



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTOS DEL DMSO EN PLASTOCIANINA Y
FERREDOXINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C A
P R E S E N T A

YESSICA SELENE RAMÍREZ FUENTES



MÉXICO, D.F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	I. Q. Martha Rodríguez Pérez
Vocal	Dra. Norah Yolanda Barba Behrens
Secretario	Dra. Silvia Elena Castillo Blum
Primer suplente	Dra. Martha Elena Sosa Torres
Segundo suplente	Dra. Laura María Gasque Silva

Lugar donde se desarrolló el trabajo:

Laboratorio 214, Departamento de Química Inorgánica, División de Estudios de Posgrado,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:

Dra. Silvia E. Castillo Blum

Sustentante:

Q. Yessica Selene Ramírez Fuentes

A Dios

A Mis Padres

A Brenda

Agradecimientos

- Principalmente a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA de MÉXICO por todo lo que me ha brindado y sigue brindándome.
- A mi asesora Silvia por aceptarme en su grupo de trabajo, por su apoyo y por la amistad que surgió.
- A todos mis compañeros del laboratorio 214 y a los vecinos del 211 por compartir sus conocimientos y hacer un ambiente agradable.
- A mi familia, por siempre estar al pendiente de mis estudios e interesarse por ellos.
- A mis queridos primos Alma y Beto por compartir mi simpleza.
- A mis amigos con los que compartí en algún momento la facultad y se convirtieron en amigos entrañables (Marita, Perla, Tam, Ros, Cris, Huguito, Nessim, Raulito F.)
- A Paty Fierro por todo su ayuda en todos los trámites y por toda su amabilidad.
- A la Dra. Martha E. Sosa Torres y a Alejandro Lozano Peralta por su asesoría y su siempre disponibilidad para brindarme sus conocimientos de rpe.
- A Örjan Hansson por abrirme las puertas de su laboratorio y de su grupo de trabajo en Suecia durante la obtención de PCu por sobreexpresión en *E. coli*.

- A Jenny-Ann Jöh, no sólo por todo su apoyo y experiencia en el área bioquímica, sino por convertirse en una gran amiga.
- Al Dr. Diego González Halphen por permitirme trabajar en su laboratorio durante el aislamiento de las metaloproteínas y a la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo por toda su ayuda durante mi estancia en el Instituto de Fisiología.
- A la Dra. Marieta Tuena de Gómez-Poyou y a Lenin Domínguez por el préstamo del equipo de liofilización.
- Al jurado del presente trabajo por sus valiosos comentarios.
- Al proyecto DGAPA IN211803 por el apoyo económico recibido durante la realización de esta tesis.
- Al proyecto CONACYT 41128 por el apoyo económico recibido para adquirir el equipo de rpe.

Este trabajo se presentó en el Internacional Conference on Coordination Chemistry,

Mérida, México, Julio 18-23, 2004.

Indice

Glosario	i
1. Introducción	1
2. Generalidades	5
2.1 Clonación	5
2.2 rpe	9
2.2.1 Proteínas de Cu: plastocianina	22
2.2.2 Proteínas de Fd: ferredoxina	24
2.3 Acciones inhibitorias sobre sistemas fotosintéticos	27
2.4 Plastocianina	34
2.5 Ferredoxina	39
3. Objetivos	43
4. Sección Experimental	44
4.1 Reactivos	44
4.2 Aislamiento y purificación de metaloproteínas	45
4.2.1 Producción de PCu por sobreexpresión en <i>Escherichia coli</i> .	45
4.2.2 Aislamiento de PCu y Fd a partir de hojas de espinaca.	49
4.3 Caracterización de PCu y Fd por espectroscopía UV-visible.	52
4.4 Caracterización de PCu y Fd por rpe.	52
5. Resultados y Discusión	54
5.1 Aislamiento , purificación y caracterización de PCu y Fd.	54
5.2 Caracterización por rpe	57
5.3 Transferencia electrónica en PCu	62
5.4 Transferencia electrónica en Fd	69
6. Conclusiones	72
7. Referencias bibliográficas	74

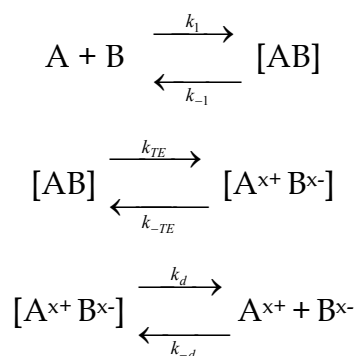
1. Introducción

Las reacciones de transferencia electrónica en y entre proteínas que contienen centros metálicos juegan un papel primordial en los procesos de transducción de energía, tales como la fotosíntesis y la respiración¹.

Las reacciones de transferencia electrónica en el ámbito biológico poseen ciertas características que las distinguen de entre otros procesos que involucran pequeños complejos metálicos, ya que se llevan a cabo de manera rápida a través de grandes distancias moleculares y la transferencia electrónica ocurre provocando únicamente cambios menores en la estructura del sitio redox.

Las reacciones de transferencia electrónica de un electrón entre metaloproteínas se asume que ocurren por medio de un mecanismo de esfera externa, es decir, no se sustituye la esfera de coordinación interna del ion metálico.

El transporte de un electrón desde un donador hasta un aceptor parece ser un proceso muy simple y común en los sistemas biológicos. Ha sido aplicada una aproximación utilizando la teoría relativa de Marcus² para la interpretación de las reacciones de transferencia electrónica de esfera externa en proteínas. Para que la reacción ocurra, deben acercarse los reactantes de forma que se asegure el acoplamiento entre los orbitales electrónicos.



La principal suposición de la teoría de Marcus es que la transferencia electrónica es adiabática con mayor posibilidad de manifestarse en un complejo activado, en el cual existe la mínima interacción entre los reactantes. Sin embargo, estos procesos son sumamente complejos, ya que se trata de transferencias electrónicas rápidas a larga distancia a través de cadenas transportadoras³; lo antes mencionado, ha llevado al desarrollo del concepto de tunelaje como alternativa al traslape directo de orbitales entre los centros donador y aceptor.

El tunelaje electrónico ocurre cuando los estados de reactivos y productos poseen la misma configuración nuclear en el punto de intersección, por lo que aunque el acoplamiento es pequeño existe la posibilidad de que ocurra la transferencia electrónica. El tunelaje nuclear ocurre aunque el sistema no se encuentre en el punto de intersección, pues las superficies se encuentran cercanas y la transferencia ocurre. Para proteínas que poseen el centro metálico cercano a la superficie, es razonable esperar que sea posible el traslape entre orbitales con ciertos reactivos redox y las proteínas, dando lugar a una trayectoria favorable para la transferencia electrónica.

La química redox de metaloproteínas simples como citocromos, plastocianina y ferredoxina se ha estudiado de una manera extensa utilizando técnicas químicas. Estas metaloproteínas se aíslan de diversas fuentes biológicas; tales como bacterias, algas o plantas superiores.

El estudio de reacciones de transferencia electrónica en medio homogéneo con compuestos inorgánicos simples ha dado información cinética sobre el mecanismo de reacción. En un gran número de reacciones con reactantes inorgánicos que siguen un mecanismo de esfera externa, se observa un comportamiento cinético limitante y se observan desviaciones significativas a la cinética de segundo orden, lo que sugiere que el mecanismo de transferencia se lleva a cabo en varios pasos.

Se ha concluido a través de varios estudios que para que una proteína posea un sitio de transferencia de electrones ideal es necesario lo siguiente:

La geometría alrededor del ion metálico es generada por el plegamiento de la proteína, lo que no permite reacomodos mayores al ocurrir el cambio en el estado de oxidación. Además, el ion metálico se encuentra inmerso dentro de la proteína, así que la posibilidad de que ocurran reacciones sobre el ion metálico debido a la presencia de moléculas pequeñas es mínima, se considera entonces que la esfera de coordinación del ion metálico es inviolable. Por último, se observa que los ligantes alrededor del ion metálico en las proteínas que se encargan de la transferencia electrónica parecen ser seleccionados para facilitar la rápida transferencia electrónica, ya sea disminuyendo la carga central del metal o induciendo el bajo espín sobre el ión metálico; por ejemplo sulfuro e imidazoles.

Se han estudiado las reacciones con las metaloproteínas con la finalidad de brindar un mayor entendimiento sobre la inhibición que tienen algunos compuestos de coordinación sintetizados por nuestro grupo de trabajo en diferentes actividades fotosintéticas.^{4,5}

Es así como en trabajos anteriores del grupo antes mencionado se ha demostrado que la presencia del medio DMSO favorece notablemente la transferencia electrónica intramolecular⁶, es por esta razón que esta vez se utiliza nuevamente el medio

DMSO/H₂O (25%) fijando el pH en 7.0 por medio de una solución amortiguadora Tris/HCl con modificación de la fuerza iónica a 0.1M (NaCl), para ayudar a entender el efecto que tiene este disolvente sobre la transferencia electrónica en las metaloproteínas plastocianina y ferredoxina.

2. Generalidades

2.1 Clonación

Cuando la posibilidad de clonar un gen fue revelada al comienzo de la década de los años 70, el desarrollo fue explosivo. Repentinamente se podían sintetizar proteínas en una escala corta de tiempo permitiéndole a las bacterias realizar gran parte del trabajo. Claros ejemplos de genes clonados son los genes para insulina y β -galactosidasa.

El principio de clonado consiste en insertar un segmento de ADN extranjero en una molécula pequeña capaz de replicarse automáticamente. A ese tipo de molécula de ADN se le denomina vector de clonación.

La herramienta base para esta clase de trabajo es un vector o plásmido. Éste es una pieza de ADN circular que se encuentra extracromosomalmente en las células bacterianas y que es capaz de replicarse y transmitirse independientemente del cromosoma bacteriano. Los plásmidos son excelentes vectores de clonaje, ya que pueden ser "cortados" con una ó dos enzimas de restricción o puede incorporárseles un fragmento de ADN que ha sido previamente cortado usando las mismas enzimas de restricción. A los plásmidos así modificados se les denomina plásmidos recombinados. En este estado, se introducen en una bacteria (a lo que se le llama transformación) donde serán replicados. Con frecuencia los plásmidos le proporcionan ciertos privilegios a la célula huésped, como por ejemplo, la resistencia a un antibiótico, la degradación de compuestos complejos, la producción de enzimas de restricción y modificación, etc. Uno de los primeros vectores comercialmente disponible fue el *pBR322* (4363 pb). Éste contiene genes

resistentes a la ampicilina y a la tetraciclina y existe como un plásmido multi-copia en la célula, o mejor dicho, es un plásmido del cual existen más de un ciento de copias en la célula.

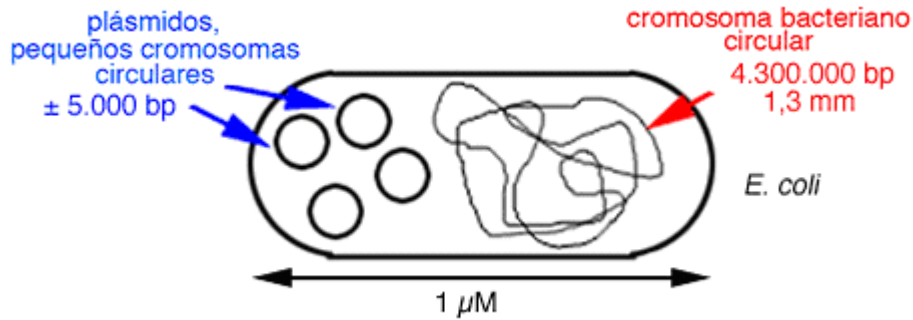


Fig.2.1-1 Esquema de la bacteria de *E. coli* que ilustra el cromosoma bacteriano y los plásmidos.

Para identificar a las bacterias transformadas se utilizan marcadores de selección proporcionados por plásmidos, los marcadores de selección más utilizados son los genes de resistencia a antibióticos, (como a la ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol y kanamicina). Como regla, las bacterias transformadas se cultivan en presencia del antibiótico para evitar que la bacteria pierda el plásmido que se le ha introducido.

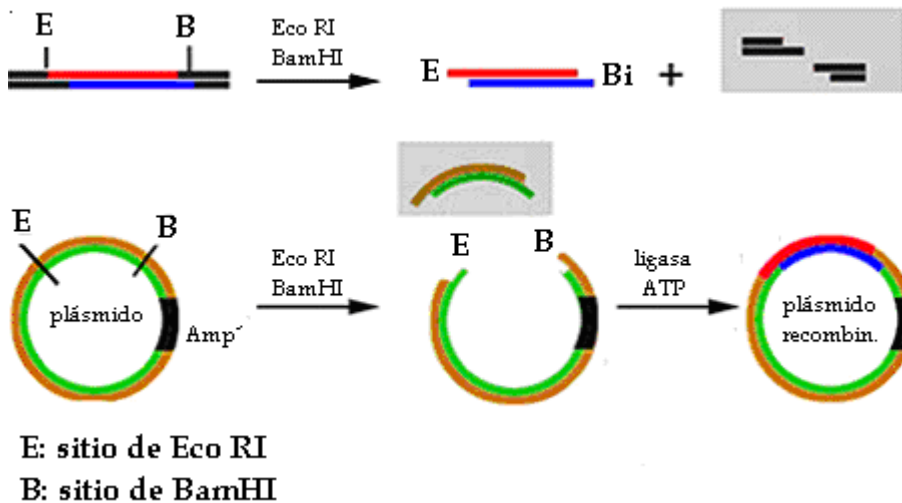


Fig.2.1-2 Inserción de un segmento de ADN extranjero en un plásmido.

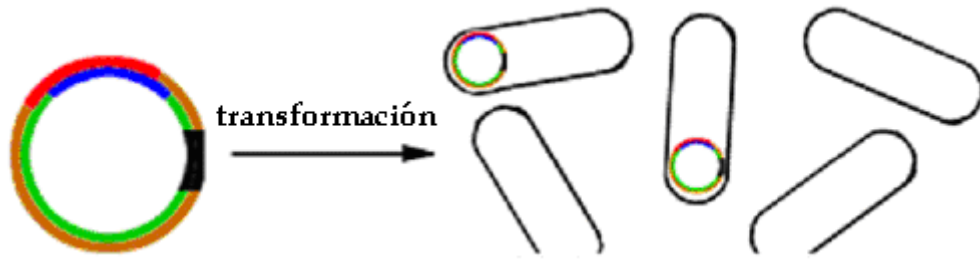


Fig.2.1-3 Transformación de bacterias por el plásmido.

Los plásmidos *pUC18* y *pUC19* son formas modificadas del plásmido *pBR322* que carecen del gen resistente a la tetraciclina.

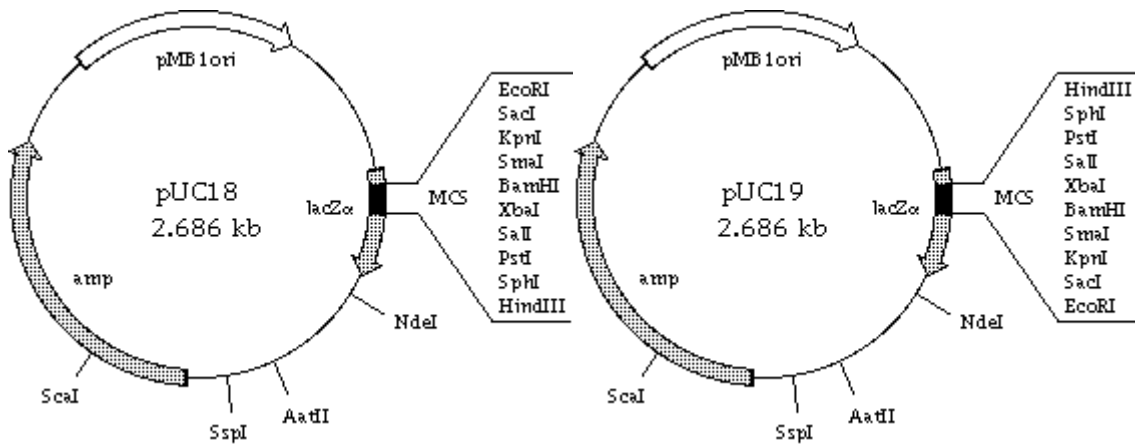


Fig.2.1-4 A la izquierda el plásmido *pUC18* y a la derecha el plásmido *pUC19*.

Los plásmidos de tipo *pUC* contienen un segmento derivado del operón lactosa de *E. coli*. Ese segmento codifica al represor, al promotor, al operador y a los primeros 146 aminoácidos del gen *lacZ*, que es el péptido alfa y consiste en la parte de la β -galactosidasa que no tiene actividad por sí misma, pero que es necesaria para la acción de la enzima. La síntesis de ese fragmento de β -galactosidasa puede ser inducido por la IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida).

La *E. coli* no utiliza la lactosa como tal, sino cuando ésta es hidrolizada en glucosa y galactosa. La β -galactosidasa hidroliza la lactosa a partir de un sustrato sintético

denominado X-gal. Si la galactosa no está presente en el medio de cultivo, la *E. coli* sintetiza muy poco de β -galactosidasa. En cambio, en presencia de lactosa, sintetiza la β -galactosidasa abundantemente. Es por esto que se dice que puede regular la expresión de la β -galactosidasa.

La β -galactosidasa se compone por dos partes que son inactivadas por separado, cuando se asocian forman una enzima activa. Al transformar las bacterias con un vector *pUC*, se les aporta el pedazo que les hace falta, provocando lo que se llama la complementación alfa. Las bacterias obtenidas son fácilmente identificables puesto que ellas forman colonias azules en presencia de un sustrato incoloro de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosida (X-gal), el cual es hidrolizado por la β -galactosidasa y da una sustancia azul insoluble en presencia de IPTG (el inductor).

Si se inserta un fragmento de ADN extranjero en el polienlazante (IPTG), se destruyen casi todas las entradas de lectura y se para la complementación alfa. Las bacterias con plásmidos recombinantes forman colonias blancas, puesto que la β -galactosidasa es inactiva.

