algunos N-Oxidos y 4-Hidroxidos de piridina substituidos sobre el aparato fotosintético; además se estudio la contribucion que pudiera tener un grupo donador de protones y/o electrón atractor sobre el anillo de Piridina en el desacoplamiento de la fotofosforilación, para lo cual se precisó el efecto de dichos compuestos sobre la cadena de transporte electrónes en la reacción de Hill bajo condiciones basales, fosforilantes y desacopladas, así como las reaciones parciales de Fotosistema I y II, síntesis de ATP y Bomba de protones en cloroplastos de espinaca (*Spinacea oeracea*).

4.0. ANTECEDENTES.

4.1. ESTUDIOS PREVIOS.

Existe un gran número de publicaciones que describen el efecto de diversos compuestos sobre la fotosíntesis. Los estudios específicos de piridinas y sus derivados sobre la fotosíntesis son escasos. Sin embargo, existe un gran número de trabajos de patente enfocados a su síntesis con posible actividad fungicida, insecticida o herbicida. El efecto específico de dichos compuestos sobre la fotosíntesis solo ha sido evaluado parcialmente.

En 1971 Nelson observó que la piridina a una concentración de 5 mM abate el gradiente de pH (ΔpH) que normalmente se establece al iluminar cloroplastos. En este trabajo se encontró que las reacciones de fotofosforilación se inhiben levemente, mientras que la síntesis de ATP postiluminación se incrementa notablemente, (85). Dichos resultados no son compatibles conforme la hipótesis Quimiosmótica de Mitchell; por lo que este tipo de respuesta la clasifica como desacoplante no clásicos, con mecanismo desconocido (76, 77 y 81).

Estudios realizados por Hamaker et al (1963); Kefford (1966) T. T. Haagsma (1975); Charles (1987) e Hiroshi (1988), han mostrado que los derivados carboxílicos de piridina con grupos sustituyentes en el anillo piridínico como: -Cl, -NH₂, -CH₃ y -F son fuertes reguladores del crecimiento en plantas y a grandes concentraciones presentan un potente efecto herbicida similar al del 2,4-D, (39 y 54).

Meikle (1970) encontró que el 2,3,5-tricloro-4-hidroxi-Piridina (tricycloropyr) inhibe la fotosíntesis en cloroplastos aislados a nivel de la reacción de Hill (H₂O→MV) (73). Por su parte Burns et al, en 1971 observó que el piriclor utilizado como herbicida, tiene efecto sobre la biosíntesis de carotenos a nivel de fitoeno y fitoflueno (20).

Dogde y Lawes en 1972 estudiaron el efecto del Haloxidine (3,5-Dicloro-2,6-difluoro-4-hidroxipiridina) en malezas, encontrando que este actúa sobre la biosíntesis de carotenos de forma similar al pyriclor (66). En otro trabajo Trebst observo que el Haloxidine es un inhibidor débil de la reacción de Hill (111).

Volkova en 1978 con sus investigaciones con N-oxidos de piridina con cadena alquíla de 6-10 átomos de carbono en

la posición α , concluye que inhiben las reacciones de fotofosforilación, transporte de electrones y la Bomba de protones H^+ de la reacción de Hill (114).

González G. (1981), observó que la 3,5-Dibromo-4-hidroxipiridina actúa como inhibidor de la cadena de transporte de electrones (37). En otro estudio similar Trebst, comprobó que con 4-hidroxipiridinas halogenadas tetrasustituidas son inhibidores de la cadena de transporte de electrones a nivel del FS II (111). Esto concuerda con los estudios realizados por González H. (1983), quien encontró que derivados de 4-hidroxi y N-oxidos de piridina disueltos en dimetil formamida al 10%, actúan como inhibidores de la cadena de transporte de electrones o inhibidores desacoplantes, (38 y 81).

Trabajos recientes realizados por Peña (1991) sobre el efecto del disolvente dimetilformamida sobre la fotosíntesis, indican que esta inhibe la transferencia de energía en las reacciones de fotofosforilación, así como parcialmente la cadena de transporte de electrones, en cambio a concentraciones altas del disolvente (10%) inhibe a nivel de FS-I y FS-II (92).

Otros estudios realizados por Tadao en 1985, con análogos estructurales de pirona y piridona muestran ser inhibidores fotosintéticos de la reacción de Hill sobre el complejo cit-f, a razón de su semejanza estructural con la coenzima plastoquinona, (9).

Finalmente Len en 1991 de Monsanto Agricultural Company, ha diseñado una nueva familia de herbicidas de Piridina fluoroalquilados, los cuales se comportan como inhibidores de la reacción de Hill, (62).

4.2. FOTOSINTESIS.

El establecer una definición de un fenómeno biológico como la fotosíntesis limita su comprensión en su totalidad. No obstante, para el presente estudio no prescindirá de ella.

La fotosíntesis, en terminos generales, se entiende como la conversión de la radiación lumínica en potencial reductor y energético, que posteriormente es utilizado en la reducción y asimilación de elementos biogénicos que se encuentran en alto grado de oxidación o en formas de baja reactividad como lo muestra la figura 2 (24, 34, 61, 88 y 97).

El proceso fotosintético se puede delimitar en la generación de un potencial tanto reductor como energético y una segunda fase de asimilación reductora de compuestos oxidados (23 y 34); ambas tienen lugar de forma independiente en estructuras específicas; que en los vegetales y algas eucariotas, constituyen los cloroplastos; los cuales presentan una gran homogeneidad en su estructura, composición, bioquímica y función. La forma y el tamaño del cloroplasto es variable, pero se pueden observar tres regiones bien definidas: membrana externa o envoltura, estructura granal y un estroma amorfo (23 y 34).

La envoltura del cloroplasto, se compone de dos membranas separadas por un espacio intermembranal; la externa es altamente permeable; en tanto, la membrana interna es una auténtica barrera selectiva de permeabilidad del cloroplasto (12). La estructura granal y lamelar alberga en los tilacoides los pigmentos fotosintéticos, los componentes de la cadena de transporte de electrones, así como el sistema enzimático encargado de la síntesis de compuestos energéticos llamado complejo F_0-F_1 o H^+ -ATP-asa (69 y 89).

El estroma es el espacio limitado por la envoltura del cloroplasto, en el que se encuentran las lamelas granales, que son membranas que sirven de soporte a los componentes que

captan la energía solar convirtiéndola en energía química y poder reductor. En el estroma se encuentra en solución acuosa, entre otros, la vía enzimas del ciclo de Cálvin, la cual constituye un proceso fundamental, por donde el anhídrido carbónico (CO_2) se convierte en hidratos de Carbono utilizables en el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos con el consecuente consumo de NADPH y ATP generados en las reacciones de óxido-reducción de la cadena de transporte de electrones y fotofosforilación respectivamente, ver figura 1 (25, 34 y 97).

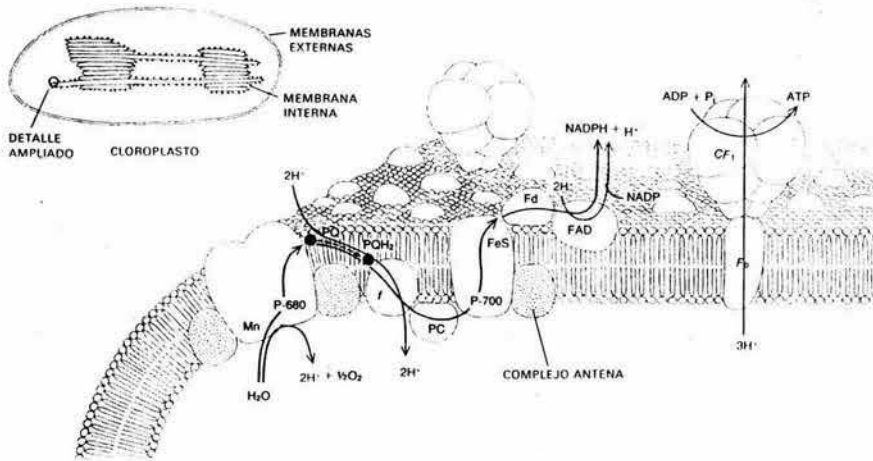


Figura 1.- Membrana tilacoide del cloroplasto con sus sistema pigmentario y otras moléculas dependientes de la luz, que transfieren protones al lumen tilacoide, McCarty (1978).

La cadena de transporte de electrones comienza con la fotólisis del agua y finaliza con la reducción del NADP⁺: fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotido, conforme el esquema Z de transporte electrónico (fig. 2), propuesto originalmente por Hill y Bendall, (46). Para que los electrones donados por el agua puedan fluir al NADP⁺ ha de elevarse la energía libre del estado inicial, lo que se logra por la absorción de luz (fotones o cuantos) por pigmentos fotosintéticos dispuestos en dos puntos de la cadena de transporte de electrones (61).

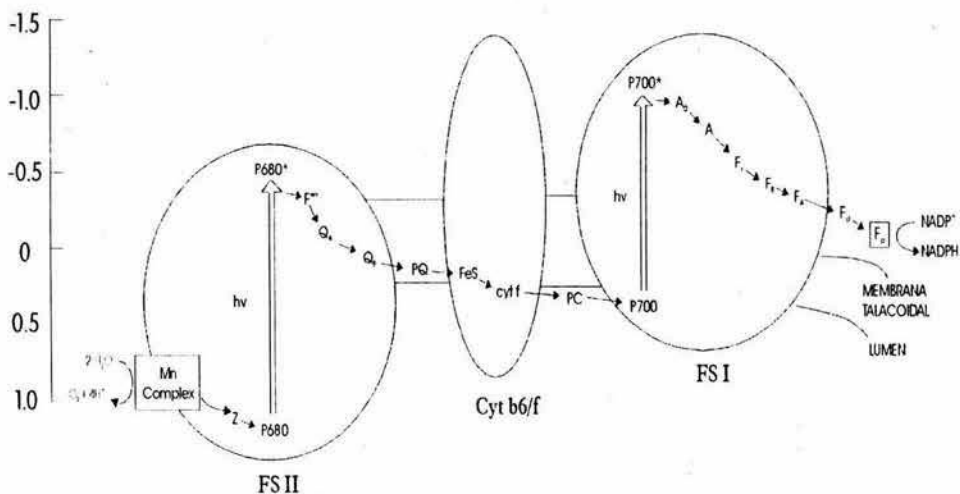


Figura 2.- Esquema Z de la cadena de transporte de electrones en plantas. La posición vertical de cada acarreador electrónico corresponde a su potencial redox a pH 7. Las flechas dobles indican fotoexcitación y las flechas solidas muestran el flujo electrónico de agua a NADP⁺. Los acarreadores móviles se observan fuera de los ovalos que indican los complejos enzimáticos en la membrana tilacooidal.

El primer fotón es absorbido a través de los pigmentos antena y proteínas cosechadoras de luz formadas por alrededor de 200-300 moléculas de clorofila a y b, además de la participación de 2 a 3 proteínas diferentes por unidad fotosintética, las cuales se encuentran inmersos en la membrana interna del tilacoide constituyendo el complejo antena.

La energía de excitación del complejo antena se comunica rápidamente a una unidad especializada de clorofila-proteína llamada P-680 o centro de reacción del FS-II alterando la distribución de los electrones en el anillo de P-680 y permite que un electrón pueda ser transferido al aceptor primario del FS-II, llamado Qa (25, 34, 69, 90 y 97). El proceso se repite con la absorción de otro fotón de luz. Las dos moléculas de P-680 son reducidas por dos electrones procedentes del agua, con participación de una enzima de fotólisis del agua, que contiene Manganese (90). El átomo de Oxígeno derivado de la molécula de agua se libera como gas y sale del cloroplasto; los dos protones se depositan en solución acuosa en el interior del lumen tilacoidal. Los dos electrones procedentes de P-680 son capturados en la superficie externa por un acarreador de Hidrógeno denominado plastoquinona (PQ) con dos protones aceptados de la solución externa (estroma) se reduce a dihidroquinona (PQH₂),

que a su vez libera los protones al interior de lumen tilacoidal y transfiere los electrones al complejo citrocomo b-f, el cual los cede a una proteína que contiene cobre llamada plastocianina (PC). Los electrones son donados a un segundo sistema fotoquímicamente activo (23 y 70); donde su componente más importante es otra molécula especializada de clorofila-proteína denominada P-700 o centro de reacción del FS-I. Al excitarse P-700 por la absorción de un cuanto de luz por el complejo antena, los electrones son transferidos a la superficie externa de la membrana donde son aceptados por una sulfoferroproteína (FES), que los transfiere a otra sulfoferroproteína, la Ferredoxina (FD). De aquí los electrones son transferidos a una flavoproteína (FAD). Esta toma dos protones del medio externo formando el FADH. Finalmente el NADP⁺ acepta los electrones y un protón del FADH y forma el NADPH (ver fig.1).

Cuando se ha completado el paso de dos electrones por la cadena de agua a NADP, tres protones han desaparecido del exterior de la membrana y cuatro han aparecido en el interior del tilacoide (50,70 y 97).

4.3. SINTESIS DE ATP.

La síntesis de ATP en los organelos transductores de energía, como la mitocondria, cloroplasto y membrana plasmática en bacterias se explica principalmente a partir del modelo quimiosmótico o del gradiente electroquímico de protones, propuesto por Peter Mitchell en 1961, 1966 y 1978 (34,76, 77 y 78). Dicho modelo parte de concebir la síntesis de ATP como un proceso acoplado e interdependiente a la cadena de transporte de electrones por medio de un gradiente electroquímico de pH ($\Delta\mu H$). Esta teoría se fundamenta en la relación de la estructura-función de los sistemas membranales transductores de energía, lo que significa reacciones químicas en una membrana hidrofóbica (fase apolar) con una dirección vectorial mediada entre dos compartimentos osmóticos acuosos, (76, 77 y 78).

La base de este concepto aplicado a la fotofosforilación en cloroplastos es: a) la topología de la cadena transportadora de electrones esta organizada asimétricamente en la membrana tilacoidal, de manera que los protones se traslocan del exterior al interior de la membrana, cuando los electrones fluyen del H₂O al NADPH por reacciones de oxido-reducción, b) la membrana tilacoidal es relativamente impermeable a H⁺, -OH

y otros iones. Consecuentemente, el bombeo electrogénico de protones a través de la membrana genera un potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$), compuesto de un potencial de membrana ($\Delta\psi$) y un gradiente químico de concentración de H^+ (ΔpH), dado por la siguiente ecuación: $\Delta\mu_{H^+} = \Delta\psi + \Delta pH$ y c) el potencial termodinámico establecido por el flujo de electrones se usa para llevar a cabo la síntesis de ATP (75, 78, 83 y 88). La síntesis de ATP se lleva a cabo por una H^+ -ATP-asa reversible traslocadora de protones, que sintetiza ATP cuando los protones fluyen en sentido contrario a su formación, disminuyendo así el gradiente electroquímico y salen del lumen tilacoidal hacia el estroma (51). Esta salida de protones es proporcional a la cantidad de ATP sintetizado en una relación de 3 H^+ /ATP (32, 78, 83 y 101).

En 1965 Jagendorf y Uribe (50), demostraron que el gradiente electroquímico dirige la síntesis de ATP; la fotofosforilación en cloroplastos también se demostró después de imponer un ΔpH artificial a través de la membrana tilacoidal en la oscuridad (51). Además se ha demostrado que la transición de los estados químicamente modulados de inactivo a activo en la H^+ -ATP-asa, depende del ΔpH y también tanto del pH externo o interno, (17).

El complejo H^+-ATP_{asa} tiene la capacidad de transducir la energía osmótica del gradiente electroquímico en energía química que se almacena en el enlace anhídrido del fosfato y del ATP (32). Aunque la energía no se requiere para la fotofosforilación del ADP, la energía es utilizada para la unión de sustratos, expulsión de protones y ATP; así la asociación física entre los componentes redox y la H^+-ATP_{asa} y los eventos iniciales y finales están manejados por el potencial de membrana (61).

La hipótesis Quimiosmótica, cuenta con gran número de seguidores; sin embargo, existen otros modelos alternativos para explicar la transducción de energía en los eventos de fosforilación oxidativa y fotofosforilación. Por ejemplo, la hipótesis de Williams propone, que los protones generados a través de la cadena redox se disponen en pequeños bloques en la fase lipoproteica al interno de la membrana. El sugiere que la fotofosforilación puede llevarse a cabo por la oxidación de los hidrogeniones aproticos de la fase intramembranal que conecta a la cadena redox y la H^+-ATP_{asa} reversible. La síntesis de ATP a partir de ADP y P_i consiste en una deshidratación inducida por el sistema de trasducción localizado por el H^+ anhídrido (116, 117, 118 y 119).

La diferencia entre el modelo de Mitchell con respecto al de Williams, es la naturaleza de la traslocación de protones vectorial en el modelo quimiósmtico, mientras que por Williams es del tipo escalar; además Mitchell plantea que la energía es almacenada del $\Delta\mu_{H^+}$ entre ambas fases acuosas en ambos lados de la membrana, en tanto Williams establece que la energía se almacena al interior de la membrana, y ésta es usada in situ para la síntesis de ATP, (103).

La síntesis de ATP en cloroplastos esta catalizada por una enzima traslocante de protones, conocida como H^+ -ATPasa, la cual se constituye de una parte hidrofílica que apunta hacia el estroma, llamada factor acoplante uno (CF_1) y una porción hidrofóbica, que atraviesa la membrana tilacoidal denominada CF_0 . CF_1 contiene los sitios activos de la H^+ -ATPasa, mientras que CF_0 funciona para unir CF_1 a la membrana y como canal de protones, (88 y 99).

Estudios en micrografía electrónica muestran que CF_1 se compone de 6 unidades constitutivas, dispuestas de una forma pseudohexagonal con un núcleo central vacío (91). No obstante CF_1 es similar en estructura y función a F_1 's de otras membranas transductoras de energía (68). CF_1 es un complejo de forma esférica de 13-14 nm de diámetro y peso molecular de

400 kD compuesta de 5 subunidades llamadas: alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) y épsilon (ϵ); con pesos moleculares aproximados de: 62, 56, 39, 19 y 14 kD respectivamente, con una estequiometría de: α , β , γ , δ y ϵ , (6, 12, 16 y 82). Mientras que CF₀ no ha sido aislado como unidad completa, aunque hasta el momento se conoce que se constituye de 4 polipéptidos diferentes y su probable peso molecular sea de 100 kD (12). Estas subunidades se denominan como: I, II y III, las cuales presentan pesos moleculares de 15, 13, y 8 kD respectivamente, en cuanto a la cuarta subunidad, su existencia ha sido confirmada y su peso molecular es de 19 kD (12). La estequiometría relativa de las diferentes subunidades de CF₀, no ha sido determinada aún; sin embargo se asume que 6 unidades de la subunidad III forman un canal hexagonal, por el cual los protones cruzan la membrana con la subunidad II; se ha encontrado, además, que la subunidad I y II se pueden encontrar con una estequiometría de 0.3 y 0.7 - 0.9 respectivamente (56 y 57).

Empleando sondas de fotoafinidad análogas de nucleótidos, se ha observado que en la subunidad β de CF₁ contiene dos sitios diferentes de unión de nucleótidos, se estima un posible tercer sitio de unión, que puede ser la región bisagra entre b-a (71). El alto grado de conservación de la

estructura primaria de la subunidad β y los estudios de inhibición apoyan la idea de que en esta subunidad se encuentra el (los) sitio (s) catalítico (s). Mientras que para la subunidad α se le asigna un papel regulador del sitio catalítico o como lugar de unión de CF_1 a CF_0 (71 y 91).

La subunidad γ contiene un enlace disulfuro S1-S2 y dos residuos sulfidrilo S3 y S4. Estos residuos sulfidrilo oxidados a enlace disulfuro o entrecruzados, inducen una fuga de protones a través de la membrana tilacoidal, lo que quiere decir, que dicha subunidad tiene un papel modulador en la traslocación de protones (68). El sulfidrilo S3 es esencial para la actividad ATP sintasa mientras que la reducción de S1-S2 induce la actividad H^+ -ATPasa (56).

El papel de la subunidad δ no es bien comprendido, aunque parece que funciona parcialmente, en la unión de CF_1 - CF_0 . Además de que con ella se logran actividades máximas de fotofosforilación, no obstante no es indispensable para esta actividad, si lo es para evitar fugas de protones por CF_0 (91).

Finalmente la subunidad ϵ es inhibidor de la actividad H^+ -ATPasa, ya que la ausencia de ésta, provoca un comportamiento de CF_1 como la Ca^{++} -ATPasa (91).

La función de las subunidades de CF_0 todavía es motivo de controversia, excepto la subunidad III, que se le da papel en el proceso de traslocación de protones a través de CF_0 (56). En tanto las subunidades I y II podrían tener una función en la unión de CF_1 - CF_0 , además la subunidad II podría funcionar en el ensamblado de las 6 copias de la subunidad III para la constitución del canal de protones (85). Finalmente el papel del péptido IV, no es preciso, pero se dice que establece una fuerte asociación de CF_1 con CF_0 , y aun en la formación del canal en conjunción con la subunidad III (48).

4.4. FOTOSISTEMAS II Y I.

El fotosistema II en algas y plantas, se considera la entidad estructural constituida de proteínas, acarreadores electrónicos y pigmentos (fig.4); el cual es capaz de absorber la luz, oxidar agua y liberar Oxígeno, reducir la plastoquinona y generar una diferencia transmembranal electroquímica compuesta de un $\Delta\psi$ y de un $\Delta\mu H^+$ importante para la síntesis de ATP en cloroplastos (90 y 113).

El primer paso en la transformación de la energía luminosa, es la absorción de la luz y la conversión de la energía de excitación por un gran número de moléculas de clorofila y pigmentos accesorios, la energía absorbida es transferida de molécula en molécula de pigmento antena, hasta que alcanza un dímero de clorofila conocido como P-680 o centro de reacción, este es un sistema complejo de pigmentos y proteínas del FS-II (23,48 y 107).

FOTOSISTEMA II

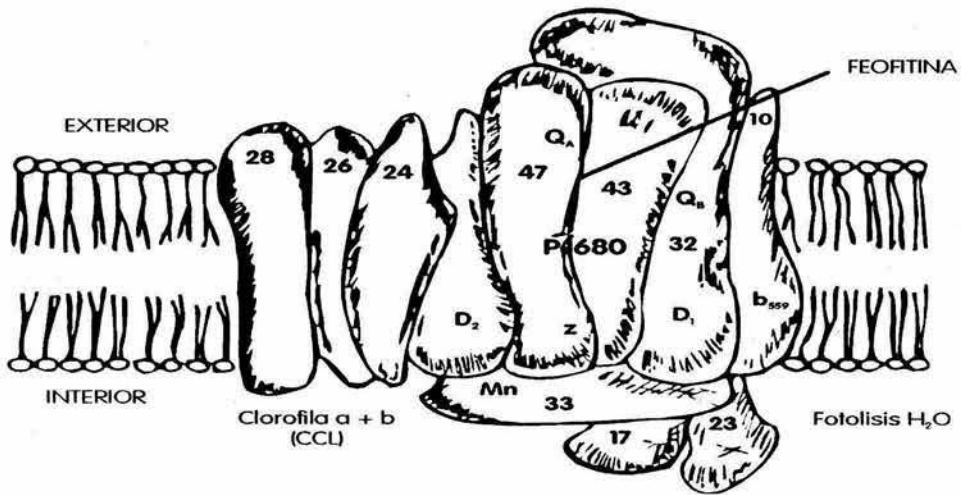
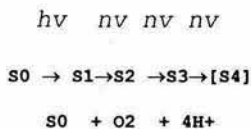


Figura 3.- Estructura topográfica del FS II. sustancialmente se conforma por 11 péptidos que constituyen el complejo liberador de Oxígeno, el complejo cosechador de luz, el centro de reacción P-680 y el complejo de aceptores electrónicos primarios (Barón,1980).

La semejanza estructural entre las clorofilas del centro de reacción y las moléculas de pigmento vecinas asegura una buena superposición espectral. Esta es necesaria para que haya una eficiente transferencia de energía y una captación adecuada de cuantos de luz por parte del centro de reacción. El P-680, reduce en primer termino al aceptor primario del fotosistema II conocido como feofitina (I') con un potencial Redox de 600 mV (58, 66 y 90). La separación de carga fotosintética implica la transferencia de electrones y produce un cambio en el paramagnetismo de las moléculas donadoras yceptoras (34). El producto de la reacción primaria es el par de radicales (P-680/I), en donde los electrones separados del P-680 y de la I no conlleva, a una pérdida inmediata de energía libre. La I transfiere de inmediato un electrón al primer aceptor estable del FS-II, llamado Qa, en el cual se estabiliza la transferencia de carga conjuntamente con una gran pérdida de energía libre (89). Qa es una molécula de plastoquinona con un potencial Redox de 200 mV, esta se encuentra fuertemente unida a un polipéptido de 47 KD del centro de reacción (66 y 90). Qa presenta un mecanismo de reducción poco común, ya que no puede ser doblemente reducida y no captura H⁺; este acarreador transfiere electrones a Qb. Esta tiene una asociación reversible con un polipéptido de 34 KDa del centro del FS-II, con una alta capacidad de recambio en la membrana tilacoide (90). Dicha quinona actúa como aceptor secundario, conector de

los eventos del centro de reacción y la transferencia de un electrón con el acervo de plastoquinonas libres en la membrana controla y permite la transferencia de un par de electrones y dos protones del estroma al lumen tilacoidal (90).

Por otro lado, dentro del mismo Fotosistema II, se lleva a cabo la oxidación de dos moléculas de agua con la liberación de Oxígeno molecular, donando 4 electrones a la cadena redox y un depósito de 4 H⁺ en el lumen tilacoidal en la fotólisis del agua. Pierre Joliot & Basel Kok en 1975 (53 y 115), observaron que en los cloroplastos sometidos a oscuridad seguido de iluminación con una serie de cortos destellos de luz que el Oxígeno liberado por destello no era constante pero mostró una periodicidad. Estos resultados les permitieron proponer un mecanismo de liberación de Oxígeno con 5 estados discretos de oxidación del enzima que fotolisa el agua de forma lineal (S₀, S₁, S₂, S₃, S₄), como se observa en el siguiente esquema:



Estados S del reloj de Oxígeno

Los electrones pasan de un aceptor secundario de electrones del FS-II (Q_B) a un acervo de plastoquinonas los cuales aparentemente estan asociados en un complejo con un cit-b, un centro fierro-asufre, cit-c y un cit-f. Los electrones pasan de este complejo a una proteína que contiene cobre llamada plastocianina, de aquí los electrones estan disponibles para reducir la clorofila del centro de reacción del FS-I cuando este ha sido oxidado por la luz (90).

Además en el cloroplasto se encuentra el complejo Cyt-f/b, donde su función conocida; aparentemente se presenta en dos diferentes acervos de diferente potencial Redox, lo que permite proponer como acarreador o donador a distintos niveles de la cadena de transporte de electrones (66).

Los eventos primarios en la transferencia electrónica en el FS-I, se inician con el donador primario del centro de reacción o P-700 (complejo proteína-clorofila a con 480 mV. Recientemente se ha considerado, que este donador primario puede ser un monómero o un dímero de clorofila (19 y 66). El aceptor primario de P-700 es conocido como A (1100 mV) y por medio de espectroscopia se ha propuesto que la identidad de este aceptor sea el de una clorofila a (19).

La separación de carga inicial entre P-700 y A₀ es estabilizada por medio de la transferencia de los equivalentes reductores de A₀ a un aceptor secundario denominado A₁, probablemente una semiquinona o filosemiquinona (19). A₁ a su vez cede los electrones a un grupo de 3 aceptores de centro Fe-S (FX, FA y FB) de los cuales a últimas fechas, se cree que el flujo de electrones opera de forma paralela por medio de FX hacia FA Y FB. FA y FB constituyen el aceptor final del FS-I y conjuntamente son responsables de la reducción de la ferredoxina soluble en el estroma del cloroplasto (90), y finalmente a través de una flavoproteína, cuyo cofactor es FAD y esta enzima se encuentra localizada en la superficie externa de la membrana tilacoidal conocida como Ferredoxin-NADP-oxidoreductasa que cataliza la reducción del NADP en el siguiente esquema:

FS-I

P-700---->A₀---->A₁---->FX---->(FA ó FB)---->FD---->NADPH

4.5. CLASIFICACION DE HERBICIDAS EN RELACION SU A EFECTO
 SOBRE EL APARATO FOTOSINTETICO.

Por muchos años, los herbicidas que inhiben las reacciones fotoquímicas de cloroplastos aislados comúnmente eran llamados inhibidores de la reacción de Hill, principalmente porque el efecto de los compuestos químicos era evaluado bajo condiciones desacopladas, utilizando al Ferricianuro de Potasio como aceptor electrónico. En años recientes, estudios profundos y sofisticados en torno al efecto de los herbicidas sobre las reacciones del aparato fotosintético, permitieron proponer su clasificación, como se muestra en la figura 4 (18, 22, 79, 80 y 81).