2.2 Resonancia paramagnética electrónica (rpe)

En este apartado de la tesis nos referiremos a las propiedades magnéticas de átomos, moléculas y sólidos que poseen electrones desapareados. Se dice que dichas sustancias son paramagnéticas. Los electrones desapareados son más comúnmente detectados por la resonancia paramagnética electrónica, o como sus iniciales lo indican rpe. Esta técnica experimental emplea tanto campos magnéticos externos como fotones de radiofrecuencia. La sustancia en estudio se coloca en el campo magnético y absorbe energía electromagnética. Dicha técnica se parece mucho a otro tipo de espectroscopía (rmn), excepto porque los niveles de energía de nuestro interés son fuertemente modificados por un campo magnético.

Recordemos que un campo magnético se genera por cargas en movimiento. Éste se caracteriza por un vector de campo magnético, llamado intensidad magnética, el cual posee magnitud y dirección. La dirección del campo producida por un movimiento positivo en una bobina común y corriente está dada por la regla de la “mano derecha”. Por convención la dirección de este campo se denomina norte.

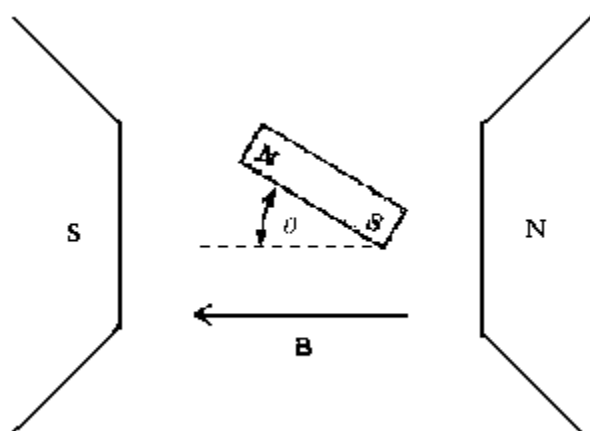


Fig.2.2-1 Esta imagen ilustra el significado del ángulo θ en la expresión para la energía de un dipolo magnético en un campo magnético B.

Las unidades de la fuerza de un campo magnético en el sistema cgs es el oersted, para fines prácticos, en ausencia de materia magnetizable, se considera que B y H representan el mismo campo (el campo producido por el magneto del laboratorio) y difieren uno de otro en una constante que depende solamente de las unidades. En el sistema mks $B = 4\pi \times 10^{-7} H$ y en el sistema gaussiano $B=H$.

Otra cantidad vectorial de gran importancia es el momento dipolo o momento magnético. Puesto que un magneto está completamente caracterizado por su momento magnético, con frecuencia se utilizan dos términos intercambiables. La dirección del campo magnético es la dirección que va del polo sur del magneto al polo norte del mismo. La magnitud del momento magnético es la medida de la fuerza del magneto.

Los momentos magnéticos colocados en un campo tienden a alinearse de manera que apuntan en la misma dirección que este último, es decir, son paralelos al campo. Esta dirección es la orientación de mínima energía para un momento magnético en un campo. La energía magnética está dada por la expresión

$$E = -\mu H \cos \Theta \dots\dots\dots(2.2-1)$$

donde E es la energía magnética en ergs, μ es la magnitud del momento dipolo en ergs/gauss, H es la magnitud del campo magnético en gauss y θ es el ángulo entre el momento magnético y la dirección del campo externo. En lenguaje vectorial

$$E = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H} \dots\dots\dots(2.2-2)$$

donde $\boldsymbol{\mu}$ es el vector del momento magnético y \mathbf{H} es el vector del campo. La orientación en la que el momento magnético apunta opuesta o antiparalelamente al campo es la orientación de máxima energía.

Un magneto de dimensiones atómicas o moleculares obedece diferentes leyes que las que obedece un magneto macroscópico. En lugar de un número infinito de orientaciones permitidas que pudiera tener el momento magnético clásico en un campo externo, para un electrón solamente existen dos valores posibles para Θ .

Las propiedades fundamentales de un electrón son su masa, carga, momento angular intrínseco y su momento magnético. El momento angular intrínseco es también conocido como espín. Este es un vector denotado por el símbolo \mathbf{S} . La componente del vector de espín \mathbf{S} a lo largo de cualquier dirección especificada por un experimento puede tomar dos únicos valores $\pm 1/2\hbar$. ($\hbar = h/2\pi$, es decir, "h barra", donde la constante de Plank, h , tiene un valor de 6.63×10^{-27} erg.s).

El momento magnético del electrón relaciona al momento angular intrínseco con la siguiente expresión

$$\mu_e = \frac{g_e \mu_0}{\hbar} S \dots\dots\dots(2.2-3)$$

donde el factor g_e equivale a 2.002319 para electrones libres y μ_0 ($e\hbar / 2m_e c$) es el magnetón electrónico de Bohr que tiene un valor de 0.92732×10^{-20} erg gauss⁻¹. El signo negativo muestra que la dirección del vector del momento magnético del electrón μ_e es opuesta a la del momento angular \mathbf{S} . Por definición, la dirección del momento magnético de un sistema es la misma que la de rotación de la carga positiva del mismo.

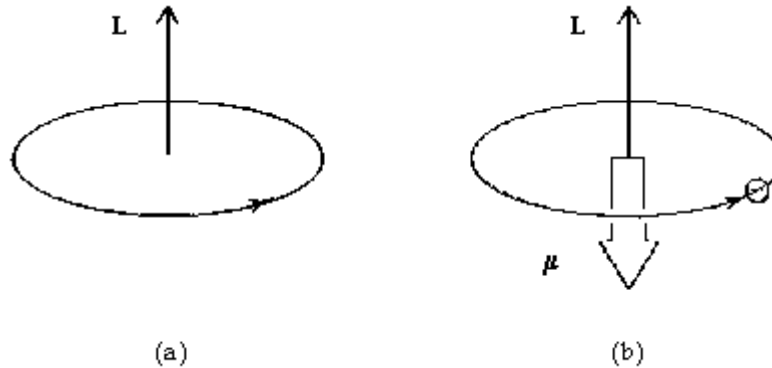


Fig.2.2-2 La convención según la dirección de la rotación y las direcciones relativas de L y μ .

Este hecho muestra el contraste que existe entre el núcleo y el electrón. Como un espín nuclear típico, su carga positiva rota en la misma dirección que el espín de su masa. Consecuentemente el momento magnético y el momento angular del núcleo están en la misma dirección, mientras que el momento magnético y el momento angular intrínseco del electrón están en direcciones opuestas.

Además de su espín, un electrón puede tener un momento angular adicional, ya que éste no solamente se mueve alrededor de su propio eje, sino que también puede hacerlo en una órbita. A este momento angular adicional se le conoce como momento angular orbital que también tiene un momento magnético asociado. La figura 2.2-2 muestra las direcciones relativas del momento angular orbital, L , y del momento magnético que se origina a partir de éste.

La figura 2.2-3 muestra las dos posibles orientaciones del momento magnético de un electrón en un campo, las cuales corresponden a dos valores de energía. Estos dos estados también corresponden a las dos posibles orientaciones del vector del momento angular.

En un sistema atómico o cuántico todo lo que puede ser medido con certeza con respecto al momento angular es el cuadrado del vector del momento angular. Esto

significa que nunca podremos tener completo conocimiento sobre la dirección del vector del momento angular, lo que es una consecuencia del principio de incertidumbre.

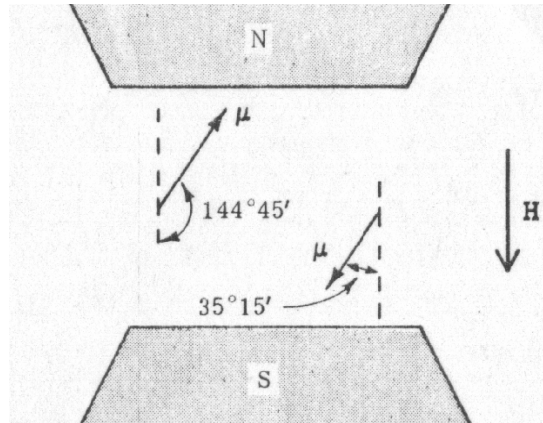


Fig.2.2-3 Las dos posibles orientaciones del momento magnético electrónico con respecto a un campo externo. Notar que la componente del momento magnético en la dirección del campo es de la misma magnitud en los dos casos pero de signo opuesto.

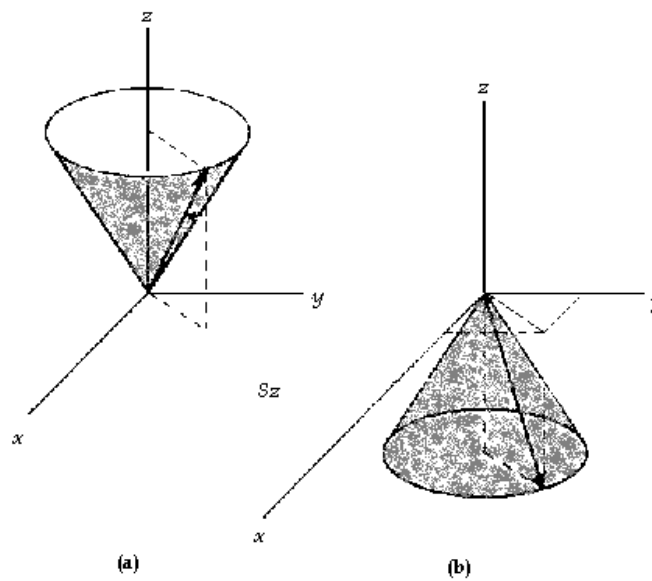


Fig.2.2-4 El vector del momento angular puede encontrarse en cualquiera de los dos conos. Lo mismo para el vector del momento magnético, el cual está exactamente opuesto al vector del momento angular.

Convencionalmente nos referimos a la componente conocida como la componente z. El cuadrado del momento angular es S^2 y la componente conocida es S_z . El sistema puede describirse con la ayuda del número cuántico de espín S , dependiendo del sistema bajo consideración podemos tomar valores enteros o medios $0, 1/2, 1, 3/2, \dots$. Para un sistema particular, la magnitud de S_z puede tener cualquiera de los valores $2S + 1; S \hbar, (S-1) \hbar, (S-2) \hbar, \dots -S \hbar$. La magnitud de S^2 debe contener el valor $S(S+1) \hbar^2$. El número cuántico de espín de un electrón es de $1/2$. Por lo tanto, la magnitud de S_z tiene el valor de $3/4\hbar$. Así la magnitud del momento angular de un electrón es

$$(\sqrt{3}/2) \hbar$$

Si elegimos la dirección z para que sea la dirección de un campo externo, entonces el momento angular puede estar ubicado sobre cualquiera de los conos cuyos ejes coinciden con el eje z como lo muestran las figuras 2.2-4a y 2.2-4b. La figura ilustra nuestra incertidumbre con respecto a S_z y S_y .

Los dos momentos angulares de los estados S_z tienen diferentes orientaciones, por lo que también poseen diferentes orientaciones del momento magnético. Al estar el electrón en un campo magnético, estos dos estados tienen diferente energía.

Sustituyendo la ecuación 2.2-3 dentro de la ecuación 2.2-2 obtenemos la energía

$$E = \frac{g\mu_0 H_z S_z}{\hbar} \dots\dots\dots(2.2-4)$$

Como S_z puede tomar los valores $\pm 1/2$, entonces la energía de un electrón en un campo magnético puede tomar los valores de $+1/2 g\mu_0 H_z$ o $-1/2 g\mu_0 H_z$. La diferencia de energía entre estos dos estados es

$$\Delta E = g\mu_0 H_z \dots\dots\dots(2.2-5)$$

Los experimentos de resonancia paramagnética electrónica consisten precisamente en la medición de dichas diferencias.

El campo de los aparatos que se encuentran en laboratorio se designa frecuentemente como H_0 , y para evitar confusiones se toma como convención que su dirección es el eje z . Las ondas de radio poseen energía $g\mu_0 H_z$, la cual es la que inducirá las transiciones entre los dos estados del electrón. En otras palabras

$$\Delta E = h\nu = g\mu_0 H_z \dots\dots\dots(2.2-6)$$

donde h es la constante de Plank y ν es la frecuencia de las ondas de radio. Esta es la ecuación fundamental de rpe.

La mayoría de los experimentos en rpe requieren una frecuencia que se encuentra en la región de las microondas, las cuales tienen un alcance desde milímetros hasta metros.

Solamente las ondas electromagnéticas de frecuencia $\nu = g\mu_0 H_z/h$ poseen la cantidad correcta de energía para proporcionar la diferencia de esta misma entre los dos estados. Únicamente un cuanto electromagnético de esta frecuencia causará una transición entre los dos estados. Esta coincidencia de la energía del cuanto y la diferencia de energía entre los niveles es llamada resonancia. La ecuación 2.2-6 presenta la condición de resonancia.

Usualmente nos referimos a la magnitud de S_z en términos del número cuántico m_s , el cual está definido por la ecuación

$$\langle S_z \rangle = m_s h \dots\dots\dots(2.2-7)$$

Los paréntesis, $\langle \rangle$, denotan una magnitud mecánica cuántica.

Para reiterar lo expuesto anteriormente, los valores posibles de m_s son $+1/2$ y $-1/2$. Con frecuencia hablamos del estado $+1/2$ y del estado $-1/2$. El primero es el estado de alta energía. En este estado la componente z del momento angular está en la dirección del campo y la componente z del momento magnético está en sentido opuesto al campo.

En la espectroscopía ultravioleta-visible entendemos el concepto del estado excitado y del estado basal. Podemos pensar en $-1/2 g\mu_0 H_z$ como el estado basal y en $+1/2 g\mu_0 H_z$ como el estado excitado de un sistema magnético. La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica es simplemente espectroscopía en un campo magnético que observa las transiciones que involucran la reorientación de los momentos magnéticos de los electrones.

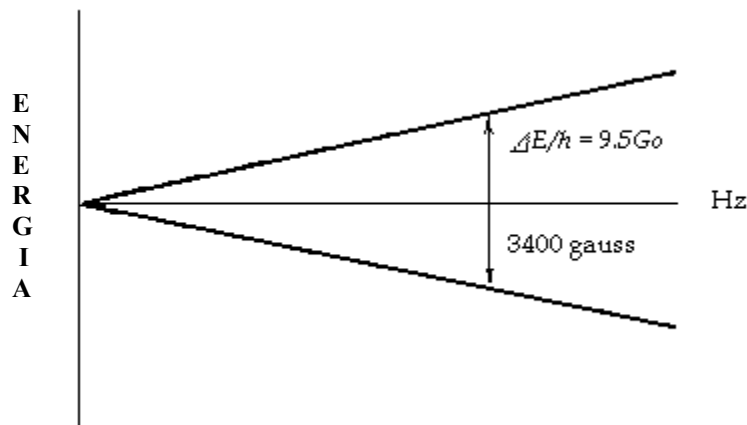


Fig.2.2-5 La variación de los niveles energéticos de spin con respecto a la fuerza del campo.

Hasta ahora sólo hemos considerado la interacción de un espín electrónico con un campo magnético externo. Lo más interesante para los químicos es la interacción entre el espín electrónico y los campos magnéticos internos, particularmente aquéllos propios del magnetismo de los núcleos en una misma molécula. Las interacciones magnéticas entre los espines electrónicos y los espines nucleares causan un espectro de rpe que consiste más bien de un grupo de líneas en vez de una sola. La distribución del grupo de líneas resultante en el espectro de rpe es llamado *estructura hiperfina* del espectro. Del número de líneas y de sus intensidades relativas podemos deducir el número y los espines de los núcleos con los cuales interacciona el electrón. Las separaciones entre las líneas están determinadas por los momentos magnéticos de los núcleos y por la fuerza de la interacción entre los espines electrónicos y cada uno de los espines nucleares.

Estas propiedades de la absorción de los espines electrónicos tiene gran significado para los químicos. Podemos utilizar la separación hiperfina para decir algo acerca de la función de onda electrónica molecular y podemos también utilizar el número de líneas de absorción y sus intensidades relativas para identificar los diferentes núcleos que tienen espines tan buenos como para indicar el número de núcleos equivalentes en una molécula.

En los modelos que no son magnéticos de la espectroscopía, la posición de una línea es la frecuencia o la banda de frecuencias a las cuales vemos la absorción de energía por la muestra en estudio. Esto es cierto también para la resonancia magnética si esperamos un campo magnético constante. Conforme variamos la frecuencia comenzamos a ver la absorción de una forma usual para cualquier método espectroscópico. Experimentalmente, sin embargo, es usualmente más fácil variar el campo con incrementos pequeños que variar la frecuencia de la radiación provista a la muestra. Cuando variamos el campo magnético y mantenemos la

frecuencia constante, la posición de la línea estará indicada por el valor del campo donde toma lugar la absorción.

Necesitamos, por supuesto, hacer independiente la línea de posición del espectrómetro que en particular se emplee. Si todos los espectrómetros de rpe operaran a la misma frecuencia, por ejemplo a 9.5 GHz, entonces los espectroscopistas podrían decirse los unos a los otros dónde están sus líneas por simple situación de la fuerza del campo.

Sin embargo, no solamente son diferentes frecuencias las que se utilizan en diferentes espectrómetros, sino que también la frecuencia de cada espectrómetro necesita ser variada un poco en diferentes experimentos con diferentes muestras. Consecuentemente no podemos utilizar tanto el campo como la frecuencia separadamente para denotar la línea de posición. En vez de ello, utilizamos una función del radio de la frecuencia, por ejemplo, la g de $h\nu = g\mu_0 H_z$. Las líneas de posición en rpe están situadas en término de los valores de g . Existe una leve dependencia de g sobre el campo magnético, pero en casi todos los usos de rpe esta dependencia puede ser ignorada.

La condición de resonancia, (Ec. 2.2-6), aplica tanto para electrones libres como para desapareados. Para electrones libres, g tiene el valor de 2.002319, para electrones desapareados en átomos, moléculas y cristales, g tiene un valor que parte de éste y depende de sus detalles electrónicos.

La discusión previa denota que las absorciones en rpe ocurren a un valor preciso del campo magnético aplicado y no a otro valor del mismo. En otras palabras, en esta perspectiva las líneas de rpe no poseen anchura, son infinitamente angostas.

La razón para esto es que los electrones no solamente interactúan con el campo externo aplicado sino que también interactúan magnéticamente con su entorno en la muestra, más o menos al azar. De esta forma el campo magnético resultante visto por una población de espines electrónicos no es del todo el mismo en todas partes de la población siempre que esté sujeta al mismo campo.

Debido a lo anterior, la línea de absorción de la resonancia obtenida por un valor dado del campo resultante será obtenida sobre un intervalo de valores del campo aplicado. Éstos dan a las líneas anchos finitos. Debido a que el ancho de las líneas es propio de las interacciones magnéticas de los espines electrónicos con el entorno de la muestra, los químicos podemos obtener información acerca del ambiente espin mediante la observación de las líneas y de la proporción de aumento o disminución de la intensidad. Ejemplos de estos efectos ambientales son los que hay entre moléculas vecinas que poseen espines desapareados (desde las cuales puede efectuarse una estimación del orden de magnitud de la distancia entre los centros paramagnéticos), vibraciones de las redes cristalinas, intercambio de espines electrónicos entre moléculas idénticas y diferentes e intercambio químico entre moléculas paramagnéticas y sus alrededores circunvecinos.

Los efectos ambientales que resultan en la forma y amplitud de las líneas en rpe se relacionan con los tiempos de relajación. Estos son los característicos “tiempos de vida” de la molécula en su estado de espin electrónico y representan la reorientación del espin electrónico por sentido “térmico”. Un efecto ambiental dado, dará origen a un tiempo de relajación particular y a una determinada forma de línea.

La intensidad de la señal de la resonancia paramagnética electrónica se determina mediante varios factores interconectados. Se determina por la frecuencia utilizada en el experimento, usualmente 9.5 GHz, la intensidad de la señal aumenta

rápidamente conforme la frecuencia se incrementa; por la concentración de la muestra paramagnética; por el poder de la radiación de resonancia aplicada por la probabilidad de la transición; y por la temperatura (siendo inversamente proporcional a la temperatura absoluta). La intensidad de la señal es realmente el área total bajo la curva de resonancia. Con todos los parámetros que afectan la intensidad tomada propiamente en consideración, esta área puede emplearse para determinar la concentración de los centros paramagnéticos en la muestra.

Estamos acostumbrados a ver en espectroscopía UV-visible, infrarrojo y rnm de alta resolución, líneas de absorción o “picos”. Los espectrómetros de rpe, sin embargo, casi siempre proveen la derivada del espectro de absorción (ver Fig. 2.2-6b). Por lo tanto, si la curva de absorción tiene la forma gaussiana, por ejemplo,

$$I = I_0 e^{-c(H-\bar{H}_z)^2} \dots\dots\dots(2.2-8)$$

Entonces la curva derivada tendrá la forma de

$$I_{deriv.} = \frac{dI}{dH} = -2cI_0(H - \bar{H}_z)e^{-c(H-\bar{H}_z)^2} \dots\dots\dots(2.2-9)$$

I = altura de la ordenada en la gráfica correspondiente a la de la señal.

I_0 = altura máxima de la ordenada, la cual ocurre en el centro del espectro a campo \bar{H}_z .

c = alguna constante positiva.

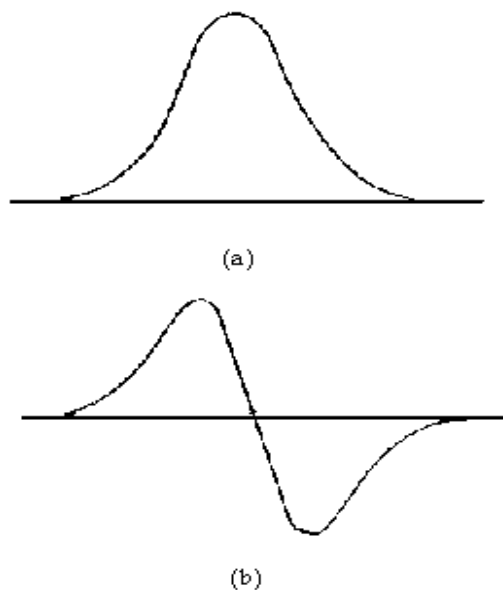


Fig. 2.2-6 (a) Un pico de absorción típico. (b) La derivada de un típico pico de absorción.

La mayoría de los electrones en átomos, moléculas y sólidos no dan señales en rpe. La razón es que la mayor parte de los electrones están apareados. Esto quiere decir que para cada electrón en estado $m_s = -1/2$ existe otro electrón que se encuentra en el mismo orbital y difiere del primero solamente en que se encuentra en el estado $+1/2$.

Bajo estas consideraciones, una transición del estado $-1/2$ al estado $+1/2$ podría colocar a los dos electrones en el mismo orbital y en el mismo estado de espín. El estatuto que evita que esto suceda es el principio de exclusión de Pauli. De acuerdo al principio, los electrones apareados no dan señales de rpe.

Los electrones desapareados no tienen una "pareja", ellos ocupan individualmente los orbitales. Las sustancias con electrones desapareados son llamadas sustancias paramagnéticas, entre ellas se incluyen radicales libres orgánicos, metales, cristales con ciertos defectos, moléculas inorgánicas y centros metálicos de proteínas.

2.2.1 Proteínas de Cu: plastocianina.

En los sistemas biológicos el cobre forma parte de numerosas proteínas, entre ellas la plastocianina, y sus funciones están relacionadas fundamentalmente con la transferencia electrónica, transporte y activación del dioxígeno.

Función/proteína	Reacción básica	Peso Molecular (kDa)
Transporte de O ₂ Hemocianina (moluscos y artrópodos)	$Hc + O_2 \rightarrow [HcO_2]$	n x 5 (moluscos) n x 75 (artrópodos)
Trasporte de electrones Plastocianina (plantas) Azulina (bacterias)	$Cu(II) + e \rightarrow Cu(I)$	10.5 15
Oxidasas "no azules" Galactosa oxidasa Amino oxidasas	$O_2 + 2H^{++} + 2e \rightarrow H_2O_2$	68 >70

Tabla 2.2.1-1 Ejemplos de las funciones de algunas proteínas de cobre.

Las proteínas de cobre se presentan en bajas concentraciones y juegan un papel importante tanto en animales como en plantas (tabla 2.2.1-1). En humanos, el cobre se encuentra en orden decreciente de concentración en hígado (10%), cerebro, corazón, músculo y riñón. En las proteínas, generalmente el cobre se encuentra muy protegido por los aminoácidos, lo que lo hace resistente a agentes químicos.

Las proteínas que contienen Cu se clasificaron tradicionalmente en función del tipo de "centro activo" que poseían (o lo que es lo mismo, del tipo de complejo que forman el metal y los residuos aminoácidos unidos a él), el cual fue caracterizado inicialmente haciendo uso de sus espectros de rpe y UV-visible. Sobre esta base experimental se identificaron tres tipos de centros que se denominaron Cu de tipo 1, 2 y 3. La señal típica de rpe de un centro de tipo 1 se caracteriza por tener una

componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfina $A_{//}$ muy pequeña ($A_{//} = 0.0063 \text{ cm}^{-1}$) comparada con la que tienen los complejos habituales de Cu(II) ($A_{//} = 0.012\text{-}0.020 \text{ cm}^{-1}$). Ello significa que el electrón desapareado del metal en la metaloproteína está deslocalizado sobre los ligandos del centro activo. Este comportamiento de rpe va acompañado, en las biomoléculas que contienen Cu tipo1, por una banda de absorción muy intensa ($\epsilon = 3000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\lambda = 600\text{nm}$). El análisis estructural mediante difracción de rayos-X de este tipo de cobre reveló la presencia de un entorno para el metal altamente distorsionado, con dos restos de His y uno de Cys dispuestos aproximadamente en un plano, y una Met situada a una mayor distancia y fuera de este plano.

El espectro de rpe del Cu tipo 2 tiene los parámetros característicos de la mayor parte de los complejos cúpricos y el centro presenta también una absorción normal en el espectro visible típica de los complejos de Cu(II).

El Cu tipo 3 es dinuclear y silencioso a rpe debido a un acoplamiento antiferromagnético y/o una rápida relajación de espín entre los dos centros metálicos.

Actualmente, algunos de los centros de Cu conocidos no encajan plenamente dentro de los tres tipos tradicionales, por lo que la clasificación inicial ha sido ampliada con nuevos tipos además de los descritos, incorporándose el denominado Cu tipo (2+3), que es un centro trinuclear constituido formalmente por un Cu tipo 2 y uno de tipo 3 interaccionando entre sí como en el caso del ascorbato oxidasa.

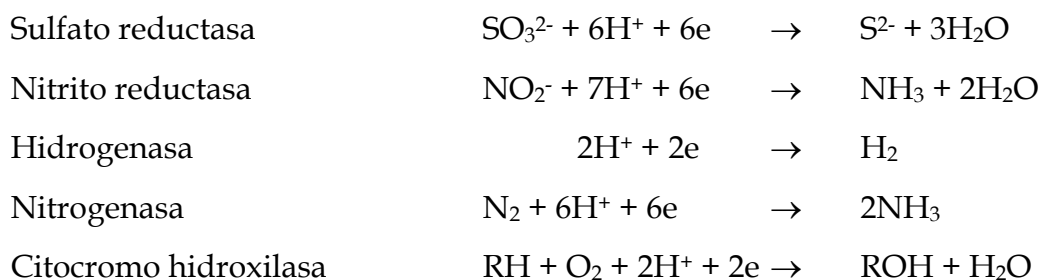
Proteína de Cu	$g_{//} (g_z)$	$g_{\perp} (o g_x, g_y)$	$A_{//} (o A_z)$	$A_{\perp} (o A_x, A_y)$
			$\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	
Ceruloplasmina				
Tipo 1	2.206	2.205	74	24
Tipo2	2.247	2.06	189	24
Superoxidasa dismutasa				
pH>12	2.179		190	
pH≈7	2.235	2.056	175	<10
Hemocianinas	2.296	2.04, 2.093	132	<10
<i>Polyborus versicolor</i>				
Tipo1	2.19	2.03	90	
Tipo2	2.243	2.036	194	
<i>Rhus vernicifera</i>				
Tipo1	2.298	2.047	43	
Tipo2	2.237	2.053	200	
Ascorbato oxidasa				
Tipo1	2.22		60	
Tipo2	2.23		200	
Galactosa oxidasa	2.273	2.058, 2.048	187	28, 29
Plastocianina	2.23	2.05	60	
Azurinas	2.26	2.06	60	~ 0

Tabla 2.2.1-2 Ejemplos de proteínas de cobre y sus valores de g y de sus constantes de acoplamiento A pertenecientes a rpe.

2.2.2 Proteínas de Fe-S: ferredoxina.

Este tipo de biomoléculas está formado por más de un centenar de metaloproteínas caracterizadas por contener cúmulos atómicos de Fe y S con diferentes estequiometrías. Están presentes en las células de casi todas las especies y son sintetizadas por la mitocondria.

Hasta estos momentos, se sabe que llevan a cabo tres papeles de gran importancia biológica: la transferencia electrónica, procesos de activación catalítica y funciones como biosensores de hierro, oxígeno, superóxido y otras especies.



Se distinguen dos clases de proteínas Fe-S que se comportan de forma diferente cuando se hidrolizan en medio ácido. Las denominadas ferredoxinas originan, en el transcurso de esta hidrólisis, el desprendimiento de H_2S , lo que no ocurre con las rubredoxinas.

En las ferredoxinas que contienen el cúmulo $[\text{2Fe-2S}]$ cada Fe completa una coordinación seudotetraédrica a expensas de su unión a dos restos cisteínicos.

Ambos núcleos metálicos están acoplados antiferromagnéticamente, posiblemente a través de los átomos S puente. Por otra parte, las medidas de rpe indican que el electrón desapareado del enzima reducido tiene la valencia localizada, es decir, los dos átomos de Fe no se reparten la valencia a partes iguales sino que hay un Fe(III) y un Fe(II).

Una característica estructural importante es la coordinación tetraédrica de los núcleos de hierro unidos covalentemente a la proteína a través de cisteínas. La mayor parte de las proteínas Fe-S son oxidoreductasas involucradas en transferencia de electrones y que son paramagnéticas en ciertos estados de

oxidación. Los centros Fe-S en estas proteínas pueden ser utilizados para seguir el progreso de la reacción enzimática empleando la espectroscopía de rpe.

En sus estados restantes, las proteínas que contienen el cúmulo [2Fe-2S], son diamagnéticas, debido al acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones de Fe(II) para dar un $S=0$ en el estado basal. Las formas reducidas son paramagnéticas con espín $-1/2$ en el estado basal, lo cual da origen a un espectro de rpe anisotrópico y $\langle g \rangle = 1.94$.

Este esquema general fue aplicado por primera vez por Gibson et al.¹¹, quien postuló la existencia de un acoplamiento antiferromagnético entre los dos átomos de hierro. Estos autores explican el diamagnetismo en el estado basal de la forma oxidada [Fe(III), Fe(III)], así como el valor $S=1/2$ del estado basal para la forma reducida [Fe(III), Fe(II)] de ferredoxina de espinaca. Este modelo admite la siguiente expresión para el tensor g del estado $S=1/2$:

$$\hat{g} = 7/3\hat{g}_1 - 4/3\hat{g}_2$$

donde \hat{g}_1 y \hat{g}_2 son los tensores locales de Fe(III) y Fe(II) respectivamente. Los valores experimentales $g_x=1.88$, $g_y=1.94$ y $g_z=2.4$, fueron encontrados por consideración de que el primer tensor es isotrópico con $g_1=2.019$ que es el valor observado para el Fe(III) en ZnS, así como por elección de los parámetros apropiados para un ion Fe(II) con una coordinación tetraédrica distorsionada. La validez del método se llevó a cabo por medio de otras técnicas como espectroscopía Mössbauer y ENDOR.¹² Además se realizaron experimentos de susceptibilidad magnética para [2Fe-2S] de plantas y cianobacterias, los cuales mostraron que las interacciones de intercambio pueden ser descritas por un Hamiltoniano $H_{ex} = -2J\vec{S}_1 \cdot \vec{S}_2$, donde J es igual a aprox. -180cm^{-1} en la forma oxidada y -90cm^{-1} en la forma reducida.¹³ La existencia de una estructura

punteada por dos sulfuros inorgánicos y la coordinación tetraédrica de los dos sitios de hierro ha sido confirmada por resolución de la estructura cristalina de rayos-X de varias ferredoxinas de diversas plantas.

Tipo de centro	Edo. Redox	Edo. oxidación	Señal en rpe	Intervalo de potencial redox (mV)
[2Fe-2S]	Oxidado Reducido	+2 +1	Ninguna <g>=1.96	-155 a -455
[3Fe-3S]	Oxidado Reducido	+3 +2	<g>=2.01 Ninguna	-420
[3Fe-4S]	Oxidado Reducido	+1 0	<g>=2.01 Ninguna	-130
[4Fe-4S] (HiPIP)	Oxidado Reducido	+3 +2	<g>=2.04 Ninguna	+50 a +450
[4Fe-4S] bajo potencial	Oxidado Reducido	+2 +1	Ninguna <g>=1.96	+30 a -550

Tabla 2.2.2-1 Ejemplos de cúmulos Fe-S y sus valores de g dados a través de rpe, estado de oxidación y potencial redox.

2.3 Acciones inhibitorias sobre sistemas fotosintéticos.

El proceso mediante el cual se sintetizan carbohidratos a partir de CO_2 y agua en presencia de luz (fotosíntesis) es único para plantas verdes. Consecuentemente, podemos anticipar que los herbicidas que inhiben este proceso no son tóxicos para los mamíferos. El medio por el cual la fotosíntesis puede ser inhibida por los herbicidas tiene que ver con a) la interferencia, reproducción, desarrollo, estructura e integridad de los cloroplastos; b) algunas rutas biosintéticas involucradas en la síntesis de productos y, finalmente con c) rutas de inducción fotoquímica involucradas en la conversión de energía radiante a energía química.

La unidad estructural de la fotosíntesis es el cloroplasto, el cual contiene un ADN circular y ribosomas (síntesis de proteínas). Los organismos fotosintéticos procariotes y eucariotes poseen sacos aplanados o vesículas llamadas tilacoides que contienen los pigmentos fotosintéticos; pero solamente los cloroplastos de los eucariotes están rodeados por una doble membrana. Los tilacoides se disponen en pilas que reciben el nombre de grana. El interior del cloroplasto entre las granas es el estroma proteico, donde se encuentran las enzimas que catalizan la fijación del CO_2 . Los cloroplastos poseen dos membranas y tres compartimentos: el estroma, el espacio tilacoidal y el espacio entre las membranas.

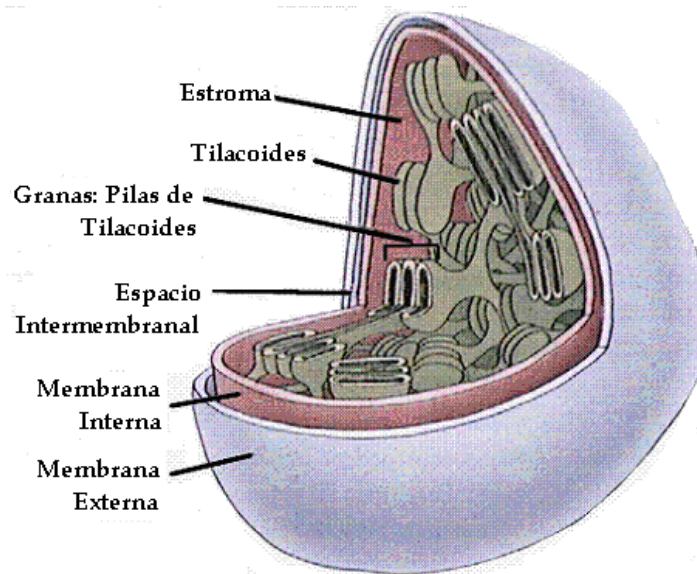
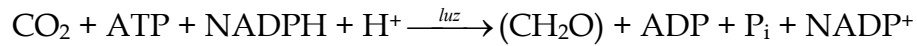
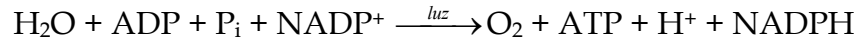


Fig.2.3-1 Estructura que muestra los compartimentos del cloroplasto.