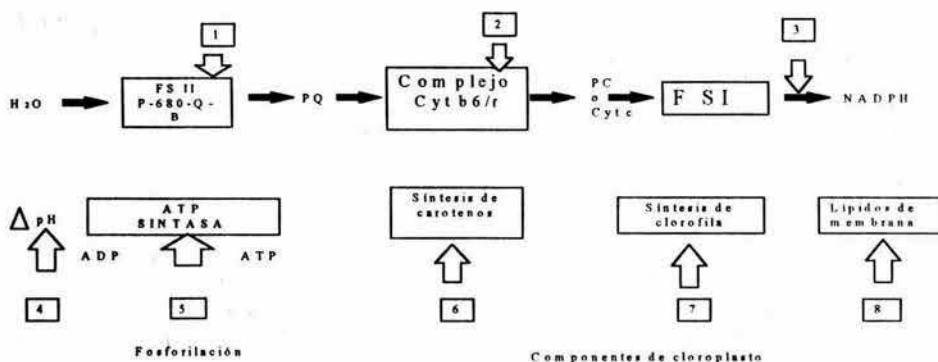


Figura 4.- Esquema del efecto de compuestos fitotóxicos sobre los componentes del aparato fotosintético. Las flechas negras indican el sentido de la cadena de transporte de electrones, las flechas blancas señalan el sitio de acción de dichos compuestos (bogger, 1986).

4.5.1. INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

Los inhibidores del transporte de electrones desplazan o inactivan a uno o mas de los acarreadores electrónicos (18). El sitio de acción de la mayoría de los herbicidas inhibidores del transporte de electrones esta referido al lado aceptor del FS-II complejo Q-b (27); de tal forma que se inhiben las reacciones acopladas al FS-II, tales como el transporte de electrones en condiciones basales, acopladas y fosforilantes teniendo como donador electrónico el agua y como aceptor electrónico al NADP⁺, PD, PMS O FeCy; inhiben la bomba de protones y las reacciones de fotofosforilación. Sin embargo, inhiben la fotofosforilación cíclica o la fotoreducción del NADP⁺ con un donador electrónico a nivel de FS-I (DAD o DPIP/ASC), algunos herbicidas representativos de este tipo son: triazinonas, uracilos, urea-carbamatos, p-alquilanilidas, p-alquiltioanilidas, bis-carbamatos, triazinas, ciclopropanocarboxamidas, (18, 22 y 81).

4.5.2. DESACOPLANTES.

Los desacoplantes son compuestos que disocian el transporte de electrones de las reacciones de fotofosforilación, abatiendo el gradiente electroquímico de protones (78). Inhiben tanto la

fotofosforilación cíclica como la no cíclica estimulando cadena de transporte de electrones como herbicidas representativos tenemos el perfluidone, (81).

4.5.3. INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGIA.

Los inhibidores de la transferencia de energía actúan directamente sobre el complejo H^+-ATP_{asa} , responsable de la fotofosforilación. Inhiben el transporte de electrones y la fotosforilación en sistemas acoplados. No obstante la inhibición del flujo electrónico se libera al agregar un desacoplante como el Cloruro de amonio (NH_4Cl^-). Se han descrito como herbicidas de este tipo a las 1,2,3-Tiadiazolil-fenilureas, (18, 22 y 81).

4.5.4. DESACOPLANTES INHIBIDORES.

Los desacoplantes inhibidores se comportan como inhibidores de la cadena de transporte de electrones y como desacoplantes. Son compuestos no específicos que a concentraciones bajas se comportan como desacoplantes, en tanto que a concentraciones altas actúan como inhibidores. La fotofosforilación acíclica y cíclica son inhibidas; mientras

que la reducción del NADP , utilizando como donador electrónico DAD o DPIP/ASC no se inhibe. Los desacoplantes-inhibidores, también inhiben fuertemente la síntesis de ATP inducida por la luz con Ditiotreitól y PMS. Herbicidas representativos son los dinitrofenoles, N-fenil carbamatos, bromofenoximas, 2,4-dinitroanilinas (81); por otro lado, se ha encontrado que el efecto de estos compuestos es dependiente del pH y la concentración (90).

4.5.5. ACEPTORES DE ELECTRONES.

Los aceptores de electrones son compuestos químicos que tienen un potencial Redox similar a los propios de la cadena de transporte de electrones con los que pueden competir para reducirse. Existen herbicidas como las sales de bipyridilio, como el paraquat y diquat, con potenciales Redox entre -300 a ---500 mV, pueden aceptar electrones compitiendo con el aceptor del FS-I (Ferredoxina), desviando la cadena de transporte de electrones. Sostienen tanto la fotofosforilación cíclica como acíclica e inhibe la fotoreducción del NADP , (18 y 81).

4.5.6. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS COMPUESTOS DE PIRIDINA.

La piridina es un compuesto análogo nitrogenado del benceno, es una molécula planar monocíclica, que cuenta con todos los rasgos de un compuesto aromático a razón de la presencia de $4n+ 2p$ deslocalizados sobre el anillo como el benceno, (1 y 42).

La piridina es una base soluble en agua y también una amina trisustituida; funde a 38°C y ebulle a 115°C ; tiene una energía de resonancia de 25 Kcal/mol y el momento dipolar es de 2.23 D. La piridina es más polar y menos simétrica que el benceno; estas diferencias se atribuyen a la presencia del átomo de nitrógeno en el anillo de piridina. Este átomo es el centro de la carga negativa y la positiva está distribuida en el resto del anillo (13).

La piridina efectúa reacciones de sustitución, el nitrógeno en el anillo incrementa la reactividad de la piridina hacia agentes electrofílicos y nucleofílicos, favoreciéndose las sustituciones en las posiciones 3 y 5 (13).

Los N-Oxidos de piridina son más susceptibles de sustitución por agentes electrofílicos. La contribución electrónica a las

estructuras resonantes depende de la naturaleza del sustituyente en la posición 4, (5).

Los momentos dipolares de los N-Oxidos de piridina 4-sustituidos, indican que el anillo puede tener un déficit de electrones y un exceso de electrones en la posición 4, (5).

El pK de la molécula aumenta en presencia de sustituyentes donadores de electrones en la posición 4, por ejemplo con el grupo (-OH); en cambio, con sustituyentes captadores de electrones, como el grupo (-NO₂) y los halógenos, el pK de la molécula disminuye (1).

5.0. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar y determinar el efecto de algunos derivados y N-óxidos de Piridina sustituidos sobre las actividades fotoquímicas del aparato fotosintético en cloroplastos de hojas espinaca (*Espinacea Oleracea*).

5.2 Objetivos específicos

1.- Evaluar y determinar el efecto de algunos derivados y N-óxidos de Piridina sustituidos sobre la síntesis de ATP, Captación de protones y reacción de Hill en condiciones básicas, acopladas y desacopladas.

2.- Discriminar y evaluar el efecto de estos compuestos sobre las reacciones parciales del Fotosistema I y II.

3.- Con base en los resultados obtenidos proponer un modelo de estructura-actividad tomando como estructura base a la Piridina.

6.0. HIPOTESIS

La intención del presente trabajo fue estudiar la posible contribución que puede tener un grupo donador de protones (ácido de Bronsted-lowry) en el anillo de Piridina en el desacoplamiento de la fotofosforilación. La hipótesis de Mitchel postula que es la capacidad que tiene un compuesto para transferir protones a través de la membrana, disociarse y regresar en forma aniónica disipando el $\Delta\mu\text{H}^+$ necesario para la fotofosforilación.

Por lo tanto nuestra hipótesis de trabajo, fue que: La presencia de un sustituyente dentro del anillo de Piridina puede modificar la acidez del grupo donador de protones causando un cambio en su capacidad para transportar protones a través de membrana , y por ende puede cambiar su potencia como desacoplante.

7.0. MATERIALES Y METODOS.

7.1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS DE CLASE II.

En esta preparación de cloroplastos, la membrana externa no tiene continuidad, lo cual permite la libre difusión de nucleótidos de adenina en los tilacoides, que son importantes para las reacciones de fotofosforilación.

De hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) adquiridas en el mercado, se aislaron cloroplastos clase II, según la clasificación de Reeves y Hall por el método reportado previamente por Solis y Lotina (98, 104 y 64). Se utilizaron hojas verdes y turgentes de espinaca previamente lavadas con agua de la llave; se les quito la nervadura central y el ápice para eliminar los cloroplastos viejos y juvenes. Después se pesaron 25 gr. de hojas y se cortaron en pequeños trozos que se colocaron en un vaso de licuadora, enfriado con anterioridad a 4° C, con 100 ml de medio de aislamiento, el cual contenía sacarosa 400 mM, KCL 100 mM, MgCl 6 H₂O 5 mM, amortiguador tricina 20 mM pH 7.6 . Se licúo por 5 seg. a velocidad máxima en una licuadora osterizer Custom Modelo L-11.

Los restos de hojas del homogenizado se removieron filtrando a través de 8 capas de gasa. El líquido filtrado se centrifugó a 3500 rpm. durante 3 minutos en una centrífuga Beckman Modelo J2-21 a 4°C. El sobrenadante se desehecho y la pastilla que contenía los cloroplastos se resuspendió con ayuda de un pincel de cerdas finas en un volumen apropiado de medio de resuspensión (1-2 ml), con sacarosa 100 mM , KCl 100 mM , Mg Cl₂ 6 H₂O 5 mM, tricina 20 mM pH 7.6 .

Los cloroplastos se conservaron en un tubo de ensayo protegido de la luz con papel aluminio.

7.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA.

La cuantificación del contenido de clorofila en los cloroplastos aislados, se llevó a cabo conforme lo propuesto por Strain (105), para lo cual se requiere de la extracción de la clorofila en un solvente orgánico (acetona 80%); prosiguiendo hacer una dilución 1:100 para su lectura al espectro tanto de la *clorofila a* como la *b* a 645 y 663 nanómetros (nm) respectivamente y por medio de sus coeficientes de extinción de cada clorofila se determinó su

respectivamente y por medio de sus coeficientes de extinción de cada clorofila se determinó su concentración, mediante la siguiente formula: $chl = [8.05 (A_{663 \text{ nm}}) + 20.29 (A_{645 \text{ nm}}) (100)] = \text{mg} \cdot \text{chl/ml}$; donde A es la absorbancia a las longitudes de onda indicadas.

7.3 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.

En la cadena fotosintética de organismos oxigénicos el donador primario de electrones es el agua y el aceptor final es el NADP^+ . Por cada mol de agua que cede dos moles de electrones al sistema oxidoreductor de la cadena fotosintética, se liberan dos moles de protones al medio interno del tilacoide y 0.5 moles de Oxígeno.

En los cloroplastos de clase II se pierde la continuidad de la cadena óxido-reductora durante el aislamiento, ya que tanto la ferredoxina, que es una proteína extrínseca de la membrana, y el NADP^+ son solubles al agua y debilmente se unen a la membrana, quedando libres en el homogenizado. Por ello es indispensable agregarle a nuestra preparación un aceptor de electrones artificial, como metil viologeno (MV), que acepta electrones a nivel de FS-I, y se observa un consumo neto de Oxígeno. Esto se debe a que por cada 1/2 mol de Oxígeno producido al lizar el agua, se reduce una mol de MV, la cual

reacciona con una mol de Oxígeno molecular generandose una mol de agua oxigenada, (69).

Se determinó el transporte de electrones acíclico en condiones basales (teb), fosforilantes (tef) y desacopladas (ted) de agua a MV (reaccion de Hill), midiendo la liberación de Oxígeno de la fotólisis del agua en función del tiempo con un electrodo de Oxígeno tipo Clark (33).

El dispositivo empleado consta de un proyector Prodavit Modelo RC con una lampara de 500 W. que incide luz saturante sobre una lente de Izawa (CuSO₄ al 2%), esta lente sirve como filtro, disipa el calor y concentra la luz en la camara de reacción, la cual aloja la muestra a ensayar que se encuentra en agitación constante.

El electrodo de Oxígeno en contacto con la muestra esta conectado a un monitor de Oxígeno YSI Modelo 53, que a su vez está conectado a un graficador Beckman Recorder a 1 Volt. El oxímetro relaciona proporcionalmente la corriente generada en la reacción de Hill y registra con la concentración de Oxígeno en el medio de reacción. Si hay un cambio en la concentración de Oxígeno se registra una pendiente proporcional a la taza de liberación o consumo de Oxígeno.

La mezcla de reacción para medir el t_{eb} es de 3 ml de medio con KCl 100 mM, MgCl₂ 6 H₂O 5 mM y amortiguador HEPES 10 mM pH 7.0; cloroplastos (0.020 mg de clorofila por ml aproximadamente), 30 μ l de MV 5 mM y concentraciones crecientes del compuesto a ensayar (0-600 μ M) previamente disuelto en el medio de reacción; para el t_{ea} se agregan 30 μ l de difosfato de adenosina (ADP) 100 mM y 30 μ l de fosfato diácido de potasio (Pi) 100 mM; finalmente a la muestra en condiciones fosforilantes se le adicionan 3 μ l de cloruro de amonio (NH₄Cl) 1 M, con el cual se evaluó el t_{ed} , (95).

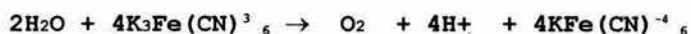
7.4 DETERMINACION DE REACCIONES PARCIALES DE FOTOSITEMA I Y II.

Para evaluar las reacciones parciales correspondientes al FS-I y FS-II, se usó el mismo dispositivo, tipo de muestra y cantidad de cloroplastos que se utilizaron para la reacción de Hill (H₂O \rightarrow MV). Para FS-I se agregó además ASC. 400 μ M, DAD 50 μ M disuelto en etanol, DCMU 6 μ M disuelto en etanol al 10% y MV; mientras que para el FS-II se agregó al medio de reacción DAD 50 μ M, Ferricianuro de Potasio 400 μ M y DIMB 1.5 μ M disuelto en un volumen mínimo de etanol. Este compuesto se sintetizó conforme el método de Gilman (35), en el laboratorio de Química Organica a cargo del Dr. Gustavo A. Garcia de la

Mora de la Unidad de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Para obtener una relación cuantitativa de las pendientes de liberación o consumo de Oxígeno con la velocidad del transporte de electrones, se compara con un sistema de flujo de electrones ya conocido como el del Ferricianuro de Potasio (FeCy), donde su estequiometría de reducción es de un electron por mol de FeCy, como se muestra en el siguiente esquema:

Cloroplastos



luz

Los resultados se obtienen midiendo la distancia recorrida por un trazo con cloroplastos y 15 μl de Ferricianuro de Potasio 30 mM (450 μMoles de electrones a reducir); por otro lado se mide la distancia que alcanza un trazo problema a un intervalo de tiempo expresado en horas, tomando en cuenta que la velocidad de la carta es de 2.5 cm por minuto. La distancia del trazo problema se relaciona con la distancia recorrida por el trazo con FeCy, y los datos se convierten a μMoles de electrones/hr, y se divide el producto entre los mg de clorofila utilizados para evaluar el trazo; finalmente el

resultado es: $\mu\text{Moles de electrones/mg Chl}\cdot\text{hr}$, o sea la velocidad del flujo de electrones de la reacción de Hill y reacciones parciales (63).

7.5 SINTESIS DE ATP POR CAMBIO DE pH.

Los nucleótidos 5 difosfórico y trifosfórico son ácidos relativamente fuertes y se disocian en tres y cuatro protones respectivamente (61).