Las reacciones catalizadas dentro de los cloroplastos se clasifican como reacciones lumínicas, las cuales dependen directamente de la luz, y las reacciones que ocurren en ausencia de ésta se llaman reacciones oscuras. Las dos series de reacciones pueden ser representadas por las siguientes ecuaciones desbalanceadas, cada una de las cuales suma una serie de eventos complejos:



El flujo de electrones desde un donador (agua) hasta un aceptor (NADP^+) es causado por la absorción de la luz. En dicho proceso se encuentran involucradas dos reacciones lumínicas que se identifican como fotosistema I y fotosistema II. El fotosistema I está asociado a las formas de *clorofila a*, que absorbe a longitudes de onda de 700nm (P_{700}), mientras que el fotosistema II tiene un centro de reacción que absorbe a una longitud de onda de 680nm (P_{680}). Cada uno de estos fotosistemas se encuentra asociado a polipéptidos en la membrana tilacoidal y absorben energía luminosa independientemente. En el fotosistema II, se produce la fotólisis del agua y la liberación de oxígeno; sin embargo, ambos fotosistemas operan en serie, transportando electrones a través de una cadena acarreadora de electrones. En el fotosistema I se transfieren dos electrones a la molécula de NADP^+ y se forma NADPH en el lado de la membrana tilacoidal que mira hacia el estroma.

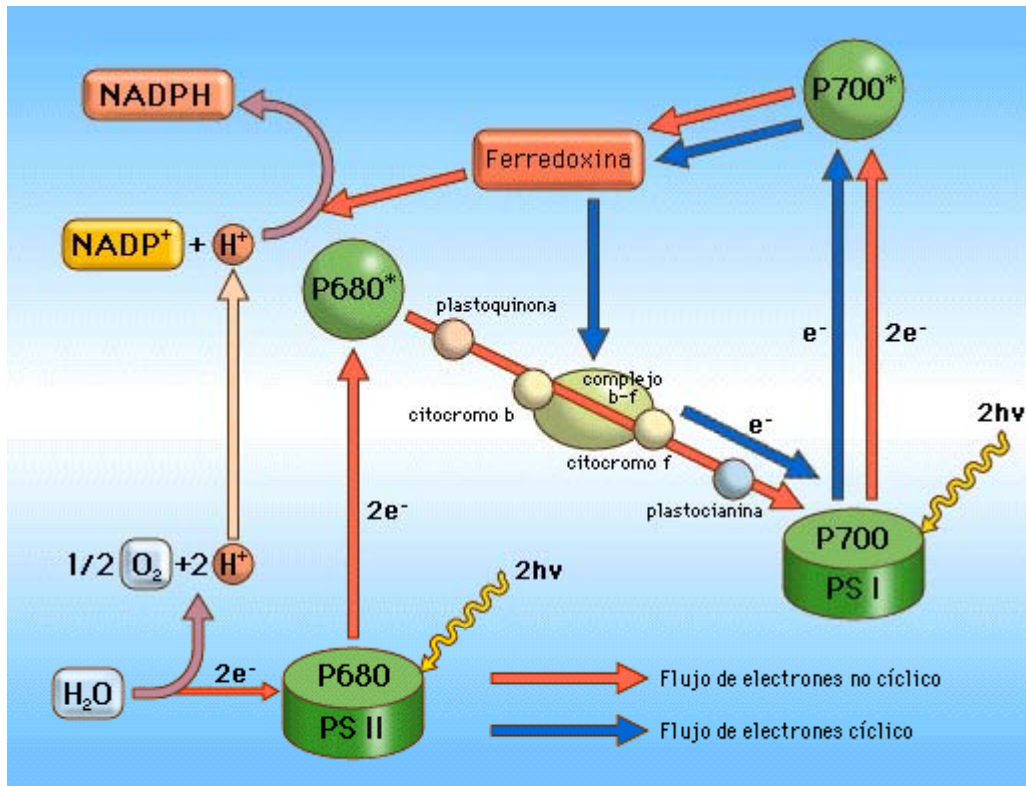


Fig.2.3-2 Esquema del flujo de electrones. PSI: fotosistema I, PSII: fotosistema II, P680: pigmento P680, P700: pigmento P700, complejo b-f: complejo citocromo b-f.

La fotofosforilación es la síntesis de ATP que se produce cuando se exponen cloroplastos aislados a la acción de la luz, en presencia de ADP y fosfato. La formación de ATP a partir de la reacción de ADP y fosfato, es el resultado del acoplamiento energético de la fosforilación al proceso de transporte de electrones inducido por la luz, de la misma forma que la fosforilación oxidativa está acoplada al transporte de electrones y al consumo de oxígeno en las mitocondrias.



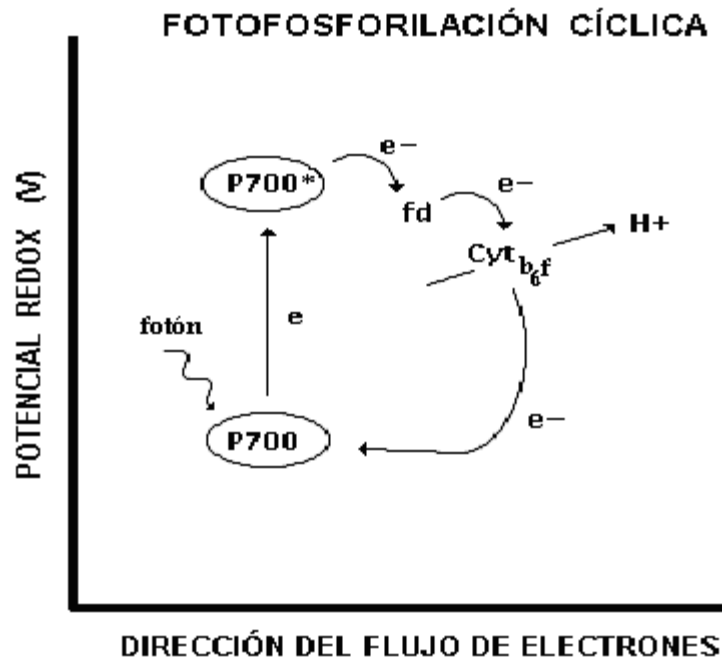
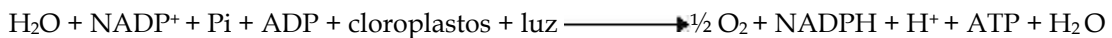


Fig.2.3-3 Esquema de la fotofosforilación cíclica. *P700*: pigmento *P700*, *fd*: ferredoxina, *Cyt b₆f*: complejo citocromo *b₆f*.

En el fotosistema I se realiza la síntesis cíclica de ATP, que es independiente de la fotólisis del agua y de la formación de NADPH; mientras que la fotofosforilación no cíclica está acoplada al transporte de electrones desde el agua, en el fotosistema II se lleva a cabo a través de una cadena transportadora de electrones hacia el fotosistema I, donde la ferredoxina cede dos electrones al NADP^+ para que se reduzca a NADPH.



La molécula de H_2O del lado izquierdo de la ecuación, cede los dos electrones necesarios para la reducción del NADP^+ y el átomo de oxígeno se libera en forma de $\frac{1}{2} \text{O}_2$. La molécula de H_2O del lado derecho de la ecuación procede de la formación de ATP a partir de la reacción de $\text{ADP} + \text{Pi}$.

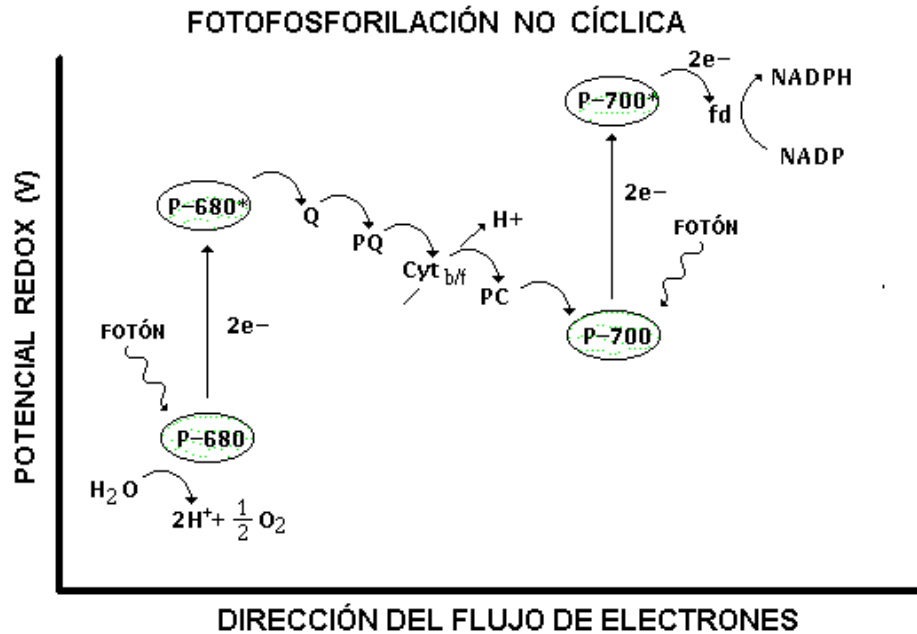
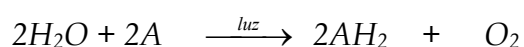


Fig. 2.3-4 Esquema de la fotofosforilación no cíclica. P680: pigmento P680, Q: aceptor electrónico inicial Q, PQ: plastoquinona, Cyt_{b/f}: complejo citocromo *b₆f*, PC: plastocianina, P700: pigmento P700, fd: ferredoxina.

En la membrana tilacoidal se generan protones (H^+) como resultado de la fotólisis del agua y de la oxidación de la plastoquinona (PQH_2), lo cual origina un fuerte gradiente de concentración de protones (H^+) al ser transportados del lumen tilacoidal hacia el estroma. Este gradiente de pH a través de la membrana es responsable de la síntesis de ATP, catalizada por la ATPsintetasa o conocida también como factor de acoplamiento; ya que acopla la síntesis de ATP al transporte de electrones y protones a través de la membrana tilacoidal.

El flujo cíclico de electrones tiene lugar en algunos eucariotes y bacterias fotosintéticas primitivas. No se produce NADPH, sino ATP solamente. Esto puede ocurrir cuando las células requieren un suministro de ATP adicional, o cuando no se encuentra presente $NADP^+$ para ser reducido a NADPH. En el fotosistema II, el bombeo de iones H^+ dentro del tilacoide crea un gradiente electroquímico que culmina con la síntesis de ATP a partir de $ADP + P_i$.

Se han realizado experimentos donde el NADP⁺ es sustituido por aceptores electrónicos artificiales dando origen a la producción de oxígeno, sin embargo, estos experimentos sólo involucran una parte de la cadena oxidativa. Esta observación se reportó por primera vez por R. Hill en 1937, donde demostró que la producción de oxígeno ocurría cuando se iluminaba una suspensión de cloroplastos aislados en la presencia de un donador-aceptor artificial según la siguiente ecuación conocida como la reacción de Hill,



donde A es el hidrógeno aceptor y AH_2 es su forma reducida.

Los herbicidas pueden clasificarse según el tipo de acción inhibitoria que provoquen; es así como existen a) inhibidores del transporte electrónico, los cuales remueven o inactivan uno o más de los intermediarios de la transferencia electrónica; b) desacoplantes, que inhiben la fosforilación, pero no la transferencia electrónica, disociando la transferencia de electrones a partir de la formación de ATP; c) inhibidores de la transferencia electrónica, éstos actúan directamente sobre la fosforilación, inhibiendo tanto el transporte electrónico como los sistemas acoplados a la formación de ATP; d) inhibidores desacoplantes, que poseen más de un sitio de acción, pues la respuesta inhibida se asocia tanto con los inhibidores de la transferencia electrónica como con los desacoplantes; y e) aceptores electrónicos, que son los que compiten con algún componente de la ruta del transporte electrónico y subsecuentemente se someten a reducción.

Algunos derivados de la urea, como el monurón o CMU (3-p-clorofenil-1,1-dimetilurea) y el DCMU [3-(3,4-di-clorofenil) -1,1-dimetil urea] , se aplican al suelo y se desplazan por el xilema hasta las hojas, donde bloquean el transporte de

electrones entre las plastoquinonas. Inhiben la reacción de Hill en el fotosistema II, por lo que no ocurre la fotólisis del agua ni la liberación de O_2 .

Ciertos herbicidas a base de triazinas, como la simazina y atrazina bloquean el transporte de electrones entre las plastoquinonas. El maíz y el sorgo son tolerantes a las triazinas, pero no así a los derivados de la urea; ya que contienen enzimas que detoxifican dichos compuestos. Los herbicidas como el diquat y paraquat (gramoxone), actúan inhibiendo el flujo de electrones entre la ferredoxina y el NADP, y reduce el oxígeno a un radical superóxido (O_2^-), que produce la pérdida de la actividad de los cloroplastos.

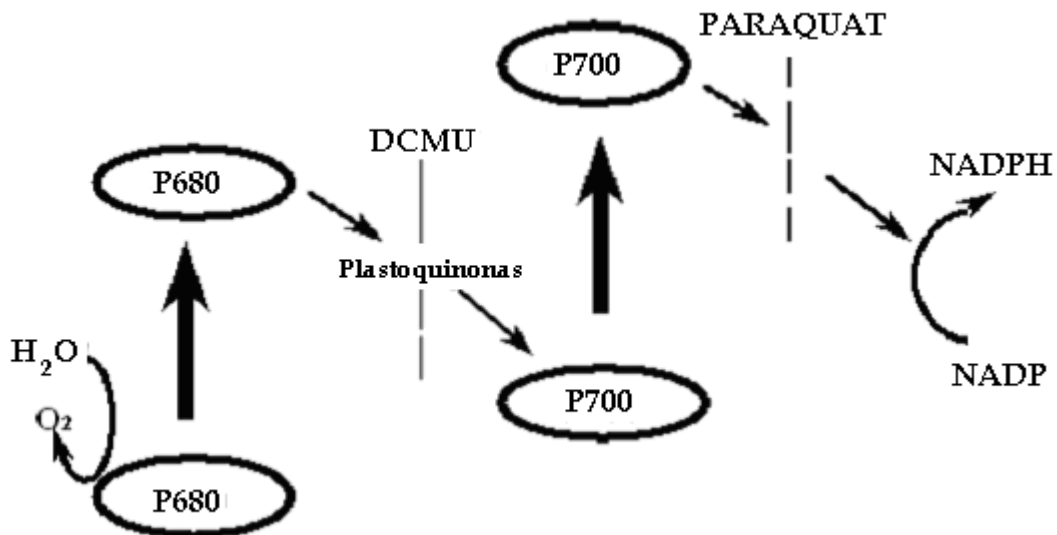


Fig. 2.3-5 Esquema que muestra la función inhibitoria del DCMU y del herbicida paraquat.

2.4 Plastocianina

La plastocianina es una pequeña proteína que contiene cobre y que se encuentra en la membrana tilacoidal. Fue descubierta por primera vez en el alga verde *Chlorella ellipsoidea* por Katoh en 1960¹⁵. Posteriormente, se descubrió que la proteína también se encontraba en una amplia variedad de organismos

fotosintéticos incluyendo todas las plantas superiores, algunos tipos de algas y cianobacterias¹⁶.

La plastocianina juega un rol central en la fotosíntesis, pues actúa como una proteína acarreadora de electrones entre el complejo citocromo b_6f y el fotosistema I. Específicamente, el centro de reacción de clorofila $P700$ que se encuentra en el fotosistema I es reducido por la PCu y la PCu ahora oxidada es reducida por el citocromo f .^{15,17}

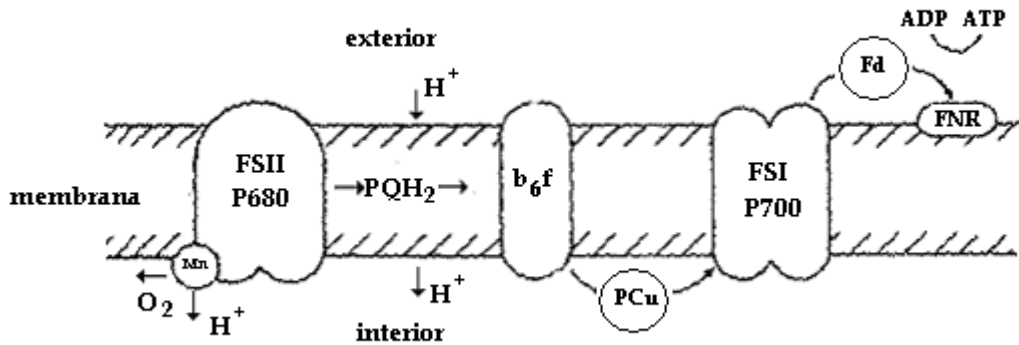


Fig. 2.4-1 Esquema de la localización de las metaloproteínas en la cadena fotosintética. FSI: fotosistema I, FSII: fotosistema II, P680: pigmento P680, P700: pigmento P700, b_6f : complejo citocromo b_6f , PQH₂: plastoquinona, FNR: ferredoxina-NADP reductasa, PCu: plastocianina y Fd: ferredoxina.

Variando entre 99 y 103 aminoácidos, la plastocianina es una proteína de alrededor de 10,400 Da. Gracias a los estudios espectroscópicos de rmn y cristalografía de rayos-X se han determinado las estructuras primarias de más de 30 especies diferentes, comparándose entre sí las secuencias de plantas superiores y resultando ser muy similares (45 aminoácidos son idénticos y 18 son similares)³.

Las cupredoxinas se dividen dentro de subgrupos, puesto que el número de ligantes no es constante. A pesar de estas diferencias, la geometría del sitio de

cobre azul (o tipo I) se conserva altamente en estas proteínas (His37, His87, Cys84 y Met92).

La conformación del cobre en la plastocianina es tetraédrica distorsionada y las distancias son 2.1 Å y 2.0 Å para Cu-N de las histidinas, 2.1 Å para Cu-S de la cisteína y 2.9 Å para Cu-S de la metionina. Esta última distancia inusual parece ser la responsable de la conservación de la estructura del sitio activo al llevarse a cabo la transferencia electrónica.³

Dos de los ángulos de enlace del átomo de cobre difieren en más de 20° de un tetraedro regular.¹⁸

La estructura es de forma cilíndrica con dimensiones de 40 X 32 X 28 Å y el sitio de enlace del metal se encuentra a 6 Å dentro de la proteína. El interior de la proteína es de carácter hidrofóbico mientras que la superficie es de carácter hidrofílico, pues es donde se encuentran de forma asimétrica los aminoácidos cargados y polares.

En el lado que contiene al átomo de cobre (lado norte de la proteína) tenemos una superficie hidrofóbica que comprende los residuos aminoácidos Gly10, Leu12, Phe35, Pro36, Ala90, Gly91 y Met92.³

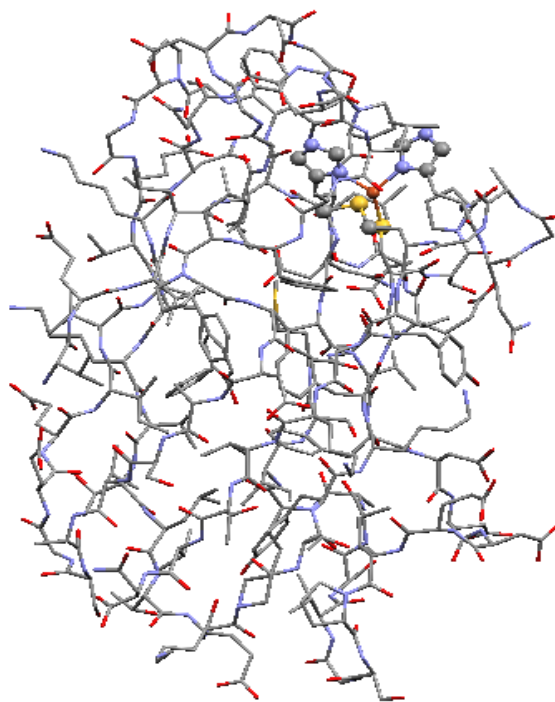


Fig. 2.4-2 Estructura completa de la plastocianina nativa de espinaca. Base de datos de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/index/html>).

Todas las características estructurales dan presencia a ciertas propiedades físicas asociadas con el sitio de cobre. Estas incluyen un alto coeficiente de extinción molar en la región visible cerca de 600 nm, una única combinación de valores $A_{//}$ y $g_{//}$ de las señales de rpe y un alto potencial de reducción ($E'_0 = 370$ mV para el par Cu(II)/Cu(I)) comparado con el del par acuoso $\text{Cu}^{2+}_{(\text{ac})}/\text{Cu}^{+}_{(\text{ac})}$ ($E'_0 = 170$ mV).¹⁹

En la literatura se pueden encontrar diferentes valores para el coeficiente de extinción molar, ϵ , a 597 nm, los cuales van desde $4500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ hasta $4900\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La relación $\epsilon_{278}/\epsilon_{597}$ se ha determinado en 1.2. Se sabe que el color azul se origina por una transferencia de carga del orbital π S(Cys) al $d_{x^2-y^2}(\text{Cu})$.¹³

Se han llevado a cabo numerosos intentos para describir las interacciones entre la plastocianina y sus pares redox. Otros experimentos se han basado en

modificaciones químicas hechas sobre los residuos aminoácidos y en el enlace con complejos inorgánicos. Estas investigaciones sugieren la posibilidad de que haya dos diferentes tipos de sitios de enlace en la plastocianina para sus pares redox. Se han propuesto dos sitios para la transferencia electrónica en PCu, el primero cercano al ion cobre y el segundo por la región ácida (lado este de la proteína) formada por los residuos Asp42, Glu43, Asp44 y Glu45.^{20, 21}

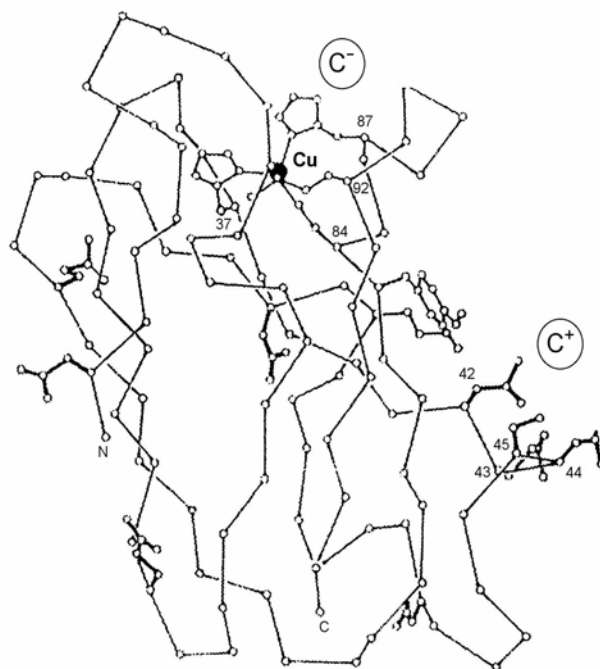


Fig. 2.4-3 Estructura de la plastocianina mostrando los sitios de unión de compuestos catiónicos C⁺ y aniónicos C⁻.

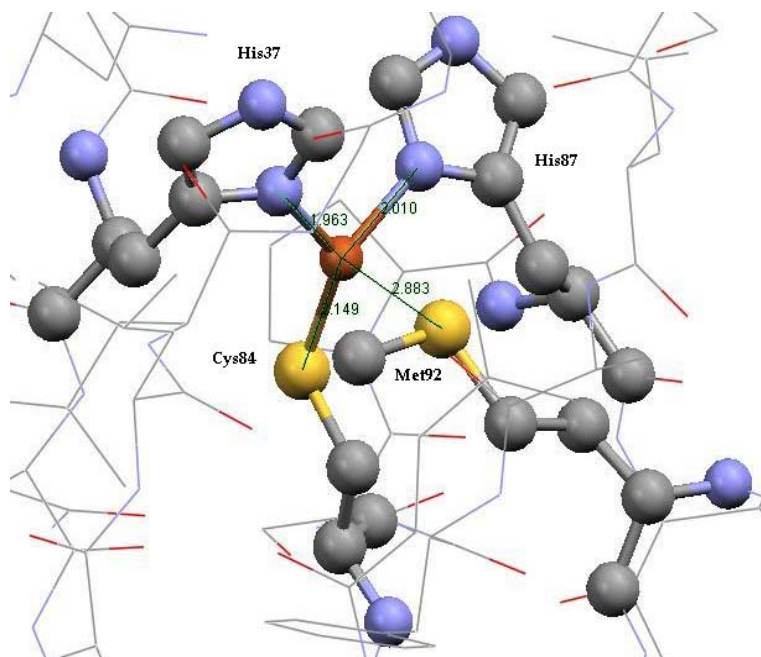


Fig. 2.4-4 Sitio activo de la plastocianina nativa de espinaca mostrando los ligantes axiales y planares. Base de datos de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/index/html>).

2.5 Ferredoxina

Las ferredoxinas se encuentran en diversos sistemas biológicos simples y complejos donde ocurren transferencias electrónicas. Las más simples son las que contienen un cúmulo [2Fe-2S], donde los átomos puente de azufre son lábiles.²²

La ferredoxina funciona como acarreador de electrones en los sistemas fotosintético y respiratorio. Es el aceptor electrónico final del fotosistema I, al ser reducida interactúa con la proteína ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) y una flavoproteína, catalizando la reducción del NADP⁺ a NADPH. Durante la transferencia electrónica en la cadena fotosintética, no importando la presencia de 2 átomos metálicos, solamente es transferido un electrón por cada centro. La ferredoxina es una proteína pequeña de aproximadamente 10,000 Da que consiste en un centro donde 2 hierros no hemo se encuentran puenteados por 2 sulfuros;

cada hierro se coordina en un arreglo tetraédrico a 2 cisteínas de la cadena polipeptídica de la proteína. La estructura del complejo se puede formular como $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4]^{3-}$ en su estado reducido. A través de resultados espectroscópicos se concluye que el estado oxidado comprende 2 Fe(III) de alto espín no equivalentes; mientras que en su estado reducido se tiene un Fe(II) y un Fe(III), ambos de alto espín.¹

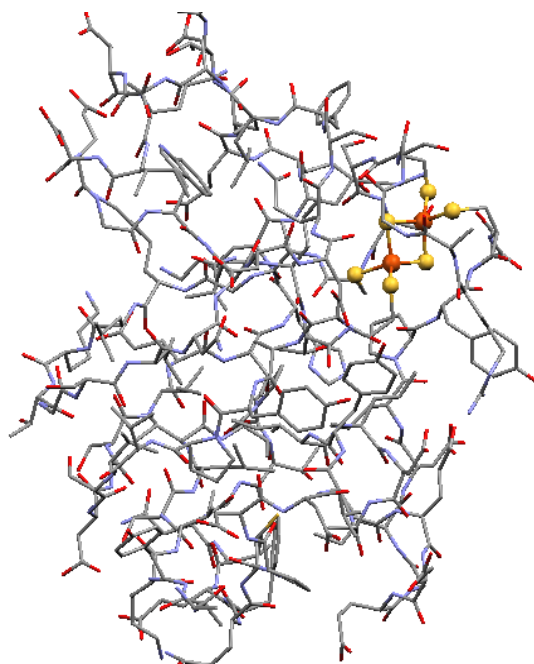


Fig. 2.5-1 Estructura completa de la ferredoxina nativa de espinaca. Base de datos de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/index/html>).

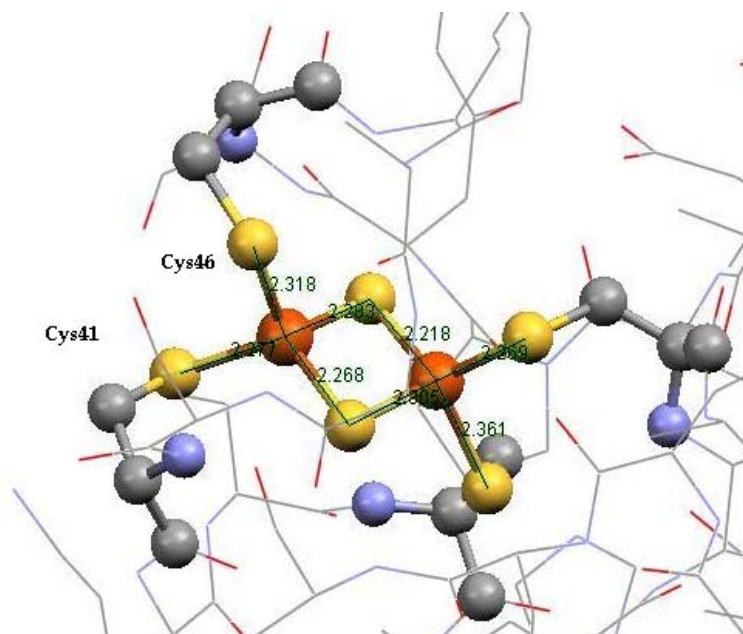


Fig. 2.5-2 Estructura del centro activo de ferredoxina nativa de espinaca. Base de datos de Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/index/html>).

Se han resuelto las estructuras de rayos-X para varias ferredoxinas, entre ellas la del alga azul *Spirulina plantesis*, para lo cual se halló que los dos átomos de hierro se localizan a una distancia aproximada de 5 Å de la superficie. Los datos espectroscópicos indican que el átomo de hierro más cercano a la superficie, el coordinado a los residuos Cys41 y Cys46, es el que participa en la transferencia electrónica. Lo anterior implica que el otro átomo de hierro posee un valor de potencial mucho más negativo. El cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ es plano, y la distancia Fe-Fe es de 2.72 Å, lo que es una evidencia de la interacción metal-metal. Cabe destacar que en la estructura se encuentra una protuberancia sobre la superficie molecular de las dos cisteínas 41 y 46 que se coordinan a un átomo de hierro. El centro $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ se encuentra predominantemente en una región hidrofóbica. Comparaciones de las secuencias de aminoácidos entre ferredoxinas de cloroplastos de diversos organismos como lo son algas verde-azules y plantas superiores, indican que la

cavidad de enlace del cúmulo [2Fe-2S] y los residuos vecinos se conservan en gran medida.²³

El potencial de reducción de la Fd es de aproximadamente -420 mV, lo cual es muy bajo. De la secuencia aminoácida se observa una carga negativa total de la proteína estimada en -17 para su estado reducido a pH 7.²⁴

La proteína oxidada es silenciosa a rpe y de color café-rojizo, su color se ve disminuido en su estado reducido y es paramagnética, mostrando un espectro a baja temperatura característico de un electrón desapareado.

Estudios sobre la asociación de los complejos inorgánicos a las metaloproteínas realizados por rmn ^1H nos proporcionan una evidencia del mecanismo propuesto tanto para la transferencia electrónica como para la inhibición, ya que se mantiene la formación del aducto proteína-complejo metálico anterior a la transferencia electrónica, además de evidenciar el uso de diferentes sitios de asociación.

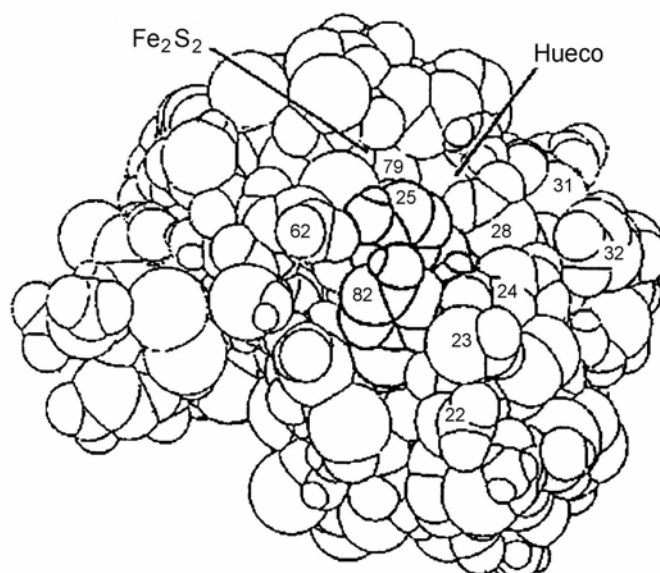


Fig. 2.5-3 Estructura de la ferredoxina de *A. variabilis* mostrando el sitio de unión.

4. Sección experimental

4.1 Reactivos

Tris	Aldrich
Acetona técnica	
NaCl	Aldrich
$K_3[Fe(CN)_6]$	Aldrich
Na_2HPO_4	Sigma
NaH_2PO_4	Sigma
K_2HPO_4	Baker
KH_2PO_4	Aldrich
Resina dietilaminoetil celulosa DE32	Whatman
Resina dietilaminoetil celulosa DE52	Whatman
Resina Sephadex G-75	Sigma
Resina S-100 HR	Sigma
HCl concentrado	Aldrich
NaOH	Aldrich
Ascorbato de sodio	Aldrich
Sacarosa	Aldrich
Peptona	Aldrich
Extracto de levadura	Aldrich
$CuSO_4$	Aldrich
$MgCl_2$	Aldrich
IPTG	Fluka
DMSO	Aldrich
Ditionito de sodio	Aldrich

4.2 Aislamiento y purificación de metaloproteínas.

4.2.1 Producción de PCu por sobreexpresión en *Escherichia coli*.

Se expresó el gen de plastocianina de espinaca dentro de un vector *pUC18* que se encuentra bajo control de un represor (*represor lac*) que es un plásmido multi-copia. Posteriormente, el vector se transfiere dentro de las bacterias de *Escherichia coli* *RV308*, donde la proteína madura y se expresa en el espacio periplasmático.

Autoclave

1. Se preparan 3 litros de medio LB por separado en matraces de 1L. Se adiciona 1 mL de NaOH 1M a cada matraz.
2. Se cubren las bocas de los matraces con papel aluminio y se introducen al autoclave (121°C) por 25 min.

Preparación de 1L de medio LB: 10g peptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, y se lleva a 1L con agua destilada.

Precultivo

1. Se pica una colonia de bacterias de *E. coli* transformadas con un palillo de madera estéril y se adiciona dentro de un matraz de 250 mL que contenga 30 mL de medio LB y la cantidad correcta de ampicilina (100mg/mL).
2. El matraz se somete a agitación a 37°C y 175 rpm de 6 a 8 horas.

Empaquetamiento de las columnas.

1. Se empaqueta el gel DE32 en la columna adecuada.

2. Se equilibra la columna con Bis-Tris 20mM, pH 6, CuSO₄ 100μM hasta que el pH del buffer que sale de la columna sea el mismo que el del buffer que entra.
3. Se empaca la columna para filtración en gel con 500 mL de gel S-100 HR.

Comienzo del cultivo.

1. A cada matraz de 1L se adicionan 100 mg/mL de ampicilina, 1 mL de IPTG 0.5M y 100μL de CuSO₄ estéril y previamente filtrado.
2. Se inocula el cultivo 1:100 repartiendo el contenido del matraz de 250 mL en los 3 matraces de 1L (aprox. 10 mL de medio LB a cada uno) y se dejan en agitación a 150 rpm y 37°C durante 16 horas.