En las células intactas, el ATP y ADP se hallan presentes en gran parte como complejos, esto es debido a la alta afinidad de los grupos pirofosfato por los cationes divalentes Mg-ATP y Mg-ADP (61). El pKa para el complejo Mg-ATP es de 4.97 mientras que para el complejo Mg-ADP es de 5.13. Conociendo estos valores de pKa y las constantes de disociación ácida del fosfato, podemos calcular la carga neta para el ATP, ADP, fosfato y sus complejos en función del pH (63). Tomando en cuenta que durante la síntesis de ATP, se consume un número de protones NH^+ que depende de la carga que presenta el ATP, ADP y fosfato, así como los complejos de estas especies químicas con iones divalentes y si sabemos la concentración óptima de Mg^{++} en nuestras condiciones experimentales que es de 5 mM y la

de K de 100 mM y el rango de pH en el queremos ensayar esta entre 6.5 y 8.5, podemos determinar el valor de NH^+ , (63).

El dispositivo empleado para medir la síntesis de ATP consta de un microelectrodo combinado Corning Scientific Instrument Modelo 12 de escala expandida. Este potenciómetro se conecta a un graficador Beckman Recorder a 0.010 Volts, que registra el cambio de pH generado por la luz.

La mezcla de reacción para evaluar la síntesis de ATP es de 3 ml de medio de reacción con KCl 100 mM, MgCl_2 6 H_2O 5 mM, amortiguador tricina 1 mM pH 7.0; cloroplastos (40 mg·Chl/ml aproximadamente) 30 μl de MV 5 mM y concentraciones crecientes de compuesto a ensayar previamente disuelto en el medio de reacción, (63).

Antes de cada ensayo se ajusta en la obscuridad el pH a 7.0 con HCl o KOH. Se recomienda que para llevar a cabo esta acción, se cuente con una serie de soluciones tanto de ácido como de base entre 0.001-0.5 N.

Una vez completa la mezcla de reacción, se ilumina la muestra y se mide el cambio de pH en función del tiempo (2.5 cm/min. vel. de la carta), dentro del rango de pH 7.0-7.2. Se apaga la lámpara a que se estabilice el pH, para titular dicho

cambio observado por la síntesis de ATP, con 5 μ l de KOH 0.1 N (0.050 meq H^+), (25).

Con base a esto, se puede calcular $\Delta[H^+]/\Delta T$, este valor depende del nH^+ (que es de 1 para pH 8.0 9 y de 0.7 a pH 7.0), lo que convertimos en ATP/mg·Chl·hr, lo que representa la velocidad de la fotofosforilación (63).

La fuente de iluminación, así como las condiciones de la cámara de reacción son las mismas a las empleadas en la determinación del transporte de electrones.

7.6 BOMBA DE PROTONES H^+ .

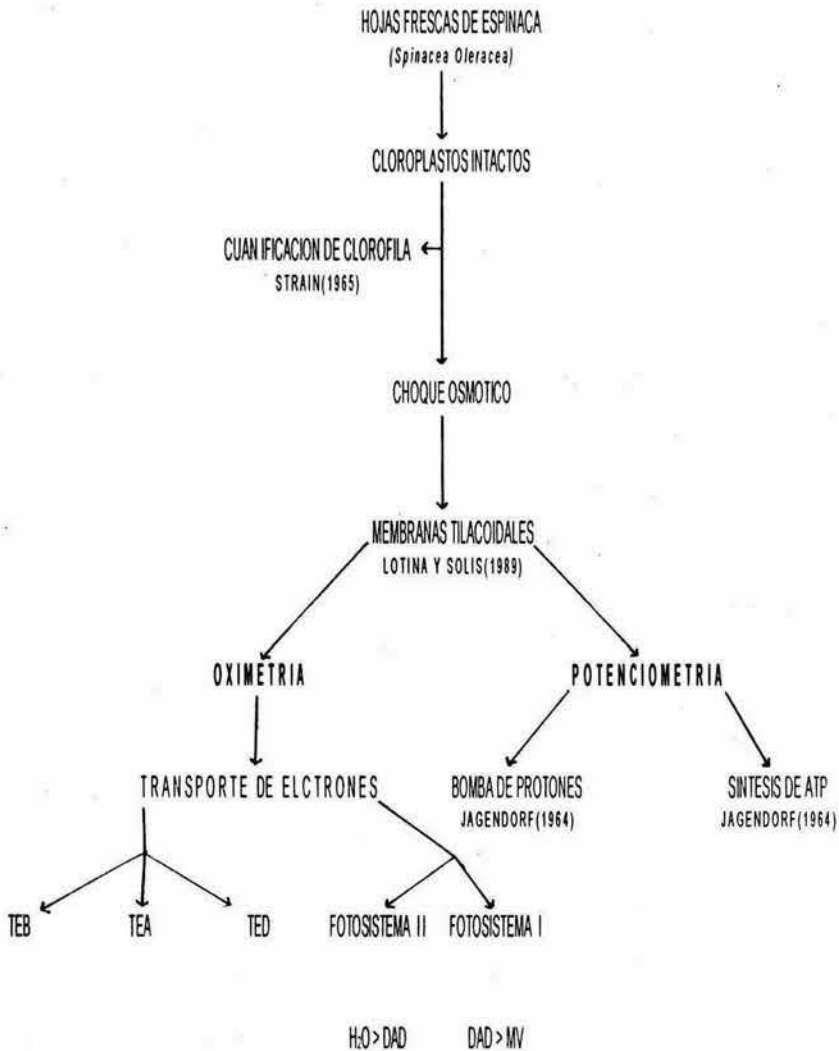
El flujo de protones al interior de la membrana del tilacoide esta acoplado al transporte de electrones y a la síntesis de ATP en el cloroplasto. Este transporte de electrones mediado por la luz, resulta en un incremento exterior del pH (86). El dispositivo, así como la fuente de iluminación y las condiciones de la cámara de reacción, son las mismas a las utilizadas en la evaluación de la síntesis de ATP.

La mezcla de reacción para medir la bomba de protones contiene KCl 100 mM, MgCl₂ 6·H₂O 5 mM, amortiguador tricina 1 mM pH 7.0; cloroplastos (40 mg Chl/ml aproximadamente), 30 µl de MV 5 mM y concentraciones crecientes del compuesto a ensayar (0-600 mM) previamente disuelto en el medio de reacción.

Los resultados de las velocidades de captación de protones se muestran en µeq H⁺/mg Chl·hr. En cada uno de los ensayos se hace una proporción entre la distancia recorrida por un trazo de bomba de protones (H⁺) en función del tiempo (2.5 cm/min vel. de la carta) y la distancia que alcanza 1.5 µl de KOH 0.1 N (0.015 meq H⁺) al titular cuando se apaga la luz, (25).

Los datos presentados en cada reacción, son el resultado de un promedio de 3 pruebas para cada ensayo.

7.7 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO METODOLOGICO.



UNIDADES T.E. = $[\mu \text{ Eq e-}/\text{mg Chl} \cdot \text{hr}]$

Bomba de H^+ = $[\mu \text{ Mol H}^+/\text{mg Chl} \cdot \text{hr}]$

Síntesis de ATP = $[\mu \text{ Mol ATP}/\text{mg Chl} \cdot \text{hr}]$

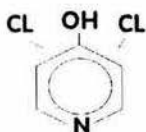
Derivados de Piridina



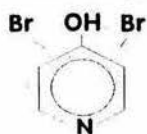
Piridina



4-hidroxipiridina



3,5-dicloro-4-hidropiridina

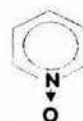


3,5-dibromo-4-hidropiridina

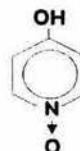


Mercantopiridina

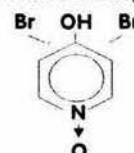
N-Oxidos de Piridina



N-Oxido de Piridina



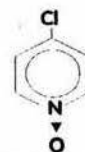
4-hidroxi-N-oxido de piridina



3,5-dibromo-4-hidroxi-N-Oxido de piridina



4-nitro N oxido de piridina



4-cloro-N-oxido de piridina

8.0. RESULTADOS.

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto tanto de una serie de compuestos derivados de Piridina (Piridina, MP, HP, DCHP Y DBHP) como otra de N-óxidos de Piridina sustituidos (OP, HOP, NOP, COP Y DBHOP) sobre las actividades fotoquímicas del aparato fotosintético en cloroplastos tipo II aislados de hojas de espinaca a concentraciones crecientes de 0-600 μM de compuesto, a pH 7.0, (ver fig.6).

Las actividades fotoquímicas que se midieron fueron: la síntesis de ATP, Bomba de protones (H^+) y la cadena de transporte electrones basal, acoplado y desacoplado.

La clasificación del efecto de esta serie de compuestos se realizó conforme a los criterios descritos por Moreland (79, 80 y 81). Una vez identificados los compuestos inhibidores de la cadena de transporte electrónico, la siguiente meta fue discriminar su región de acción entre el FS-I (DAD/ASC \rightarrow MV) y el FS-II ($\text{H}_2\text{O}\rightarrow$ DAD/FeCy) en presencia de DCMU y DBMIB respectivamente como inhibidor del fotosistema.

Esta reportado en la literatura que los compuestos 4-hidroxi sustituidos, Fluoralquil, así como los 2-alkil N-óxidos de Piridina, se comportan como inhibidores del transporte de electrones, interactuando con el sistema fosforilante de cloroplastos en el caso de los N-óxidos, (62, 111 y 114). Sin embargo, el efecto tanto de los derivados de Piridina, como de los N-óxidos de Piridina no ha sido caracterizado totalmente; por lo que el objetivo del presente trabajo fue valorar acuciosamente el efecto de estas dos series de compuestos sobre las actividades fotosintéticas ya mencionadas.

Por último con base a los resultados obtenidos en este trabajo sobre las actividades fotoquímicas ensayadas para cada compuesto, se estableció una relación de estructura-actividad partiendo de la Piridina como estructura madre.

La naturaleza de intermediario que acopla la cadena de transporte de electrones a la formación de ATP no se conoce con certeza, ni existe un mecanismo general para el desacoplamiento, aunque se ha sugerido, que los desacoplantes actúan como protonóforos (51, 54 y 78). En consecuencia los desacoplantes, tienen un protón dissociable y actúan como conductores de protones a través de las membranas transductoras. Su acción se cree que es el resultado del abatimiento del gradiente de pH (ΔpH), causado por la

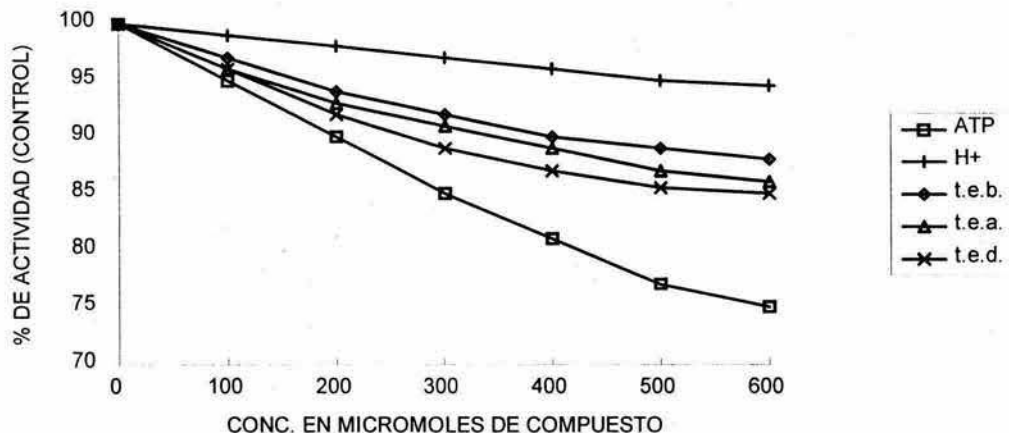
transferencia de H^+ a través de la membrana. Alternativamente, los desacoplantes pueden tener una interacción directa con alguna proteína involucrada en la fosforilación (43 y 44).

Otros mecanismos de desacoplamiento incluyen el incremento de la permeabilidad de la membrana a H^+ por detergentes (86). La remoción de CF_1 con EDTA, (10) y el entrecruzamiento de dos grupos intercambiadores de protones $-SH$ en la subunidad γ (29, 66 y 82).

Los desacoplantes de la fotofosforilación independientemente de su estructura y mecanismo de desacoplamiento causan:

- a) Incremento del transporte de electrones basal y fosforilante.
- b) Disminución de la fuerza protón motriz (ΔP).
- c) disminución de la Síntesis de ATP.
- d) Reversión del efecto de los inhibidores de la transferencia de energía sobre el transporte de electrones (88).

8.1. EFECTO DE LOS DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOTOQUÍMICAS DE CLOROPLASTOS.

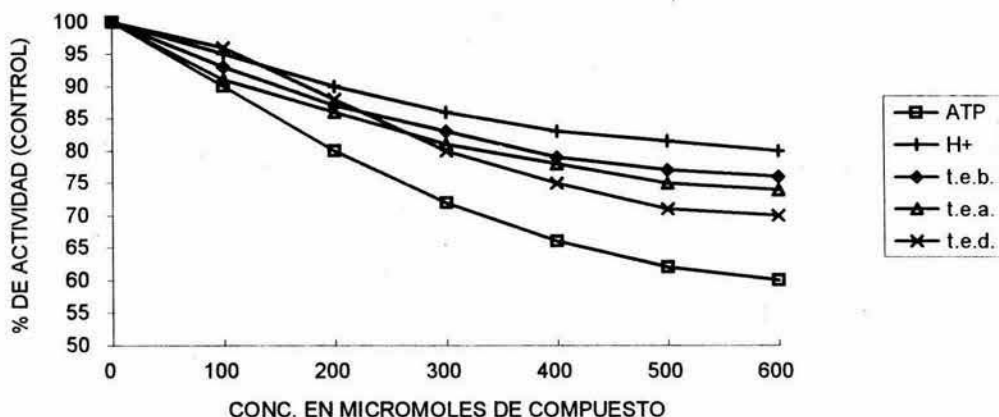


Gráfica No. 1. Efecto de la Piridina sobre las actividades fotosintéticas estimadas de $H_2O \rightarrow MV$ respecto a su control. Síntesis de ATP ($0 = 108 \mu\text{mol de ATP/mg Chl}\cdot\text{hr}$), Bomba de protones H^+ ($0 = 73 \mu\text{mol de } H^+/\text{mg Chl}\cdot\text{hr}$). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con $NH_4Cl \text{ } 3 \text{ mM}$ presentaron valores de actividad control de $124, 168$ y $373 \mu\text{Eq de } e^-/\text{mg Chl}\cdot\text{hr}$ respectivamente; y una desviación estandar promedio de 1.46 .

8.1.1 PIRIDINA: La caracterización del efecto de la Piridina a concentraciones crecientes ($0-600 \mu\text{M}$) sobre la síntesis de ATP, H^+ , teb, tea y ted se observa en la gráfica 1 y

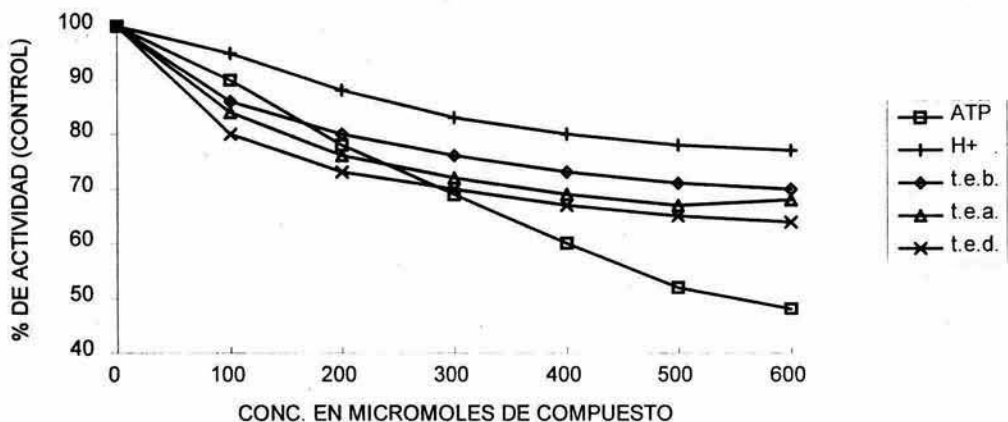
tabla I. Dicho compuesto muestra un efecto inhibitorio de las actividades antes mencionadas en un 25, 6, 12, 14 y 15 por ciento respectivamente; debido a que esta inhibe todas las reacciones asociadas a la fotosíntesis, se clasifica como inhibidor del transporte electrónico.

Un inhibidor de la cadena de transporte de electrones se caracteriza por presentar un decremento en la síntesis de ATP, captación de protones al lumen tilacoidal, así como la inhibición de la transferencia electrónica en presencia de estimulantes del flujo electrónico (desacoplantes), como el FCCP o CCCP (81).



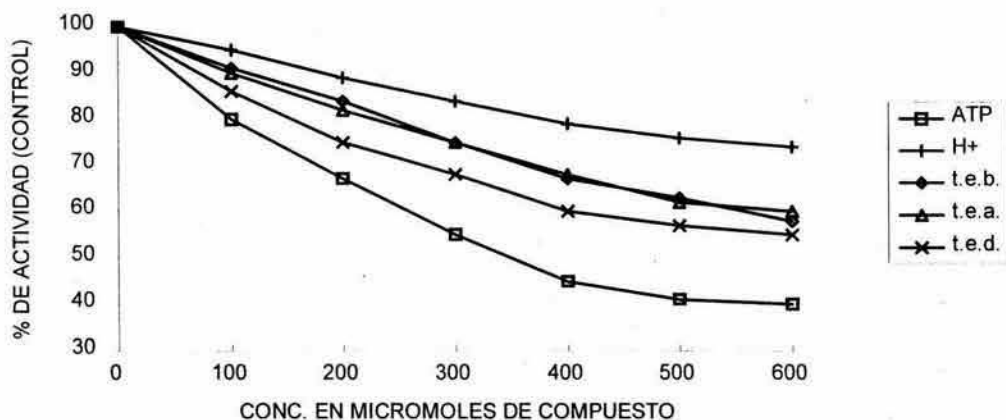
Gráfica No. 2. Efecto de la HP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de H₂O→MV respecto a su control. Sintesis de ATP (0= 130 μmol de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones H⁺ (0= 101 de μmol H⁺/mg Chl·hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH₄Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 152, 259 y 450 μEq de e⁻/mg Chl·hr respectivamente; y una desviación estandar promedio de 1.20.

8.1.2 4-Hidroxipiridina (HP): El efecto de concentraciones crecientes de HP de 0-600μM, se observa en la gráfica 2 y tabla I; los valores de las velocidades obtenidas en todos los casos sobre las diferentes actividades fotoquímicas muestran la inhibición de la síntesis de ATP (40%), H⁺ (20%), teb (24%), tea (26%) y ted (30%). Debido a que la HP inhibe todas las actividades fotoquímicas ensayadas se clasifica como un inhibidor de la cadena redox de la reacción de Hill.



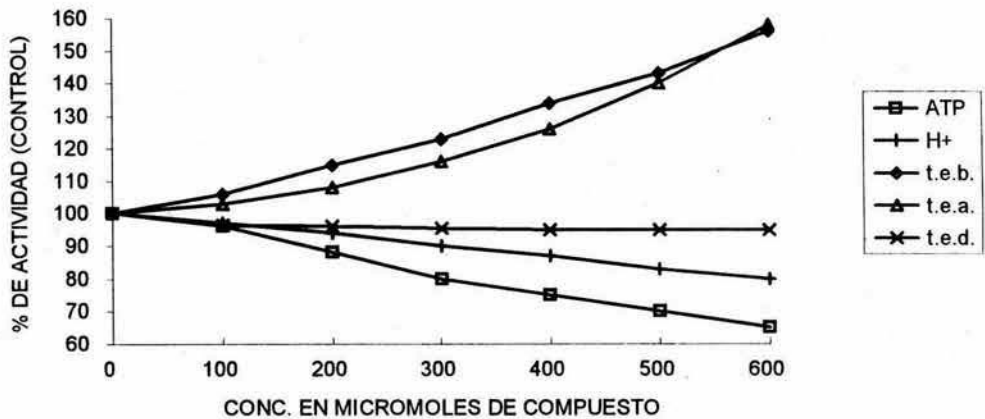
Gráfica No. 3. Efecto de la DCHP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de $H_2O \rightarrow MV$ respecto a su control. Síntesis de ATP ($0=115 \mu\text{mol}$ de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones H^+ ($0=101$ de $\mu\text{molH}^+/\text{mg Chl}\cdot\text{hr}$). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH_4Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 89 , 189 y $267 \mu\text{Eq}$ de $e^-/\text{mg Chl}\cdot\text{hr}$ respectivamente; y una desviación estandar promedio de 1.13 .

8.1.3. 3,5-dicloro-4-hidroxipiridina (DCHP): La evaluación de las actividades fotoquímicas en presencia de DCHP a concentraciones de $0-600 \mu\text{M}$ (gráfica 3 y Tabla I), muestra la inhibición de la síntesis de ATP (52%), H^+ (23%), teb (30%), tea (32%) y ted (36%); los resultados indican que actúa como inhibidor del transporte de electrones.



Gráfica No. 4. Efecto de la DBHP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de H₂O→MV respecto a su control. Síntesis de ATP (0=117 μmol de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones μmol H⁺ (0= 103 μmol de H⁺ /mg Chl·hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH₄Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 127, 250 y 375 μEq de e-/mg Chl·hr respectivamente; y na desviación estandar promedio 1.34 .

8.1.4. 3,5-dibromo-4-hidroxipiridina (DBHP): En la gráfica 4 y tabla I se muestra el efecto de la DBHP variando la concentración de 0-600 μM, la cual promueve la inhibición de la síntesis de ATP (60%), H⁺ (26%), teb (42%), tea (40%) y ted (45%). Estos datos nuevamente indican que este derivado de Piridina se comporta como inhibidor enzimático del flujo de electrones en la fotosíntesis.



Gráfica No. 5. Efecto de la MP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de H₂O→MV respecto a su control. Síntesis de ATP (0=161 μmol de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones μmol H⁺ (0= 160 μmol de H⁺ /mg Chl·hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH₄Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 122, 190 y 355 μEq de e-/mg Chl·hr respectivamente; y una desviación estandar promedio 1.15 .

8.1.5. Mercaptopiridina (MP): La acción de la MP sobre la fotosíntesis se muestra en la gráfica 5 y tabla I, en la cual se observa la inhibición de la síntesis de ATP (35%) y captación de protones (20%), mientras que para el teb y tea induce un incremento del 56 y 58 por ciento respectivamente, por lo que respecta a el ted, la MP no se modifica la tasa de flujo electrónico.

Los efectos mostrados por la MP la clasifican como un desacoplante, ya que MP incrementa la conductancia de H^+ a través de la membrana, abatiendo el ΔpH y estableciendo un equilibrio ácido-base que desacopla la cadena de transporte electrónico a la síntesis de ATP; teniendo como respuesta un incremento en la velocidad de flujo electrónico e inhibición de la fotofosforilación debido a la disminución de la Δp .

COMPUESTO	ATP	H+	teb	tea	ted
PIRIDINA	25	5	12	14	15
HP	40	20	24	26	30
DCHP	52	23	30	32	36
DBHP	60	26	42	40	45
MP	35	20	+56	+58	5

Tabla I.- Porcentaje de inhibición máximo por la serie de compuestos derivados de Piridina sobre las actividades fotosintéticas de síntesis de ATP, Captación de protones, transporte de electrones basal (teb), acoplado (tea) y de sacoplado (ted) a una concentración de 600 μM , pH 7.0 y 0.120 mg Chl/ml·hr.

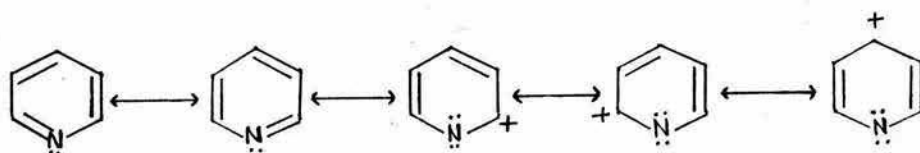
8.1.6 DISCUSIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS DERIVADOS DE PIRIRDA SOBRE EL APARATO FOTOSINTETICO.

Basados en esta hipótesis de trabajo, es posible suponer que un grupo menos ácido sería más fácilmente protonable en el lumen tilacoidal ácido, y por lo tanto un mejor candidato como desacoplante.

Los resultados muestran, que a excepción de la MP, la HP, DCHP, DBHP y la Piridina misma, se comportan como inhibidores del transporte de electrones independientemente del carácter ácido-base del grupo -OH que se encuentra en la posición 4 del anillo.

Estos resultados concuerdan, en cuanto a la inhibición observada, con los reportados por Trebst (111), para derivados 4-OH tetrasustituídos de Piridina.

La mayor potencia inhibitoria de la reacción de Hill, parece depender de una disminución en el efecto inductivo del -OH en el anillo, promovido por la presencia de halógenos como el Cloro (-Cl) y Bromo (-Br) en las posiciones 3 y 5 y por la deslocalización de la nube electrónica por resonancia, según el siguiente esquema:



Por otra parte, parece existir una contribución del tipo estérico del grupo en posición 3 y 5 , que favorece el carácter inhibitorio del compuesto, en vista de que la DBHP presenta una mayor inhibición a su correspondiente la DCHP (tabla II); también es probable que la mayor inhibición de la DBHP, se deba a una mayor lipofiliidad sobre el dominio de inhibición. Por lo que en este tipo de estudios es importante calcular el carácter anfipático y/o lipofílico del compuesto, así como determinar los parámetros eléctrico, estérico y el carácter ácido del grupo -OH en la posición 4, aunque no se descarta que con otro grupo de sustituyentes (alquílicos) pudiera cambiar sus propiedades inhibitorias a respuesta desacoplante.

El modelo global de inhibición de la cadena de transporte electrónico por la HP, DCHP Y DBHP es similar al registrado por la TEBHP, TRBFHP, TECHP, DBDFHP, DFBIHP Y DFDIHP (115); así como el registrado para los herbicidas comerciales

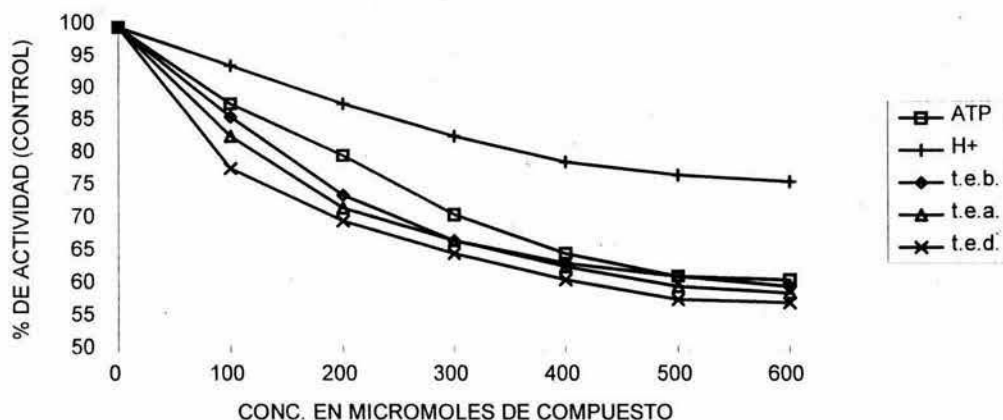
Haloxidine (DCDFHP), Pyriclor (TRCHP) y gran numero de fenoles (22, 37 y 73).

Sin embargo, los datos de la concentración en la cual se alcanza el 50% de inhibición de la cadena de transporte electrónico (I_{50}) para las HP's tetrasustituidas oscila entre 10 y 75 μM ; mientras que para las HP, DCHP Y DBHP su I_{50} se encuentra por arriba de 600 μM .

La sustitución por halógenos en la estructura de la HP, es importante para el incremento de la capacidad inhibitoria de la reacción de Hill. No obstante la disustitución en la posición 3 y 5 presenta un I_{50} considerablemente mayor en relación a sus correspondientes tetrasustituidos, probablemente a razón de una mayor liposolubilidad de estos últimos en la membrana, permitiendo la inhibición de Qb.

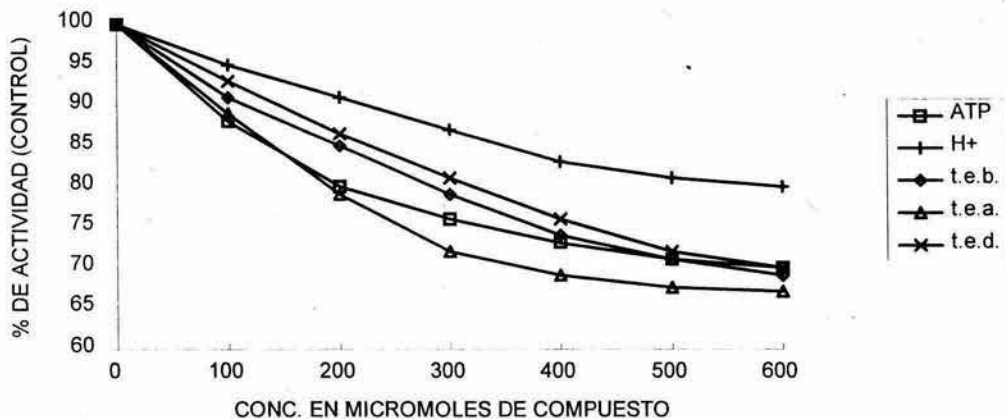
Los resultados obtenidos con la MP no son comprensibles en el contexto de la presente discusión, por lo que se propone que en estudios futuros, se desarrolle un serie de compuestos de Mercaptopiridina sustituidos, para discriminar el efecto de su protón disociable en la valoración del desacoplamiento.