Preparación de la disolución de IPTG: se disuelven separadamente 0.4g de ampicilina y 0.48g de IPTG en 3 mL de agua destilada, se filtra y se diluye a 4 mL y se mantiene en frío.

Cosecha.

1. El contenido de los 3 matraces se vierte a recipientes de 1L para centrifugación. Previo a ello, los recipientes para centrifugación se pesan vacíos.
2. Se precipitan las células en una centrífuga Beckman J6-MC a 4000 rpm por 40 min.
3. Se desecha el supernadante.
4. Se pesan los recipientes y se determina el peso de las células precipitadas.

Preparación del espacio periplasmático.

1. Se adiciona un pequeño volumen de disolución de sacarosa para resuspender el precipitado y la disolución se transfiere a recipientes JA10.
2. El resto de la disolución de sacarosa se añade para equilibrar los recipientes y se dejan éstos en hielo por 10 min.
3. Los recipientes se introducen en una centrífuga Beckman JLA 10500 a 9000 rpm durante 20 min. Se remueve el supernadante.
4. Se repiten los pasos 1-2 con solución fría de $MgCl_2$ y los recipientes se dejan por 15 min. en hielo.
5. Se centrifuga a 9000 rpm por 25 min. y se rescata el supernadante.

Preparación de la disolución de sacarosa: se preparan 400 mL de 20% p/v sacarosa, 0.3M Tris, pH 8.1, EDTA 1mM, $CuSO_4$ 100 μ M, (debe mantenerse a baja temperatura).

Preparación de la disolución de $MgCl_2$: se preparan 400 mL de 0.5 mM $MgCl_2$, 100 μ M $CuSO_4$, (debe mantenerse a baja temperatura).

Desnaturalización por pH.

1. A la disolución rescatada anteriormente se le adicionan 30 μ L de $CuSO_4$ 1M y cuidadosamente se lleva hasta pH 5 utilizando HCl 1M con agitación constante durante 15 min.
2. La disolución se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min. en una centrífuga Beckman JLA 10500. Se rescata el supernadante.

Intercambio iónico.

1. La disolución de plastocianina se ajusta a 20mM Bis-Tris pH 6 con disolución amortiguadora Bis-Tris 1M pH 6.
2. Se eluye la muestra en la columna (cuarto frío).
3. Se conecta un detector de UV.
4. Cuando la muestra ha sido eluida, la columna se enjuaga con un volumen de Bis-Tris 20mM, pH 6, 100 μ M CuSO₄.
5. Se eluye la proteína con un gradiente de sal (250 mL de Bis-Tris 20mM, pH 6, 100 μ M CuSO₄, 500mM NaCl).
6. Se colectan fracciones de 10 mL de la proteína azul.
7. Se combinan las fracciones y se lleva a pH 7.5.
8. La columna de filtración en gel se equilibra durante toda la noche con 500 mL de Tris 100mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, 100 μ M CuSO₄.

Concentración de la muestra de plastocianina.

1. La disolución de plastocianina se vierte en tubos de concentración MWCO 5000 de 20mL y se someten a centrifugación durante 15 min.
2. Cuando el volumen es de aproximadamente 10 mL se le adicionan 500 μ M de disolución de K₃Fe(CN)₆ 5mM para oxidar la proteína y la mezcla se filtra.

Filtración en gel.

1. Se lleva a cabo en un cuarto frío. Se eluye la disolución de plastocianina en una columna S-100 y se corre a 0.5 mL/min. durante toda la noche.
2. Se colectan fracciones de 10 mL con el detector de UV trabajando.

Concentración de plastocianina.

1. Se introducen 20 mL de disolución de proteína a un tubo de concentración y se centrifuga a velocidad media. De ser necesario el tubo se vuelve a llenar con disolución y se repite el paso hasta obtener la concentración deseada.
2. Se intercambia el buffer por medio de concentraciones y diluciones repetitivas hasta tener Tris 20 mM, pH 7.0 en los tubos de concentración.

Purificación.

1. La disolución de plastocianina se eluye en una columna de intercambio iónico nuevamente. (Resource Q).

Liofilización.

1. La disolución de plastocianina se concentra como en el paso anterior y se vierte en tubos eppendorf de 1 mL con tapas agujeradas y se dejan en una liofilizadora Virtis 6DX66 durante aproximadamente 6 hrs.

4.2.2 Aislamiento de PCu y Fd a partir de hojas de espinaca.

Se parte de 10 kg de hojas de espinaca frescas, lavadas, drenadas y sin tallo. Se empacan en lotes de 1 kg y se refrigeran hasta que son utilizadas. Todo el procedimiento se realizó en un cuarto frío.

Extracción de cloroplastos.

1. Se homogeneizan las hojas en lotes de 1 kg con 900 g de hielo picado, 100 mL de disolución amortiguadora Tris/HCl 1M, pH 7 y 1L de una disolución de sacarosa 0.6 M, NaCl 0.075 M en una licuadora con capacidad de 4L.
2. El homogeneizado se filtra a través de varias capas de tela tipo gasa y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min. en una centrífuga Beckman JLA 10500 y se descarta el sobrenadante.
3. Los cloroplastos que contienen las metaloproteínas se resuspenden en disolución amortiguadora Tris/HCl 0.5 M, pH 7.

Extracción de las metaloproteínas.

1. A la disolución anterior se le adiciona lentamente y con agitación constante acetona helada (-20°C) hasta un 35% del volumen total, con lo cual se rompen los cloroplastos, liberándose así las proteínas.
2. Los fragmentos de cloroplastos se retiran por centrifugación y se recupera el sobrenadante.
3. Al sobrenadante se le adiciona acetona helada (-20°C) hasta un 80% del volumen total y el precipitado formado se deja reposar durante 4 horas.

Separación de PCu y Fd.

Se realiza la separación de las metaloproteínas a través de una columna de intercambio aniónico (DE32), ya que la PCu posee carga de -9 y la Fd de -18 en sus estados reducidos a pH 7.

1. El precipitado café formado se resuspende en disolución amortiguadora Tris/HCl 0.06 M, pH 7.

2. El resuspendido se dializa durante 6 horas con el mismo buffer previamente desgasificado para remover impurezas de bajo peso molecular.
3. El dializado café-rojizo se centrifuga para remover cualquier material insoluble y se carga en una columna DE52 previamente equilibrada en Tris/HCl 0.06 M, pH 7. La columna se equilibra al eluir 3 veces el volumen del buffer correspondiente con respecto al volumen de resina.
4. Se eluye la PCu en primer lugar con la disolución amortiguadora Tris/HCl 0.06 M, pH 7, NaCl 0.2 M. La presencia de PCu se verifica adicionando $K_3[Fe(CN)_6]$, lo que da una coloración azul.
5. La Fd oxidada se eluye con disolución amortiguadora desgasificada Tris/HCl 0.06 M, pH 7, NaCl 0.5 M.

Purificación de PCu y Fd.

1. La PCu aislada se reduce con ascorbato de sodio y se adiciona un volumen de agua fría equivalente al triple del volumen de la disolución que contiene la proteína.
2. La proteína diluida se carga en una columna DE52 equilibrada con disolución de fosfatos 20mM, pH 7.0.
3. La proteína se eluye con disolución amortiguadora de fosfatos 0.15 M, pH 7.0, su presencia se prueba oxidándola con $K_3[Fe(CN)_6]$.
4. En su forma oxidada se adiciona un volumen de agua fría igual al triple del volumen de la proteína.
5. La PCu oxidada se carga nuevamente a una columna DE52 y se eluye con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.0.
6. El eluido se concentra por ultrafiltración en un equipo Amicon utilizando una membrana YM5, hasta un volumen aproximado de 30 mL.
7. Utilizando la PCu concentrada, se lleva a cabo una filtración en gel empleando para ello el gel Sephadex G-75.

Para la purificación de Fd todas las disoluciones amortiguadoras empleadas deben desgasificarse previamente y se utilizan condiciones anaerobias.

8. La disolución de Fd se concentra por medio de ultrafiltración en un equipo Amicon utilizando una membrana YM5.
9. Se empaca una columna para filtración en gel con Sephadex G-75.
10. Se eluye la proteína con disolución amortiguadora Tris/HCl, pH 7.0.
11. Se colectan 3 fracciones, para ello es importante inyectar nitrógeno al recipiente donde se colecten.
12. La fracción intermedia es la más importante por lo que se concentra en un equipo Amicon utilizando la membrana antes mencionada.

4.3 Caracterización de PCu y Fd por espectroscopía UV-visible.

1. Previo a la liofilización de la PCu expresada en *E. coli*, se tomaron los espectros electrónicos para cada una de las diferentes fracciones obtenidas después de cada columna cromatográfica, en un espectrómetro UV-visible Varian Cary 4 de 700 nm a 240 nm con un intervalo de 0.5 nm, para lo cual se adicionaron 5µL de $K_3Fe(CN)_6$ 5mM.
2. Para las metaloproteínas aisladas a partir de hojas de espinaca se tomaron los espectros electrónicos en disolución en un espectrofotómetro UV-visible HP8452A en el intervalo de 190 a 800nm.

4.4 Preparación de PCu y Fd para estudios de rpe.

Los estudios de rpe sobre plastocianina fueron llevados a cabo en Boston en un equipo marca Brucker, para lo cual se enviaron dos tubos eppendorf que contenían proteína liofilizada para su mejor manejo, obtenida a partir de sobreexpresión en *E.*

coli, de manera que al adicionar a cada tubo 1mL de buffer las soluciones de plastocianina fueran :

1. PCu 300 mM, Tris/HCl 75 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5, μ 0.1M (NaCl).
2. PCu 300 mM, Tris/HCl 75 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5, DMSO 25% v/v, μ 0.1 (NaCl).

Para los estudios de ferredoxina se empleó la proteína aislada a partir de hojas de espinaca, los experimentos fueron realizados en el equipo BRUCKER ELEXSYS E-500 de la USAI.

1. Se preparó una solución de Fd 400 mM, Tris/HCl 75 mM , NaCl 100 mM, pH 7.5, μ 0.1M (NaCl) y exceso de ditionito de sodio.
2. Se preparó otra solución de Fd 400 mM, Tris/HCl 75 mM, pH 7.5, DMSO 25% v/v, μ 0.1 y exceso de ditionito de sodio.
3. Cada solución se vierte a los respectivos tubos para rpe hasta la marca y se congela la muestra lentamente sumergiendo los tubos en N₂(l).
4. Las muestras se corren en el equipo de rpe a 15 K , en banda-X, es decir, frecuencia de 9.5 GHz. Al término los tubos se sumergen en agua para descongelar las muestras lentamente.
5. Las muestras se recuperan y se congelan.

NOTA: Debe trabajarse rápidamente con la ferredoxina para evitar su desnaturalización al contacto con O₂.

5. Resultados y Discusión

5.1 Aislamiento , purificación y caracterización de PCu y Fd.

La ferredoxina es distribuida por Aldrich a un alto costo y baja pureza y la plastocianina no se encuentra comercialmente disponible. Por estas razones se utilizaron dos métodos para la obtención de dichas metaloproteínas.

En el primero, la plastocianina se sobreexpresó en la bacteria de *E. coli* según el método diseñado en el Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad de Göteborg y la Universidad Tecnológica de Chalmers en Suecia²⁵, donde se clonó un gen para plastocianina de espinaca dentro de un vector (*pUC18*) asociado al control de un represor que es un plásmido del cual existen cientos de copias en la célula . Posteriormente, el vector se transfiere dentro de la bacteria de *Escherichia coli*, donde la proteína madura y se expresa en el espacio periplasmático. Dicho espacio contiene algunos cientos de proteínas comparadas con las más de 2000 proteínas que se encuentran en el espacio intracelular. Por exposición de las células a un choque osmótico, las proteínas son liberadas y después las células que no son de interés son removidas por centrifugación.

Muchas de las proteínas contenidas en *Escherichia coli* tienen un pI entre 8 y 5 por lo que pueden ser desnaturizadas disminuyendo el pH. El pI de la plastocianina es de 3.8, lo cual significa que la proteína no se verá afectada por dicho tratamiento.

El DE32 es un intercambiador aniónico que enlaza proteínas con pI menor al pH del buffer utilizado. Debido a que la plastocianina puede desnaturizarse a pH's

bajos, se emplea el incremento en la fuerza iónica para eluir la proteína enganchada.

Las fracciones de proteína obtenidas se juntan y la solución se concentra, una vez hecho esto, se eluye la muestra en una columna para filtración en gel donde la separación se basa en la exclusión por tamaño. Finalmente, la purificación se basa en una columna de intercambio iónico.

La caracterización y verificación de la pureza de la PCu (II) se realizó por medio de espectroscopía UV-visible, para lo cual se halló un máximo de absorción a 597 nm (el coeficiente de extinción molar se determinó en $4.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una relación de máximos de absorción A_{278}/A_{597} igual a 1.15. Asimismo se determinó que se obtuvieron 30 mg de proteína.

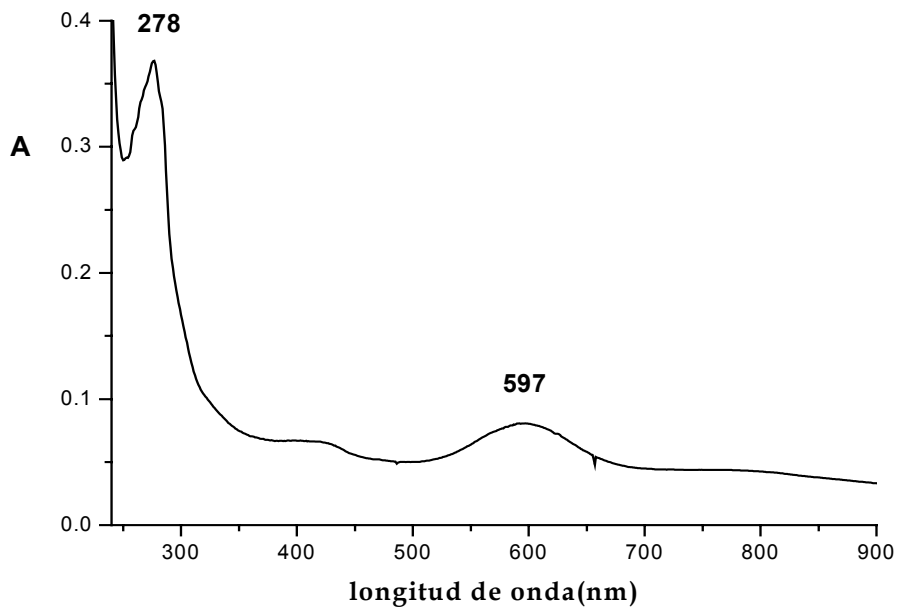


Fig. 5.1-1 Espectro electrónico de la PCu nativa de espinaca obtenida por sobreexpresión en *E. coli*.

El segundo método consistió en el aislamiento a partir de 10 kg de hojas frescas de espinaca, el cual es una modificación de los métodos informados por Borchert en

1970²⁶ y Morand en 1993²⁷. Primeramente, se aíslan los cloroplastos en solución acuosa y posteriormente se rompe la membrana de los mismos por la adición de acetona helada. De este procedimiento se aíslan simultáneamente la dos metaloproteínas, eluyéndose en primer lugar la plastocianina con carga negativa de -9 a pH 7.0 y en segundo, (por aumento en la concentración de cloruros en el eluyente), la ferredoxina con carga de -17 al mismo pH.

La concentración final de las metaloproteínas aisladas a partir de hojas de espinaca es de aproximadamente 5×10^{-5} M.

La caracterización y verificación de la pureza de las metaloproteínas se realizó por medio de espectroscopía UV-visible.

En el espectro de absorción de la PCu(II) aislada a partir de hojas de espinaca se observa un máximo de absorción de 597 nm ($\epsilon=4.9 \times 10^3$ M⁻¹cm⁻¹), con una relación de absorción de máximos $A_{278}/A_{597} = 1.69$.

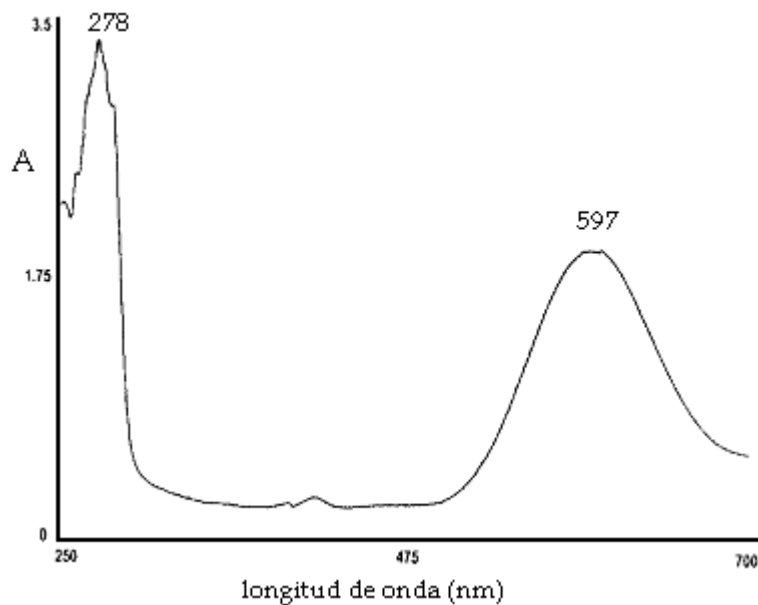


Fig. 5.1-2 Espectro electrónico de plastocianina de espinaca aislada a partir de hojas de espinaca.

La ferredoxina de espinaca se caracteriza de igual forma, y se observa una banda de absorción con un máximo en 277 nm ($\epsilon=14.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y una relación de absorción de máximos $A_{422}/A_{277} = 0.61$. De igual forma se determinaron las cantidades obtenidas de las metaloproteínas: 20 mg de Fd y 15 mg de PCu.

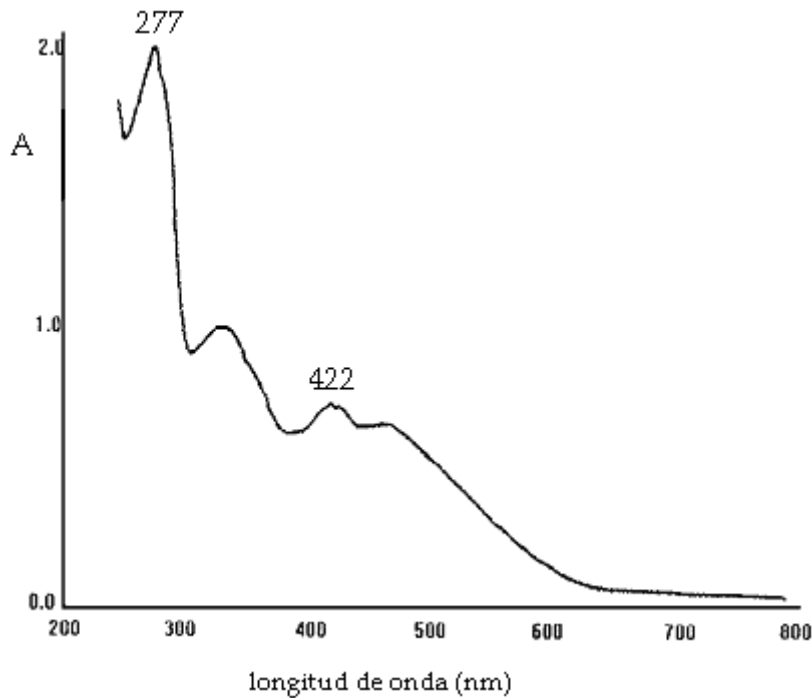


Fig. 5.1-3 Espectro electrónico de ferredoxina de espinaca aislada a partir de hojas de espinaca.

5.2 Caracterización por rpe.

Se corrieron las muestras de plastocianina en medio acuoso y DMSO/H₂O 25% v/v en el equipo de rpe en banda-X (9.5 GHz). Se obtuvo un espectro axial por cada condición experimental y se observó que la señal de rpe es sensible a los cambios alrededor del sitio de cobre.

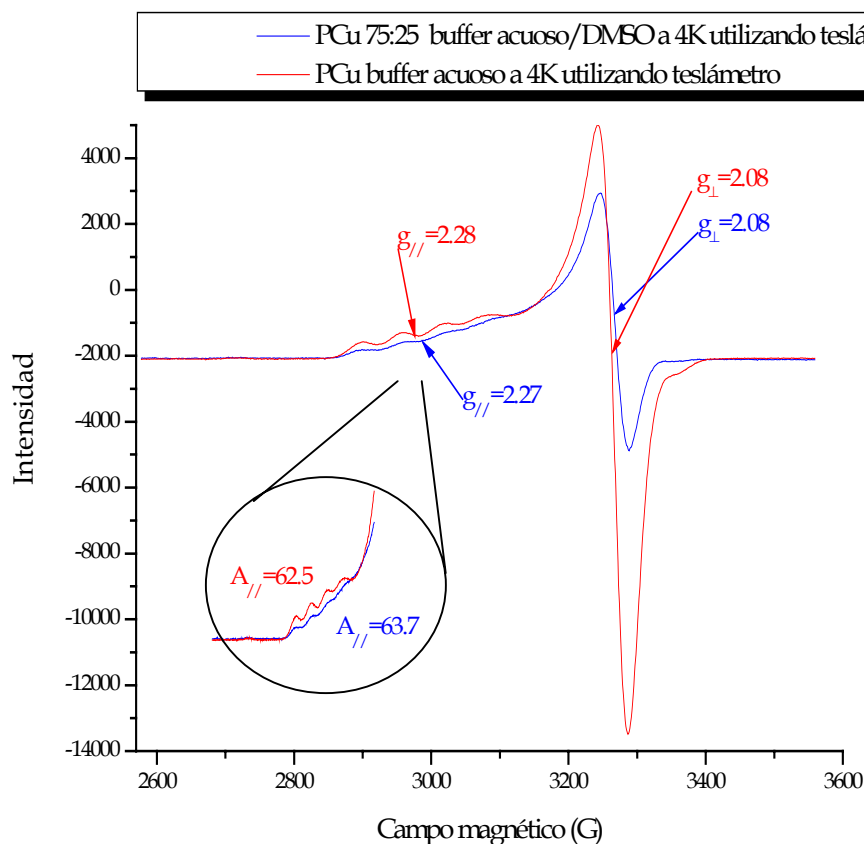


Fig. 5.2-1 Espectros axiales de resonancia paramagnética electrónica de banda-X de plastocianina de espinaca 300 mM en buffer acuoso Tris-HCl 75mM a 4 K y plastocianina de espinaca 300mM, 75:25 Tris-HCl 75mM/DMSO a 4 K utilizando teslámetro.

El átomo de cobre (d^9) posee un electrón desapareado con espín $s = j$, por lo que, teóricamente sólo veríamos una transición de m_{s+j} a m_{s-j} , que nos daría como resultado un pico en el espectro. La razón por la cual observamos además un desdoblamiento hiperfino, (cuatro señales menores), es debido a que el electrón desapareado interactúa con el núcleo de cobre (interacción espín electrónico-espín nuclear), el cual posee un espín nuclear de $I = 3/2$, de manera que el electrón puede encontrarse en cuatro estados degenerados ($2n I + 1$).

Los valores de g se obtienen por medio de la ecuación fundamental de rpe:

$$\Delta E = h\nu = g\mu_0 H_z$$

donde h es la constante de Plank, μ_0 es la constante de Bohr, H_z es el valor del campo al que corresponde la señal y ν es la frecuencia fija a la que se lleva a cabo el experimento.⁸

Los valores de g_{\perp} (≈ 2.08) resultaron ser los mismos para ambas condiciones, sin embargo, se observan cambios importantes en la intensidad de la señal principal, siendo más intensa la correspondiente a la muestra de PCu en buffer acuoso.

Otro cambio importante es la pérdida de definición en la estructura hiperfina al pasar de buffer acuoso a DMSO/H₂O 25% v/v, aunque los valores de g_{\parallel} (≈ 2.8) son iguales. El valor de la constante de acoplamiento A_{\parallel} es prácticamente igual en el medio con DMSO (≈ 63.7) que en el medio acuoso (≈ 62.5).

También se corrieron las muestras de ferredoxina en medio acuoso y DMSO/H₂O 25% v/v y se obtuvieron espectros anisotrópicos en banda-X.

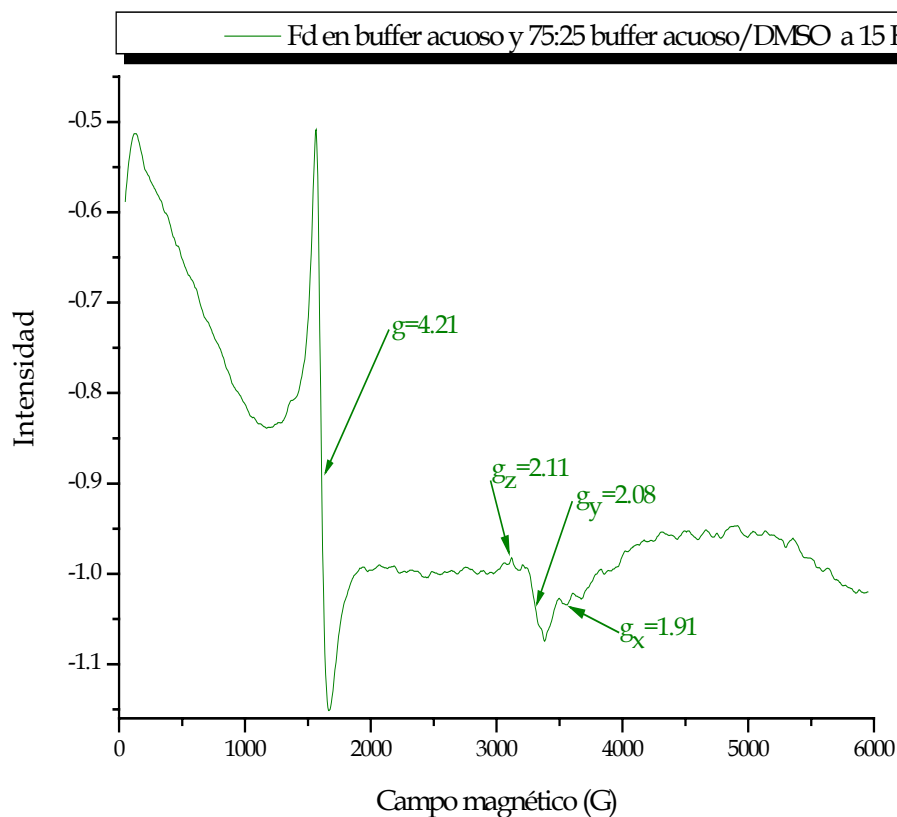


Fig. 5.2-2 Espectros de resonancia paramagnética electrónica de banda-X de ferredoxina de espinaca 400 mM en buffer acuoso Tris-HCl 75mM a 15 K y ferredoxina de espinaca 400mM, 75:25 Tris-HCl 75mM/DMSO a 15 K.

Al comparar los espectros de ferredoxina con o sin DMSO, no se registró ningún cambio, ya que los espectros resultaron ser superponibles.

La ferredoxina en el estado oxidado comprende 2 Fe(III) de alto espín no equivalentes; mientras que en su estado reducido se tiene un Fe(II) y un Fe(III), ambos de alto espín.

Observamos una señal intensa con $g = 4.21$, de la cual existe gran discrepancia en la literatura porque puede relacionarse con el estado oxidado de la Fd o como una

señal debida a una impureza, discutiendo que la forma oxidada de la Fd no se observa debido a la fuerte interacción que existe entre los dos iones magnéticos.^{11,28}

Al parecer la interacción antes mencionada se da a través de los azufres, por lo que existe un intercambio antiferromagnético entre los dos espines que se acoplan para dar un espin total de $\frac{1}{2}$ en el estado basal.



Entonces, la señal antes mencionada puede explicar las condiciones de trabajo que requiere la Fd, las cuales deben ser estrictamente anaerobias, pues la proteína se desnatura al contacto con O_2 al romperse los puentes disulfuro, así que esa impureza puede deberse a la proteína desnaturada.

Una señal aun más intensa se presenta al comienzo del barrido del campo magnético, la cual se determinó como ruido del equipo de rpe, ya que el experimento se repitió y pudo observarse la desaparición de la misma, sin embargo, este espectro no pudo reemplazar al presente debido a problemas presentados con el equipo.

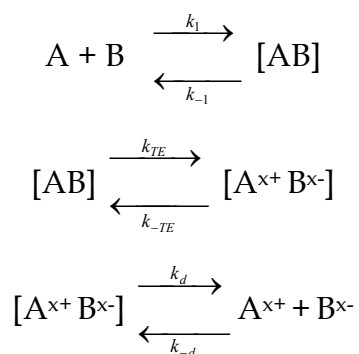
Un grupo de señales (g_z , g_y y g_x) correspondientes a la forma reducida de la proteína se pone de manifiesto. La literatura informa que para la Fd reducida se observa una señal centrada en $g = 1.94$ ^{11,24,29}, que corresponde a la que nosotros obtuvimos en $g = 2.08$. Las señales g_z , g_x y g_y muestran una distorsión de la cual no podemos asegurar que sea rómbica o axial por la falta de definición del espectro.

5.3 Transferencia electrónica en PCu.

Debido a la distancia, aproximadamente 10 \AA , a la que se encuentran embebidos los sitios activos dentro de las proteínas, la transferencia electrónica se da a larga distancia, por lo que la rapidez de transferencia electrónica es relativamente baja aunque se trata de sistemas biológicos.

Desde finales de los años 70 se han informado en la literatura numerosas investigaciones de reacciones entre pequeños agentes redox y proteínas, ya que el uso de los reactivos sintéticos de estructura y reactividad conocida en lugar de los donadores o aceptores naturales facilita la interpretación de los resultados.

El mecanismo que se aplica en los estudios de reacciones químicas redox homogéneas entre metaloproteínas y pequeñas moléculas inorgánicas en medios acuosos amortiguados se representa por el siguiente esquema:

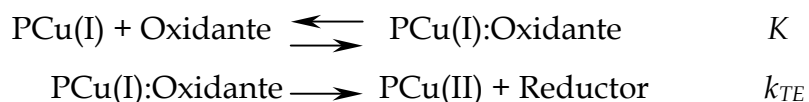


Se aprecia la formación del complejo precursor en una reacción en equilibrio (k_1) anterior a la transferencia electrónica, si la transferencia es el paso limitante se obtiene que $k_{\text{obs}} = k_1 k_{TE}$.

Los resultados cinéticos de las reacciones de transferencia electrónica entre metaloproteínas y complejos inorgánicos sugieren que las metaloproteínas poseen

la capacidad de proporcionar un mecanismo de transferencia electrónica sin importar que desde el punto de vista electrostático la interacción sea desfavorable, ya que se trata de interacciones entre especies altamente cargadas con carga neta del mismo signo. Por otro lado, se observa que utilizan diferentes sitios de asociación del complejo inorgánico para la transferencia electrónica dependiendo de su naturaleza.

En trabajos anteriores⁶ se llevaron a cabo estudios cinéticos de reacciones de transferencia electrónica en plastocianina de espinaca, para lo cual se propuso un mecanismo para las reacciones de transferencia de electrones entre la PCu y los oxidantes inorgánicos utilizados.



Derivándose de este mecanismo de reacción la ley de rapidez siguiente:

$$k_{obs} = \frac{k_{TE}K[\text{oxidante}]}{1 + K[\text{oxidante}]}$$

La forma lineal de esta ley de rapidez es:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_{TE}} + \frac{1}{k_{TE}K[\text{oxidante}]}$$

Por lo que una gráfica de $(k_{obs})^{-1}$ contra $[\text{oxidante}]^{-1}$ nos da una línea recta de pendiente $1/k_{TE}K$ y ordenada al origen $1/k_{TE}$.

Los compuestos de coordinación que se han utilizado como reactivos redox en las reacciones con PCu son en su gran mayoría compuestos inertes a la sustitución.

Entre los compuestos utilizados hasta el momento se encuentran $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]^{3-}$, $[\text{Co}(\text{dipic})_2]^-$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{CH}_3\text{CN})]^{3+}$ y $[(\text{NC})_5\text{FeCNC}(\text{CN})_5]^{5-}$.

Así, evaluando la influencia del medio de reacción en la transferencia electrónica entre la PCu(I) de espinaca y el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$, (ampliamente estudiada)^{29,30}, en primer lugar en medio acuoso (Tris/HCl pH=8.0, $\mu=0.03\text{M}$ (NaCl) y 25°C) y, en segundo en una disolución DMSO/H₂O (25%) (Tris/HCl, pH= 8.0, $\mu=0.03\text{M}$ (NaCl)), se observó una cinética limitante.

Al trazar $(k_{\text{obs}})^{-1}$ en función de $[\text{oxidante}]^{-1}$ se observó un comportamiento lineal. Si se cumple la condición de que $K[\text{oxidante}] \ll 1$, la ley de rapidez se reduce a $k_{\text{obs}} = k_{\text{TE}}K[\text{oxidante}]$, por lo tanto, existe una dependencia de primer orden de la k_{obs} con la concentración del oxidante. Esta condición se cumple cuando K es muy pequeña, es decir, cuando la asociación del oxidante con la proteína es muy débil o cuando la concentración del oxidante es muy pequeña. La ley de rapidez se reduce a una cinética de segundo orden donde $d[\text{PCu(I)}]/dt = k[\text{PCu(I)}][\text{oxidante}]$.

De los resultados arrojados se observa que el medio de reacción afecta de manera muy marcada la rapidez de reacción aunque el mecanismo no varía y en ambos casos se observa una cinética limitante.

Al comparar los resultados obtenidos en medio acuoso con respecto a la mezcla DMSO/H₂O (25%) bajo las mismas condiciones de pH, sustancia amortiguadora, temperatura y fuerza iónica, los valores de $K=692.9 \text{ M}^{-1}$ y $k_{\text{TE}}=7.39 \text{ s}^{-1}$ para el medio acuoso y de $K=171.8 \pm 62.5 \text{ M}^{-1}$ y $k_{\text{TE}}=88.028 \pm 35 \text{ s}^{-1}$ para la mezcla DMSO/H₂O son notablemente diferentes. Es notable también una disminución considerable del valor de la constante de asociación K en la mezcla DMSO/H₂O en un 75% con respecto al medio acuoso; es decir, que a bajas concentraciones del oxidante ya no

se observa una cinética limitante. La presencia de DMSO cambia la constante dieléctrica del medio y dado que el aducto se estabiliza mediante interacciones electrostáticas es de esperarse un cambio importante en la constante de asociación.

En cuanto al valor de la k_{TE} en la mezcla DMSO/H₂O, ésta es 12 veces mayor que aquélla medida en medio acuoso, por lo que la transferencia electrónica intra-aducto es 12 veces más rápida en presencia de DMSO. Conociendo que la transferencia electrónica es el paso limitante de la reacción, se observa que la presencia de DMSO acelera la rapidez de reacción. Lo antes mencionado deja ver que existe la posibilidad de que el sitio de unión del oxidante sea diferente dependiendo del medio de reacción utilizado.

Esta aceleración puede deberse a que el disolvente (mezcla DMSO/H₂O(25%)) entra a la proteína provocando cambios en la estructura interna o a una interacción externa sin provocar cambio alguno.