8.2 EFECTO DE LOS N-ÓXIDOS DE PIRIDINA SUSTITUIDOS SOBRE EL APARATO FOTOSINTETICO.



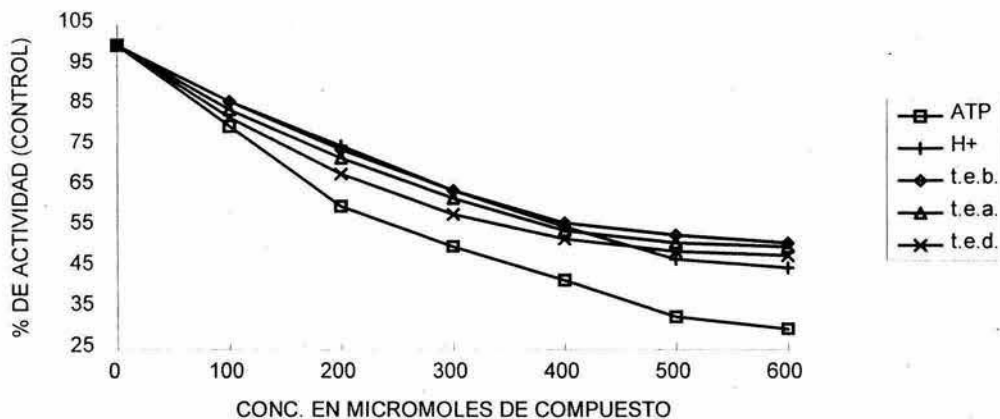
Gráfica No. 6. Efecto de la OP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de $H_2O \rightarrow MV$ respecto a su control. Síntesis de ATP ($0 = 130 \mu\text{mol}$ de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones H^+ ($0 = 110 \mu\text{mol}$ de H^+ /mg Chl·hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con $NH_4Cl \cdot 3$ mM presentaron valores de actividad control de 121, 185 y 212 μEq de e^- /mg Chl·hr respectivamente y una desviación estandar de 1.00.

8.2.1. N-óxido de Piridina (OP): La OP a una concentración de 600 μM , según se observa en la gráfica y tabla II, inhibe la síntesis de ATP (39%), Bomba de H^+ (24%), teb (40%), tea (41%), ted (42%); estos datos son congruentes con un efecto de inhibición del transporte de electrones.



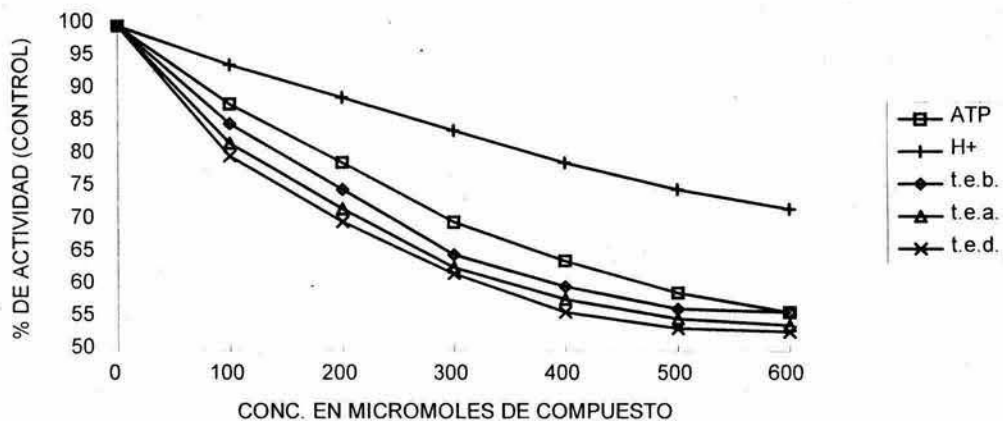
Gráfica No. 7. Efecto de la HOP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de $H_2O \rightarrow MV$ respecto a su control. Síntesis de ATP ($0 = 159 \mu M$ de ATP/mg Chl.hr), Bomba de protones H^+ ($0 = 109 \mu mol$ de H^+ /mg Chl.hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH_4Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 155, 310 y 466 μEq de e^- /mg Chl.hr respectivamente y una desviación estandar de 1.50.

8.2.2. 4-Hidroxi-N-óxido de Piridina (HOP): La HOP a una concentración de 600 μM , promueve la inhibición del teb (31%), tea (33%) y ted (30%), así como la síntesis de ATP y bomba de H^+ en 30 Y 20 por ciento respectivamente (gráfica 7 y tabla II); considerándose este compuesto como inhibidor del flujo electrónico.



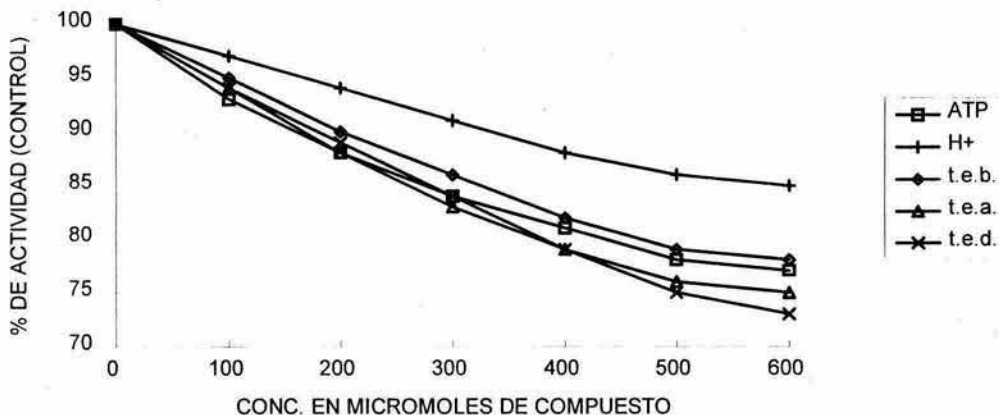
Gráfica No. 8. Efecto de la DBHOP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de $H_2O \rightarrow MV$ respecto a su control. Síntesis de ATP ($0 = 117 \mu\text{mol}$ de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones H^+ ($0 = 88 \mu\text{mol}$ de H^+ /mg Chl·hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH_4Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 117, 215 y 372 μEq de e-/mg Chl·hr respectivamente; y una desviación estandar de 2.11.

8.2.3. 3,5-dibromo-4-hidroxi-N-óxido de Piridina (DBHOP): Como se observa en su gráfica 8 y tabla II, la DBHOP a una concentración de 600 μM , presenta un marcado efecto inhibitorio de la síntesis de ATP (70%) y Bomba de H^+ (55%), así como del teb (49%), tea (50%) y ted (52%), motivo por el cual, este compuesto actúa como inhibidor del transporte de electrones.



Gráfica No. 9. Efecto de la NOP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de H₂O→MV respecto a su control. Sintesis de ATP (0= 130 μmol de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones H⁺ (0= 100 μmol de H⁺/mg Chl·hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH₄Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 144, 211 y 598 μEq de e⁻/mg Chl· hr respectivamente; y una desviación estandar de 1.51.

8.2.4. 4-nitro-N-óxido de Piridina (NOP): Según se deja ver en la gráfica 9 y tabla II, la NOP a una concentración de 600 μM inhibe la síntesis de ATP (44%), Bomba de H⁺ (28%), teb (44%), tea (44%) y ted (47%); por lo que estos resultados indican que este compuesto añadido a los cloroplastos promueve una inhibición parcial de transporte de electrones de agua a MV.



Gráfica No. 10. Efecto de la COP sobre las actividades fotosintéticas estimadas de $H_2O \rightarrow MV$ respecto a su control. Síntesis de ATP ($0 = 132 \mu\text{mol}$ de ATP/mg Chl·hr), Bomba de protones $\mu\text{mol H}^+$ ($0 = 87$ de $\mu\text{mol H}^+$ /mg Chl·hr). En tanto el teb, tea con ADP 0.1 mM y Pi 0.3 mM y ted con NH_4Cl 3 mM presentaron valores de actividad control de 127, 250 y 375 μEq de e-/mg Chl·hr respectivamente; y una desviación estandar de 1.31.

8.2.5. 4-cloro-N-óxido de Piridina (COP): El efecto que presenta la COP, a una concentración de 600 μM , se muestra en la gráfica 10 y tabla II, observándose la inhibición de la síntesis de ATP (23%), Bomba de H^+ (15%), teb (22%), tea (25%) y ted (27%), lo que indica que se trata de un inhibidor del transporte de electrones de la reacción de Hill, en donde el MV se usa como aceptor de electrones.

COMPUESTO	ATP	H+	teb	tea	ted
OP	39	24	40	41	42
HOP	30	20	31	33	30
DBHOP	70	55	49	50	52
NOP	44	28	44	46	47
COP	23	15	22	25	27

Tabla II.- Porcentate de inhibición máximo por la serie de compuestos derivados de Piridina sobre las actividades fotosintéticas de síntesis de ATP, Captación de protones, transporte de elctrones basal (teb), acoplado (tea) y desacoplado (ted) a una concentración de 600 μM , pH 7.0 y 0.120 mg Chl/ml·hr.

8.2.6. DISCUSION DE LOS EFECTOS DE LOS N-ÓXIDOS DE PIRIDINA SOBRE EL APARATO FOTOSINTETICO.

Es bien sabido, que en ciertos sistemas aromáticos, la sustitución del hidrogeno en posición *para* por un grupo electron-atractor incrementa el grado de acidez del grupo funcional en posición 1; potenciando así una actividad desacoplante o inhibitoria sobre el aparato fotosintético.

Esta idea se apoya, en los estudios realizados con gran numero de fenoles sustituidos en *para* con grupos electron-atractores (-CH, -CH=NOH, -CN, -NO₂ y -CH=O), donde se observa una actividad desacoplante (4, 36 y 37). Sin embargo se sabe que muchos de estos desacoplantes, inhiben la transferencia de electrones, en un proceso dependiente del pH y la concentración del compuesto (108). Por ejemplo, los dinitrofenoles, alquilfenoles, cianofenoles entre otros, desacoplan la cadena de transporte electrónico del cloroplasto a pH de 7.5 o pH's mas ácidos, mientras que a un pH por arriba de 8.5 se inhibe fuertemente el flujo de electrones, situación que se presenta también a una concentración elevada del compuesto; en tanto a concentraciones bajas experimentan su efecto desacoplante (21, 36, 86 y 102).

La sustitución en el anillo de Piridina, a nivel del átomo de nitrógeno por un grupo electron-atractor como el Oxígeno, tiende a incrementar el grado de acidez del -OH en *para*, por lo que teóricamente se potenciaría un efecto desacoplante o inhibitorio sobre el sistema transductor de energía fotosintético (4).

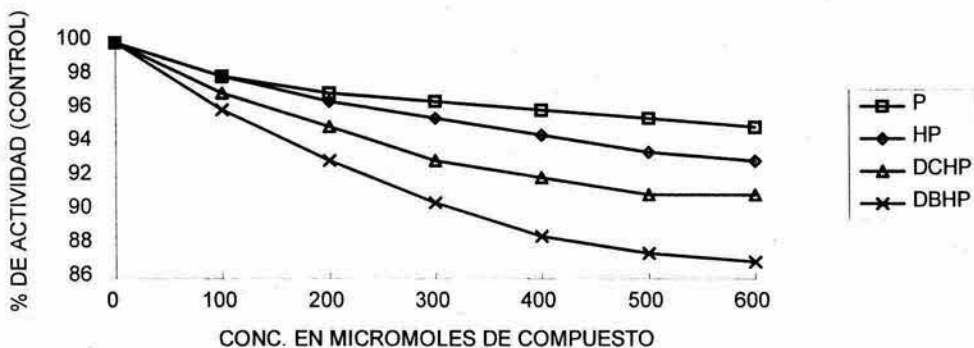
Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en torno a la serie de N-óxidos de Piridina, indican que el incremento en la acidez del -OH no posibilita un efecto desacoplante aparente a una concentración entre 100-600 μM ; al contrario, esta serie de compuestos a una concentración de 600 μM , se comportan como inhibidores de la reacción de Hill, con el siguiente orden creciente de inhibición: COP < HOP < OP < NOP < DBHOP.

La sustitución en *para* por -Cl o -NO₂, como se ve en la tabla III a una concentración de 600 μM , el -Cl muestra la menor inhibición de la serie, mientras que el grupo nitro experimenta un incremento en la inhibición en relación al -Cl y -OH. Posiblemente resultado de la mayor reactividad y capacidad que tienen los pares de electrones no compartidos del -NO₂ para formar enlaces de hidrógeno.

La sustitución en 3 y 5 por Bromo sobre la estructura de la HOP/DBHOP, potencia al compuesto con mayor capacidad inhibitoria de la serie. La presencia de un halógeno de mayor tamaño como el -Br podría posibilitar una deslocalización especial de la nube electrónica en el anillo, así como una mayor lipofilicidad sobre la membrana tilacoide; factores que permitirían una mayor reactividad y solubilidad del compuesto sobre el dominio de inhibición.

8.3. EFECTO DE LOS DERIVADOS DE PIRIDINA SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES DE FS-I Y FS-II.

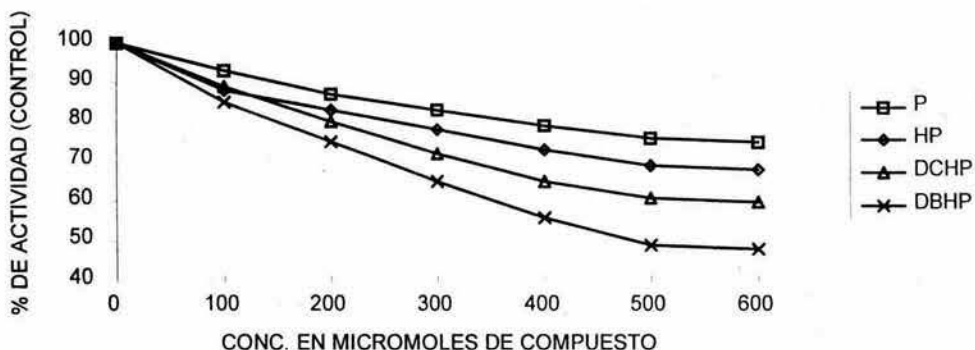
La acción de esta serie de compuestos sobre el FS-I (DAD/ASC→MV) y FS-II (H₂O→DAD/FeCy) se muestra en los gráficos 11,12 y tabla III. El efecto de los derivados de Piridina sobre el FS-I, expresa la máxima inhibición con DBHP con 13%, mientras que para la DCHP, HP y Piridina fue de 9, 7 y 5 por ciento respectivamente, esta inhibición es baja comparada con el efecto que presentan sobre la cadena redox completa de agua a MV.



Gráfica No. 11. Efecto de los compuestos derivados de piridina sobre el FS I, evaluado ASC/DAD→MV con DBMIB 1.5 μ M a un pH de 7.0. La actividad control de la Piridina, HP, DCHP y DBHP es de 548, 419, 570 y 443 μ Eq de e-/mg Chl·hr respectivamente; y una desviación estandar de 1.85.

Sin embargo esta inhibición parcial puede ser el resultado de la interacción de las HP's con el complejo cyt b/f o segmento redox P-700→FB/FA, (88 y 108).

En tanto, para el FS-II se observa una notable inhibición del flujo electrónico con estos compuestos, donde el máximo de inhibición lo tiene la DBHP con un 52%, le siguen la DCHP con 40% y la HP con 32% .



Gráfica No. 12. Efecto de los compuestos derivados de piridina sobre el FS II, evaluado de $H_2O \rightarrow DAD/FeCy$ con DCMU $3 \mu M$ a un pH de 7.0. La actividad control de la Piridina, HP, DCHP y DBHP es de 140, 156, 170 y 160 μEq de e-/mg Chl·h respectivamente; y una desviación estandar de 1.74.

Estudios de competencia inhibitoria y digestión triptica, indican que las 4-HP's tetrasustituidas inhiben el FS-II, de forma semejante al Ioxynil y BNF, (14, 111, 112). Estos fenoles enlazan a un par de proteínas de secuencia homologa de 32 (D1) y 34 KD (D2), formando parte del lado reductor del FS-II, además de los peptidos unidores de clorofila de 44 y 51 KD del FS-II, (52); por lo que la región global de inhibición de estos compuestos se encuentra entre Q_B-Q_A . Este dominio de inhibición se comparte con los compuestos del tipo de las ureas/triazinas y la mayor parte de los herbicidas comerciales, (93).

A partir de la gran cantidad de trabajos con mutantes, tratamientos con Tris 0.8 M pH 8.0, Hidroxilamina, detergentes, digestión triptica y de competencia inhibitoria, se diseño el modelo molecular de solapamiento para los compuestos del tipo urea/triazinas y fenol (112). Dicho modelo propone sitios especificos de solapamiento en un dominio común de enlace (101), donde ambas familias de compuestos inhiben el mismo sitio del lado aceptor del FS-II.

La función inhibitoria de la familia de compuestos fenolicos se encuentra en el grupo hidroxilo en I u otro semejante, que compite con el sitio de enlace de Q_B y Q_A, formando un puente de hidrogeno con el resto de Histidina (His) ligado al centro de Fe del complejo D2-D1, imposibilitando el flujo electrónico entre Q_B-Q_A (24 y 76).

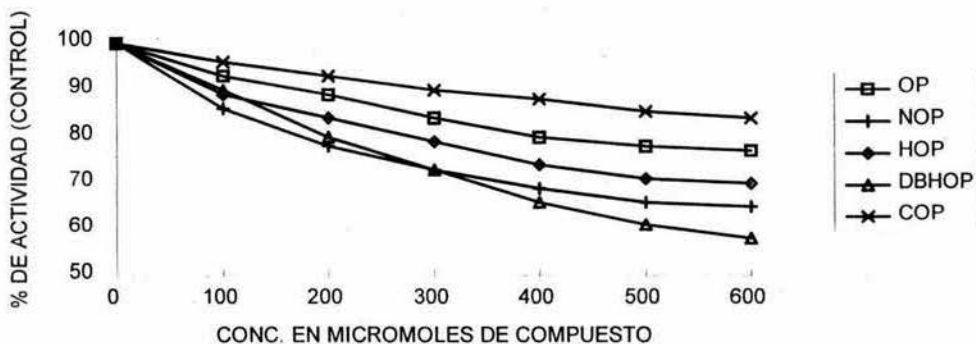
El nivel de estudio del efecto de las HP's evaluadas en el presente trabajo, a través de los ensayos de FS-I y FS-II, solo nos permiten establecer: que esta serie de compuestos son inhibidores del FS-II y que muy probablemente se unan en Q_A-Q_B al complejo óxido-reductor D2-D1.

COMPUESTO	FOTOSISTEMA I ASC/DAD→MV	FOTOSISTEMA II H ₂ O→DAD/FeCy
PIRIDINA	5	25
HP	7	32
DCHP	9	40
DBHP	13	52

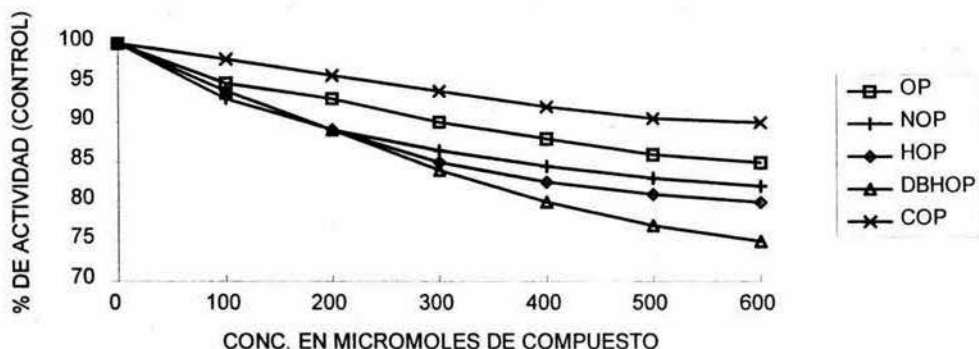
Tabla III. Por ciento de máximo de inhibición de las reacciones parciales asociadas al FS I Y FS II por derivados de Piridina a una concentración de 600 μ M, pH 7.0 y 0.120 mg Chl/ml·hr.

8.4. EFECTO DE LOS N-OXIDOS DE PIRIDINA SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES DE FS-I Y FS-II.

Como se muestra en las gráficas 13,14 y tabla IV, los N-óxidos de Piridina a concentraciones crecientes de 100-600 μM experimentan un efecto inhibitorio de las reacciones parciales de FS-I y FS-II. En el caso del FS-II la máxima inhibición del flujo de electrones corresponde a la DBHOP (25%), le siguen la HOP (20%), NOP (18%), OP (15%) y COP (10%). En tanto para el FS-I el orden de inhibición del transporte de electrones enlistados en forma descendente es: DBHOP (42%), NOP (35%), HOP (30%), OP (23%) y COP (16%).



Gráfica No. 13. Efecto de los N-óxidos de piridina sobre el FS I, evaluado ASC/DAD \rightarrow MV con DBMIB 1.5 μM a un pH de 7.0. La actividad control de la OP, HOP, DBHOP, NOP Y COP es de 426, 517, 499, 408 Y 457 μEq de e^-/mg Chl:hr respectivamente; y una desviación estandar de 1.96.



Gráfica No. 14. Efecto de los compuestos derivados de piridina sobre el FS II, evaluado de $H_2O \rightarrow DAD/FeCy$ con DCMU $3 \mu M$ a un pH de 7.0. La actividad control de la OP, HOP, DBHOP, NOP Y COP es de 137, 175, 129, 164 y 156 μEq de $e^-/mg \text{ Chl} \cdot hr$; y na desviación estandar de 1.88.

Como se puede ver en la tabla IV, la sustitución en 3 y 5 por -Br sobre la HOP, rinde el compuesto (DBHOP) con la mayor inhibición de las reacciones parciales de FS-II y FS-I, posiblemente resultado del aumento en la lipofilicidad de la DBHOP en la membrana tilacoide y/o dominio de inhibición (9). Por otro lado la sustitución en para por -Cl da la menor inhibición de la serie sobre las reacciones parciales; en contraste, la sustitución por un grupo mas reactivo como el -NO2 produce una inhibición semejante a la observada por la HOP.

A partir de estos resultados, se deduce que los N-óxidos de Piridina, presentan un dominio de inhibición preferentemente asociado al al FS-I y otro de menor grado al FS-II; motivo que permite especular conforme a sus rasgos estructurales que posibilitan dicho efecto sobre las reacciones parciales.

COMPUESTO	FOTOSISTEMA I ASC/DAD→MV	FOTOSISTEMA II H ₂ O→DAD/FeCy
DBHOP	42	25
HOP	30	20
NOP	35	18
OP	23	15
COP	16	10

Tabla IV. Por ciento de máximo de inhibición de las reacciones parciales asociadas al FS I Y FS II por N óxidos de Piridina a una concentración de 600 μ M, pH 7.0 y 0.120 mg Chl/ml·hr.

La base de la capacidad inhibitoria de la serie de n-óxidos de Piridina sobre el FS-I, reside en la presencia de un grupo electron-atractor en el átomo de Nitrógeno del anillo de Piridina, razón por la cual, probablemente disminuye el efecto inductivo del -OH, posibilitando una forma tautómerica cetónica, con cierta semejanza estructural a la plastoquinona ;esta situación puede ser determinante para el efecto inhibitorio, (5 y 111).

En estudios realizados con naftoquinonas halogenadas, p-benzoquinonas, N-óxido de Hidroxiquinoleina, Pironas, piridonas y derivados de quinona, se observa que actúan a nivel del sitio DCMU del FS-II, así como el lado reductor de la PQ, (9, 10, 40 y 108). Los resultados obtenidos de NOP y HOP, indican que la inhibición del FS-I, posiblemente a nivel del complejo cit b/f, no requiere de una estructura con alto grado de semejanza con PQ, para potenciar un efecto inhibitorio.

Los resultados obtenidos en relación a la serie de N-óxidos de piridina sustituidos, sobre las reacciones parciales de FS-II y FS-I en el presente estudio, solo permiten discriminar su región de acción. Sin embargo, en trabajos futuros es necesario localizar el dominio de inhibición a nivel de una

enzima redox de esta serie compuestos, a fin de corroborar o descartar su efecto referido al parecido estructural con PQ.

8.5. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE COMPUESTOS DERIVADOS DE PIRIDINA Y N-ÓXIDOS DE PIRIDINA SOBRE EL APARATO FOTOSINTETICO.

Como se muestra en los resultados para la familia de derivados de Piridina, un elemento importante para la inhibición de la reacción de Hill, a nivel del FS-II es el grupo -OH (carbonilo tautomérico). Sin embargo, al disminuir el efecto inductivo del -OH por la acción de un electron-atractor como el Oxígeno, se potencia preferencialmente la inhibición del FS-I, muy probablemente a nivel del complejo cyt b/f, por razones antes mencionadas.

Por otro lado la sustitución por un grupo -NO₂ (electron-atractor) por el -OH, no expresa una diferencia significativa del efecto inhibitorio de las reacciones asociadas al FS-II y FS-I, por lo que la inhibición del lado reductor de PQ requiere una estructura estrictamente semejante a PQ.

La sustitución en 3 y 5 por halógenos, parece ser un importante elemento, para el aumento de la capacidad

inhibitoria, tanto para la serie de compuestos derivados de Piridina como para los N-óxidos de Piridina.

El estudio de las relaciones estructura-actividad sobre el aparato fotosintético, es importante para el diseño de compuestos con carácter herbicida. Sin embargo, para afinar el análisis del efecto de los grupos -OH, \rightarrow O, -NO₂ y de los halógenos sustituyentes en el presente estudio; es necesario hacer trabajos que tomen en cuenta parámetros físico-químicos como: hidrofóbicos (coeficiente de partición), eléctricos (coeficiente de Hammett) y estérico (constante estérica de Taft); además de correlacionarlos con su actividad biológica, para así poder establecer el diseño teórico de nuevos compuestos con actividad herbicida (65).

9.0. CONCLUSIONES.

1.- El efecto de la serie de compuestos derivados de Piridina y N-óxidos de Piridina sobre las actividades fotoquímicas del aparato fotosintético estudiadas en el presente estudio esta relacionado con el patrón de sustitución.

2.- Los resultados muestran que la serie de compuestos derivados de Piridina y N-óxidos de Piridina sustituidos son inhibidores de la reacción de Hill a excepción de la MP.

3.- Existe una diferencia fundamental en el sitio de inhibición de la HP, DCHP y DBHP con respecto a los N-óxidos de Piridina; las HP's son inhibidores del FS-II, mientras que la serie de N-óxidos son inhibidores preferencialmente del FS-I, aunque también experimentan inhibición en menor grado sobre el FS-II.

4.- El grupo hidroxilo (carbonilo tautomérico) es un elemento necesario para la potencia inhibición al FS-II por la HP, DCHP y DBHP.

5.- La inhibición de las reacciones asociadas al FS-I por parte de la serie de N-óxidos de Piridina, esta estrechamente relacionada con la presencia de un grupo electron-atractor en

el átomo de Nitrógeno del anillo de Piridina, que forma una estructura tautómerica que se asemeja al de la PQ.

6.- La inhibición referida al FS-I por parte de la serie de N-óxidos de Piridina no requiere de una estricta semejanza estructural en para, como se observa con el patrón de sustitución con $-NO_2$ o $-OH$.

7.- La sustitución en la posición 3 y 5 por halógenos, es un factor importante que posiblemente este relacionado con la disminución del efecto inductivo del $-OH$ e incremento en la lipofilicidad, para potenciar el aumento de la capacidad inhibitoria por parte de la serie de derivados de Piridina y N-óxidos de Piridna sobre la reacción de Hill.

8.- Este estudio sugiere, que se incremente la liposolubilidad de los derivados de Piridina y N-óxidos de Piridina con el objeto de potenciar una mayor actividad inhibitoria de la reacción de Hill.

9.- Finalmente, es importante mencionar la trascendencia que tiene el estudio de la inhibición del FS-I por parte de los N-óxidos de Piridina, ya que hasta el momento no se ha aportado que estos compuestos inhiben el FS-I. Además el diseño inmensurable de gran cantidad de compuestos dirigidos

al lado aceptor del FS-II, durante muchos años, ha favorecido la aparición de biotipos de malezas resistentes; por lo que el estudio de nuevos sitios probables a la acción de herbicidas es de gran importancia para el combate químico de malezas. El diseño de compuestos con más de un sitio de inhibición como los N-óxidos de Piridina son prometedores para la obtención de nuevos herbicidas.

10.0. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abramovitch, R. A. & Smith, E.M. (1974) En: R.A. Abramovitch (ed.). The chemistry of heterocyclic compounds. John Wiley & Sons. New York.
- 2.- Agundis, M. O. (1980) Congreso nacional de la ciencia de la maleza. 8-12 Nov. Torreon Coahuila. Coahuila.
- 3.- Agundis, M. O. (1982) Congreso nacional de la ciencia de la maleza. 8-12 Noviembre. Univ. Antonio Narro.
- 4.- Albores, M. ; Lotina, B. y Gonzalez G. (1986) Pestic. Sci. 17:396-402.
- 5.- Illinger, N. L. ; Cava, P. M. (1984) Quimica Organica. Ed. Reverte, Mexico.
- 6.- Anthon, G. & Jagendorf, A. (1983) Biochim. Biophys. Acta, V. 723: 358-365.
- 7.- Arroyo, M.J. (1980) Congreso nacional de la ciencia de la maleza. 8-12 Noviembre. Torreon Coahuila.
- 8.- Avron, M. (1963) Biochim. Biophys. Acta 162: 294-296.
- 9.- Asami, T. ; Yoshida, S. & Takahashi (1986) Agric. Biol. Chem. n 50: 469-474.
- 10.- Avron, M. & Sahavit, N. (1965) Biochim. Biophys. Acta. n 109: 317-331.
- 11.- Barber, J. (1983) Plant Cell and Environment n 6: 311-322.
- 12.- Barber, J. (1987) En: The biochemistry of plants. VOL.10 (Hatch, M.a & Boardman N.K. eds.) Academic Press, New York. p.p. 76-113. 13. 13.
- 13.- Barnes, R.A. & Crane, F.L. (1960) En: A. Weissberg (Ed.). The chemistry of heterocyclic compounds. Interscience. New York.
- 14.- Baron, M. ; Chueca, A. & Lopez, J. (1987) Investigacion y Ciencia. n 130: 10-17.
- 15.- Barret, S. C. (1981) Genetic consequences of mode change Bishop L. (Ed.) Academic. Press. London P.p. 209-248.

- 16.- Berzborn, R. Roos, P. (1984) *Advances in Photosynthesis Research*. V II n 6: 587-590.
- 17.- BiauDET, P. & Haraux, F. (1986) *Bioelectrochemistry And Bioenergetics*, V. 16: 111-126.
- 18.- Boger, P. & Sandmann, G. (1986) Sites of herbicide inhibition at photosynthetic apparatus. In: A. Stahelin y J. Arntzen (Eds.). *Encyclopedia of plant Physiology*. New York. VOL XV 595-602.
- 19.- Brettel, K. & Mathis, P. (1986) *FEBS Lett.* n 203: 220-224.
- 20.- Burns, E. (1971) *Plant Physiol.* n 47: 141.
- 21.- Cohn, D. E.; Cohen, W. S. & Bertsch, W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* n 376: 97-104.
- 22.- Corbertt, J.P. ; Wraight, K. & Baillie, A.C. (1984) *The biochemical mode action of pesticides*, 2 edicion, Academic Press, Londres, p.p 282-283.283.
- 23.- Danks, S. M. (1983) *Photosynthetic systems*. Ed. John Wiley & Sons. New york Pp 6-14. Pp 6-14.
- 24.- Deisenhofer, J. ; Epp, O. & Deisenhofer, J. (1984) *J. Mol. Biol.* n 180: 385-398. 385-398.
- 25.- Dilley, A. R. (1972) Ion transport (H⁺, K⁺, Mg⁺⁺ Exchange phenomena) *Methods in Enzymology*. XXIV: 69-113.
- 26.- Donner, W. (1984) *Naturforsch.* 39c: 405-411.
- 27.- Draber, W. & Fedtke, C. (1979) Herbicide interaction plant biochemical system, *Advances in Pesticide Science part 2H*. Geissbuhler; G.t.Brooks.and P.C. Kearney Pergamon Press.
- 28.- Duke, S. (1985) *Weed Physiology*, Vol. II, Ed. CRC Press, New york. p.p. 98-102.
- 29.- Enriquez, E. F. (1991) Cambios conformacionales detectados por maleimidas y precursores sinteticos en cloroplastos energizados y no energizados. Tesis.Div.de Estudios de Pg. departamento de Bioquimica Vegetal Fac. de Quim. UNAM.
- 30.- Esteva, G. (1988) *Comercio Exterior*. V 38 n 8: 662-672.

- 31.- Fedtke, C. (1982) Biochemistry and physiology of herbicide action. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 32.- Fillingame, R. (1980) Ann. Rec. Biochem. n 49:1079-1113.
- 33.- Fork, D. (1972) Oxygen electrode. Methods in enzymology. 24: 113-122.
- 34.- Foyer, C. (1984) Photosynthesis. Ed. John Wiley & Sons. New York. Pp 10-16.
- 35.- Gilman & Blaff (1931) Organic Synthesis (2 nd) John Wiley & sons, Volumen I, New York. p.p. 511-513.
- 36.- Giraldo, E.R. (1989). Desacoplamiento de la fotofosforilacion en relacion a la hipotesis Quimiosmotica. Tesis Div. de Estudios de Pg. Departamento de Bioquimica Vegetal, Fac. de Quimica, UNAM.
- 37.- Gonzalez, G. (1981) Herbicidas inhibidores de la fotosintesis. Tesis, Fac. Quimica, UNAM.
- 38.- González H. (1983) Efecto de los N-Oxidos de piridina substituidos sobre la fotosintesis. Tesis, Fac. de Quimica, UNAM.
- 39.- Hamaker, K.; Johnston H.; Martin, R. & Redeman, C. (1963) Science n 141:363. 141:363.
- 40.- Hanch, C. E. et al (1965) J. Amer. Chem. Soc. 87:738-742.
- 41.- Hansch, C. & Deutsch, E. (1966) Biochem. Biophys. Acta. n 112: 382-391.
- 42.- Hanch, C. E. et al (1984) J. Agr. food chem. n 32:133-144.
- 43.- Heinstein, G. & Hatefi, Y. (1979) (1974) J. Biol. Chem. n 249: 1356-1362.
- 44.- Heinstein, G. & Hatefi, Y. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA n 71: 288-292.
- 45.- Hernández, X.E. (1988) Comercio exterior. V. 38 n 8:673-678.
- 46.- Hill, R. & Bendall, F. (1960) Nature n 186: 136-137.
- 50.- Hiroshi, T.; Atsushi, K. (1988) Agric. Biol. Chem. (52)1:85-89.

- 47.- Hopfield, J. (1977) En: *Electrical Phenomena at the Biological membrane Level*, Roux E. (ED.) Amsterdam. p.p. 471-490.
- 48.- Hudson, G. & Mason, J. (1988) *Photosynt. Research.* n 18:205-222.
- 49.- Izawa, S. & Good, N. (1972) En: *Methods in enzymology* (edited by San Pietro), Vol. XXIV Part B, Academic Press, New York. p.p 365-374.
- 50.- Jagerdorf, A. & Uribe, E. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V 82 1950-1955.
- 51.- Jagerdorf, A. (1977) *Photophosphorylation.* In: A. Trebst & M. Avron (Eds.). *Encyclopedia of plant physiology. New Series.* New York. 5:308-337.
- 52.- Johannigmeier, U. ; Neumann. E. (1983) *J. Bioenerg. Biomembr.* n 15: 43-66.
- 53.- Joliot, P. & Kok, B. (1975) En: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee Ed.) Academic Press, New York. p.p. 387-412.
- 54.- Kefford, N. & Caso, O. (1966) *Bot. Gaz.* V. 127 n 2-3:159-163.
- 55.- Kessler, R.J. ; Tyson, C. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3141-3145.
- 56.- Ketchman, S. ; Davenport, J. & McCarty, R. (1984) *J. Biol. Chem.* (259)11:7282-7293.
- 57.- Klein-Hitpass, ; Barzborn, R. (1984) *Advances in Photosynthesis Research.* (2)6:563-566.
- 58.- Klimov, V. (1982) *Biophysics.* n 27: 186-198.
- 59.- Krebbers, E. ; Larriuna I. ; McIntosh, L. (1982) *Nucleic acids research*, V10 n16: 4985-5002.
- 60.- Labrada, R. (1987) *Congreso nacional de la ciencia de la maleza.* Nov. 8-12, San Luis Potosí.
- 61.- Lehninger, A. (1985) *Bioquímica.* Ed. Omega. Barcelona, España.

- 62.- Len, F. & Gina, L. (1991) *Pestic. Sci.* 31:555-568.
- 63.- Lerma, C. & Lotina-Henssen, B. (1988) *Practicas de evaluacion de bioproductividad de fotosintesis. Dep. de Bioquimica DEPg. UNAM.* Pp 7-18.
- 64.- Lotina-Henssen, B; King, B. (1987) *Photochem. Photobiol.* (46) 2:287-293.
- 65.- Lotina-Henssen, B. ; Albores, M. & Garcia, L. (1989) *Rev. de la Soc. Quim. Mex.* (33) 3: 109-117.
- 66.- Mathis, P. (1981) En: *The Biochemistry of Plants, Vol. 8, Stumpf, P. & Conn, E. (Eds.), Academic Press, New York.* p.p 98-155.
- 67.- Mattoo, A. Pick, H. & Edelman, M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* n 78: 1572-1576.
- 68.- McCarty, R. ; Pitman, P. & Tsuchiya, Y. (1972) *J. Biol.Chem.* V. 247 n 10:3048-3051.
- 69.- McCarty, E. (1978) *Como fabrican ATP las células. Investigación y ciencia.* 20:58-75.
- 70.- McCarty, R. & Nalin, C. (1986) *Encyclopedia of plant physiology, Vol. XV* p.p 576-583.
- 71.- McCarty, R. & Hammes, G. (1987) *TIBS, V. 12* 234-237.
- 72.- McClay, A. (1982) *Congreso nacional de la ciencia de la maleza. 8-12 de Noviembre. Torreón Coahuila.*
- 73.- Meikle, R. (1970) *Weed science* n 18: 475-483.
- 74.- Melandri, B.; Ort, D. (1982) En: Govindjee (ed). *Vol. I. Academic Press, London New York,* p.p. 537-587.
- 75.- Michel, H. ; Epp, O. & deisenhofer (1986) *EMBO J.* n 5:2445-2451.
- 76.- Mitchell, P. (1966) *Biol. Rev.* 41:445-502.
- 77.- Mitchell, P. (1968) *Bodmin, U.K. : Glynn Research. Ltd* V. 4 n. 95: 1-20.
- 78.- Mitchell, P. (1979) *Eur. J. Biochem.* V. 95:1-20.

- 79.- Moreland, D. (1980) Mechanism of action of herbicides. *Ann. Rev. of plant physiology.* n 31: 597-638.
- 80.- Moreland, D. & Hilton, L. (1979) *Herbicides: Physiology, Biochemistry & Ecology.* (audus, L. J. ED.), academic Press; Vol. 1.
- 81.- Moreland, D. (1967) *A. Rev. Pl. Physiol.* n 18 365-386.
- 82.- Moroney, J. ; Andreo, c. & vallejos, R. (1980) *J. Biol.Chem.* V.225 n 14:6670-6674.
- 83.- Muñoz, E. & Andreu, M. (1979) *Investigación y Ciencia* n 29:98-106.
- 84.- Nelson, N. (1971) Effect of pyridine on the light-induced pH rise and postillumination ATP syntesis in chloroplast. *Arch.Biochem. Biophys.* 145:263-267.
- 85.- Nelson, N. (1981) *Curr. Topics in Bioenergetics* V II:1-33.
- 86.- Neumann, J. & Jagendorf A. (1964) *Archr. Biochem. Biophys.* 107:109-119.
- 87.- Neumann, E. (1983) *J. Bionerg. biomembr.* 15: 43-66.
- 88.- Nicholls,D. (1982) *Bioenergetics.* Ed. Academic Press, New York. Pp 25-35.
- 89.- Oettmeier, W. ; Masson, K. & Dostatni, R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* n 890:260-269.
- 90.- Ort, D. (1986) En: Stahelin, A. & Arntzen, J. (Eds). *Encyclopedia of plant physiology.* New York. Vol. XIV 143-190.
- 91.- Patrie, W. & McCarty, R. (1984) *J. Biol. Chem.* V259 n 17:11121-11128.
- 92.- Peña, V. ; Lotina, B. (1991) *Biophysical Chemistry* n 41:169-174.
- 93.- Pfister, K. ; Eistenback, E. & Arntzen, C. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* n 78: 981-985.
- 94.- Pfister, K. & Schreiber, U. (1984) *Z. Naturforsch.* n 39c:389-392.

- 95.- Philip, M. ; Geraldine, V. & Hall, D. (1982) photosynthesis Research n 3: 227-240.
- 96.- Pine, S. ; Hendrickson, J. (1990) Quimica Organica, Ed. McGraw Hill, Mexico.
- 97.- Pla, A. (1985) Asimilacion del carbonico por la planta. Investigaci3n y ciencia.n 102:6-12.
- 98.- Reeves,S.& Hall,(1980)En: Methods in Enzymology. n 69:85-94.
- 99.- Reimer, S. ; Link, K. & Trebst, K. (1979) Z. Naturforsch. n 34c:419-426.
- 100.-Renger, G. (1979). Z. Naturforsch. n 34c:1010-1014.
- 101.-Rottenberg, H. (1985) Modern Cell Biology; n 9: 47-87.
- 102.-Rutherford, A. & Heatcote, P. (1985) Photosynth. Res. n 6:295-316.
- 103.-Siow, K. S. & Unrau, A. M. (1968) Biochemistry. n 7:3507-3512.
- 104.-Solis, C. (1989) The biogenesis of chloroplast in tissue cultures of a C3 y C4 plant. Plant cell physiol. 30(5):609-616.
- 105.-Strain, H. & Svec, W. A. (1965) Methods in Enzymology. Academic Press.
- 106.-Stuart, M. & Ridley, J. (1979) Plant Phisiol. n 63:392-398.
- 107.-Suss, K. & Manteuffel, R. (1983), FEBS Lett.V 153 n 1:134-140.
- 108.-Tovar, A. (1992) Estudio del maacanismo(s) de acci3n de derivados de Quinona sobre la fotos3ntesis en cloroplastos de espinaca (*Spinacea oleacea*) in vitro.(tesis) ENEP-IZTACALA.
- 109.-Trebst, A. & Draber, W. (1979) in: Advances in Pesticide Science (H.Geissbuhler. ed.) Part 2 . Pergamon Press. Pp 223-234.
- 110.-Trebst, A.; Donner, W. & Draber, W. (1984) Z. Naturforsch. 39c, 405-411.

- 111.-Trebst, A. & Depka, B. (1985) Z. Naturforsch, 40c, 391-399.
- 112.-Trebst, K. (1987) Z. Naturforsch, n 42c: 742-750.
- 113.-Vermaas, W. ; Renger, G. & Arntzen, J. (1984) Z. Naturforsch n 39c:368-373.
- 114.-Volkova, N. (1978) ref. No. 18282 Biol. Abstr. V 67 n 3:1791.
- 115.-Webber, N. ; Spencer, L. ; Sawyer, T. & Heath, L. (1985) FEBS V.189 n 2: 258-262.
- 116.-Williams, R. J. (1969) Current Topics Bioenergetics, n 3:79-156.
- 117.-Williams, R.J. (1974) FEBS, n 43:89-194.
- 118.-Williams, R.J. (1978) Biochim. Biophys. Acta. n 505:1-44.
- 119.-Wraight, C. (1982) En: Govindjee (Ed.) Vol.I. Academic. Press, London New York, p.p. 17-61.