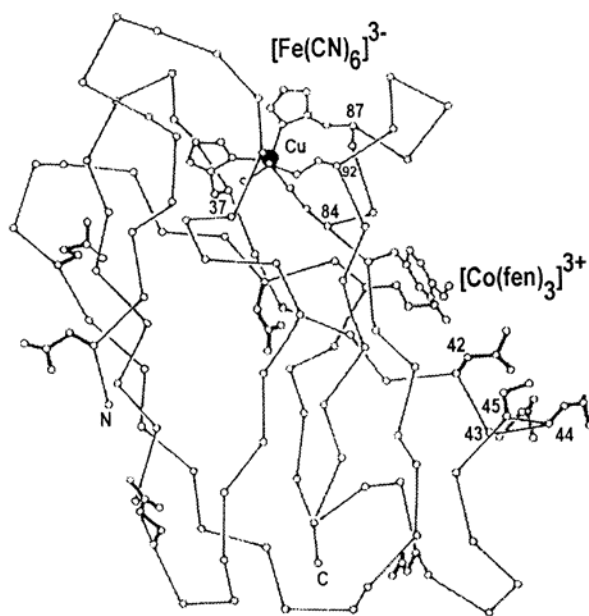


Fig. 5.3-1 Estructura de la plastocianina informada por Freeman¹⁸ con los sitios de unión indicados para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$.

La literatura informa que en el caso de la plastocianina se presentan dos sitios de unión de los oxidantes o reductores de la proteína. En el caso de oxidantes con carga positiva como $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$, el sitio preferido es el lado este cercano a la Tyr83, Phe82, Phe14 y Phe41, donde existen dos regiones de aminoácidos ácidos (Asp42, Glu43, Asp44, Glu45, Ile46 y Glu59, Glu60, Asp61), los cuales a pH 7.0 están desprotonados favoreciéndose la interacción electrostática. Este sitio se conoce como el sitio hidrofílico donde la transferencia electrónica es de largo alcance (≈ 12 Å) siguiendo la ruta probable Tyr83-Cys84-Cu. Por otro lado, el sitio conocido como hidrofóbico se encuentra justamente sobre el sitio activo de cobre de la proteína cerca de la His87, unida directamente al Cu. Este sitio comprende entre otros, los aminoácidos alifáticos Gly10, Leu12, Gly89 y Ala90. El sitio hidrofóbico es el preferido en el caso de oxidantes como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ donde la transferencia de electrones ocurre a menor distancia (≈ 6 Å), por lo que la reacción en este sitio se realiza a mayor velocidad con respecto al sitio hidrofílico. La propuesta de que diferentes sitios de unión a la PCu se utilizan por los oxidantes dependiendo de la carga de éstos, ha quedado establecida por medio de estudios de espectroscopía de $\text{rmn } ^1\text{H}$ de alta resolución. Se investigó el efecto de los compuestos inactivos redox $[\text{Cr}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ y $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en el espectro de rmn de PCu(I)^{30, 31} y los experimentos han dado evidencia de que la asociación del compuesto $[\text{Cr}(\text{CN})_6]^{3-}$ ocurre cerca de la His87 no observándose efectos en los residuos aromáticos a excepción del protón δ de la His87, mientras que $[\text{Cr}(\text{fen})_3]^{3+}$ y $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ se unen cerca de la Tyr83, afectándose de manera apreciable la región correspondiente a los residuos aromáticos.³²

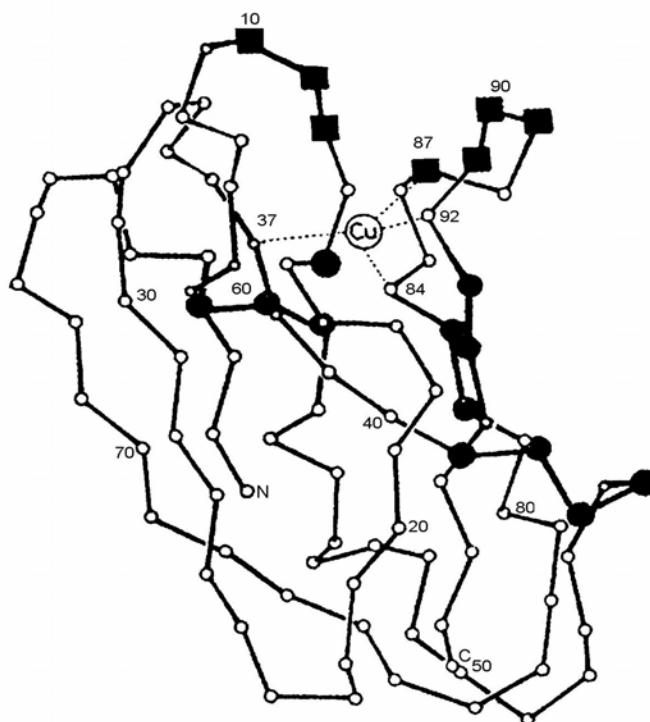


Fig. 5.3-2 Estructura de la PCu que muestra los sitios preferentes de unión. El sitio norte donde los residuos hidrofóbicos se muestran en ■ y el sitio este donde los residuos aromáticos y aniónicos se muestran en •.

Como se mencionó anteriormente en compuesto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ tiene su sitio de unión en el lado norte de la proteína cerca de la His-87, mientras que el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ presenta su sitio de unión preferente en el lado este cerca de la Tyr-83. Esto se ha comprobado por medio de experimentos de inhibición competitiva, rnm, utilizando los compuestos análogos de cromo(III), dependencia de la reactividad con el pH y en los últimos años experimentos de modificación de la PCu en la Tyr-83³³, así como reacciones de transferencia electrónica en mutantes de PCu para evidenciar el sitio de unión de diferentes oxidantes.^{34, 35} Para $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ $k_{\text{TEK}}=3.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ mientras que para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $k_{\text{TEK}}= 9.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cuando la reacción ocurre en el lado norte se lleva a cabo más rápidamente debido a que ocurre a través de una distancia más corta, aproximadamente 6 Å. Los estudios de inhibición de la reacción de oxidación con iones ferrocenio FeCp_2^+ muestran un

mecanismo donde el oxidante se reparte entre los dos sitios de unión, el sitio hidrofóbico en el lado norte y el sitio hidrofílico en el lado este.³⁶ La partición entre los dos sitios depende de la carga y del carácter hidrofóbico del oxidante, por ejemplo: para el compuesto $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{3+}$ el 75% de la reacción ocurre en el lado este, mientras que para el ion FeCp_2^+ únicamente el 28% ocurre en el lado este.³⁷

Ahora bien, otros estudios de rmn protónica para observar la influencia del medio de reacción en la PCu(I) fueron realizados, para lo cual se obtuvo un espectro en presencia de 25% de DMSO- d_6 , y se observa que los residuos alifáticos más afectados, al presentar cambio en el desplazamiento y/o la forma de señal, son Leu63, Val93, Met92, Gly34 y Gly49, los cuales, a excepción de Gly49, se localizan cerca o en el sitio hidrofóbico.

En la región de los protones aromáticos (7.3 a 6.9 ppm) se observó un cambio más radical en el espectro que corresponden a los residuos aromáticos (Phe35, Phe41, Phe14, Phe29, Phe19, Tyr70, Phe82 y His87).

Debido a que las señales correspondientes a varios residuos aminoácidos superficiales de la proteína se desplazan en presencia de DMSO se demuestra que las interacciones electrostáticas varían con respecto al medio acuoso.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo acerca de rpe y a lo informado en la literatura, se propone que la transferencia electrónica se ve favorecida por el medio DMSO/ H_2O (25%), debido a que éste permite que la transferencia ocurra a través de los aminoácidos superficiales, descartando así, que el disolvente pueda entrar y provocar cambios en la estructura interna de la plastocianina.

5.4 Transferencia electrónica en Fd.

Se ha propuesto el mismo mecanismo de cinética limitante^{1, 22} para las reacciones de transferencia electrónica en Fd de espinaca con oxidantes inorgánicos catiónicos. Así la ley de rapidez queda expresada como:

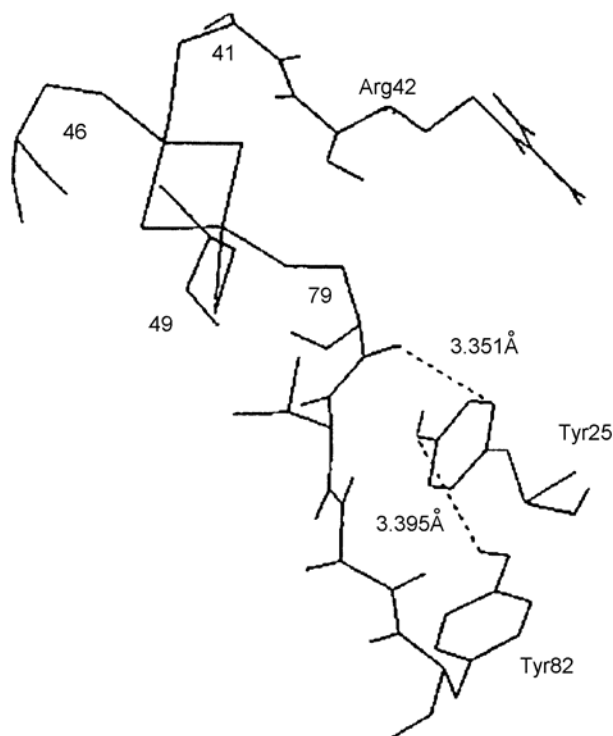
$$k_{obs} = \frac{k_{TE} K[\text{oxidante}]}{1 + K[\text{oxidante}]}$$

Anteriormente se llevaron a cabo estudios cinéticos de transferencia de electrones utilizando como medios de reacción DMSO/H₂O (25%), (fijando el pH en 8.0 por medio de una disolución amortiguadora Tris/HCl y μ 0.03M (NaCl) a 25°C) y medio acuoso (Tris/HCl, pH 8.0, μ 0.03M (NaCl) a 25°C). Este estudio se realizó para la reacción de transferencia electrónica entre la Fd reducida de espinaca ([Fe₂S₂)⁺) y el compuesto [Co(en)₃)³⁺.³² Al comparar los resultados obtenidos en medio acuoso con respecto a DMSO/H₂O (25%) bajo las mismas condiciones de pH, sustancia amortiguadora, temperatura y fuerza iónica, se encuentra que los valores de $K=1483 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE}=1.9 \text{ s}^{-1}$ para el medio acuoso y de $K=1069 \pm 117 \text{ M}^{-1}$ y $k_{TE}=21 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ para la mezcla DMSO/H₂O son notablemente diferentes. Se ve una disminución del valor de la constante de asociación K en la mezcla DMSO/H₂O de un 28% con respecto al medio acuoso; sin embargo, el cambio no es tan considerable como en el caso de la PCu. La presencia de DMSO cambia la constante dieléctrica del medio y dado que el aducto se estabiliza mediante interacciones electrostáticas es de esperarse un cambio en la constante de asociación. En cuanto al valor de la k_{TE} , ésta es 11 veces mayor en la mezcla DMSO/H₂O. Conociendo que la transferencia electrónica es el paso limitante de la reacción se aprecia que la presencia de DMSO acelera la reacción al igual que lo observado para la PCu.

En el caso de la Fd, no se tiene evidencia hasta ahora de otro(s) sitio(s) de unión de los oxidantes a la proteína, sin importar su naturaleza catiónica, neutrónica o aniónica,²³ por lo que la aceleración de la reacción no puede explicarse debido a un cambio de sitio de unión al cambiar el medio como en el caso de PCu.

Como se observa en rpe, los espectros que se realizaron bajo los dos medios son superponibles, así que tampoco se cree que el disolvente, en el caso de la mezcla DMSO/H₂O (25%), pueda causar modificaciones en la estructura interna de la proteína; de manera que se propone que la transferencia electrónica se lleva a cabo a través de los residuos aminoácidos superficiales hasta el centro activo, es decir, la aceleración en la presencia de DMSO ocurre al favorecerse una transferencia electrónica intramolecular.

Una de las rutas más probables³⁸ es la que se muestra a continuación:



Para que la transferencia electrónica ocurra se supone en primer lugar que la Tyr82 y la Tyr25 se encuentran lo suficientemente cercanas para que se de el proceso.

Posteriormente, el electrón se transfiere por medio de enlaces de hidrógeno y saltos a través del espacio en una distancia de 3.49 Å del anillo aromático de la Tyr25 al grupo carbonilo de la Cys79 unida al centro metálico, en seguida se da una transferencia a través de 4 enlaces a una distancia de 9.35 Å para llegar al azufre de la Cys79. Por último, ocurre una transferencia electrónica rápida por medio de un átomo de Fe al otro.

6. Conclusiones

La obtención de plastocianina por medio de sobreexpresión en *Escherichia coli* se aventaja sobre el aislamiento de plastocianina a partir de hojas de espinaca, ya que el primero permitió obtener PCu con mayor grado de pureza, como lo deja ver la relación de máximos de absorción A_{278}/A_{597} , cuya relación es igual a 1.15 y para el segundo procedimiento es igual a 1.69.

El aislamiento modificado de los métodos informados por Borchert en 1970²⁶ y Morand en 1993²⁷ nos permitió obtener PCu y Fd al mismo tiempo. Se obtuvieron 15 mg de PCu y 20 mg de Fd.

La ingeniería genética es una herramienta muy útil para llevar a cabo estudios donde la pureza es un factor limitante, como lo es el caso para rpe, además de que reduce costos por materias primas utilizadas.

La presencia del medio de reacción DMSO favorece notablemente la transferencia electrónica intramolecular como lo indican las constantes de rapidez de transferencia electrónica, sin embargo, no se aprecian cambios significativos en los espectros de rpe en PCu y Fd debidos al medio DMSO/H₂O 25% v/v, por lo que se propone que dicho medio no penetra modificando la estructura interna de las proteínas y la transferencia electrónica se lleva a cabo por interacción con los

aminoácidos superficiales siguiendo una ruta específica hacia los átomos metálicos, y entonces el medio DMSO favorece las interacciones electrostáticas

Se propone llevar a cabo experimentos a diferente temperatura para tratar de entender el comportamiento observado de sensibilidad del espectro de ferredoxina a baja temperatura (5 K), pues se satura a baja temperatura.

Deben concluirse los estudios de $\text{rmn-}^1\text{H}$ para observar si hay cambios externos en las metaloproteínas e incluso tratar de proponer rutas de transferencia electrónica.

Glosario

ADP	adenosinadifosfato
ADN	ácido desoxiribonucleico
Ala	alanina
ARN	ácido ribonucleico
Asp	asparagina
ATP	adenosinatrifosfato
<i>b_{6f}</i>	complejo <i>b_{6f}</i>
Cys	cisteina
DE32	dietilaminoetil celulosa 32
DE52	dietilaminoetil celulosa 52
DMSO	dimetilsulfóxido
E°	potencial normal
EDTA	ácido etilendiaminatetracético
Fd	ferredoxina

FNR	ferredoxina-NADP reductasa
FSI	fotosistema I (PSI)
FSII	fotosistema II (PSII)
Glu	glutamina
Gly	glicina
His	histidina
Ile	isoleucina
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosida
K	constante de equilibrio de la formación del precursor
k_1	constante de rapidez de la reacción de formación
k_d	constante de rapidez de la reacción de disociación
k_{obs}	constante de rapidez observada
k_{TE}	constante de rapidez de la reacción de transferencia electrónica
k_{-TE}	constante de rapidez inversa de la reacción de transferencia electrónica

<i>lacZ</i>	gen <i>lacZ</i> (<i>lacZ</i> α)
LB	medio Luria-Bertani
Leu	leucina
Met	metionina
NADP	Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato
NADPH	Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato + H
P _i	fosfato inorgánico
pb	pares de bases
<i>pBR322</i>	plásmido <i>pBR322</i>
P680	pigmento 680
P700	pigmento 700
PCu	plastocianina
Phe	fenilalanina
pI	punto isoeléctrico
PQH ₂	plastoquinina

<i>pUC18</i>	plásmido <i>pUC18</i>
<i>pUC19</i>	plásmido <i>pUC19</i>
rmn	resonancia magnética nuclear
rpe	resonancia paramagnética electrónica
tris	tris(hidroximetil)aminometano
Tyr	tirosina
Val	valina
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosida

7. Referencias Bibliográficas

1. Bond, A. M., *Inorg. Chim. Acta*, 226, (1994), 293.
2. Marcus, R. A., Sutin, N., *Biochim. Biophys. Acta*, 811, (1985), 265.
3. Lippin, A. G. "Metal Ions in Biological Systems", ed. H. Sigel, M. Dekker, 13 (1981), 15-71.
4. Cenicerós-Gómez, A. E.; King-Díaz, B.; Barba-Behrens, N.; Lotina-Henssen, B.; Castillo-Blum, S. E., *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999), 3075.
5. King-Díaz, B.; Barba-Behrens, N.; Montes-Ayala, J.; Castillo-Blum, S. E.; Escatín-Guzmán, C.; Iglesias-Prieto, R.; Lotina-Henssen, B. Z., *Naturforsch*, 53C, (1998), 987.
6. Cenicerós Gómez Águeda Elena, "Estudio de la Transferencia Electrónica entre Metaloproteínas y Compuestos de Coordinación de Derivados Bencimidazólicos", UNAM, México, 2001, p.156.
7. <http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM252/document/genemol/biomolespa/plasmidos/plasmidos-1.html>
8. Bersohn, M.; Baird, J. C., "An Introduction to Electron Paramagnetic Resonance", ed. W.A. Benjamin, Inc., 1966, p. 271.
9. Casas, S. J.; Moreno, V.; Sánchez, A.; Sánchez, J. L.; Sordo, J., "Química Bioinorgánica", ed. Síntesis, España, 2002, p. 345.

10. Pilbrow, J. R.; "Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance", Oxford: Clarendon, 1990, p. 717.
11. Gibson, J. F.; Hall, D. O.; Thornley, J. H. M.; Whatley, F. R., *Biochem. : Gibson et al., Proc. N.A.S.*, 56, (1966), 987-990.
12. Fritz, J.; Anderson, R.; Fee, J.; Palmer, G.; Sands, R. H.; Tsibris, J. C. M.; Gunsalus, I. C.; Orme-Johnson, W. H.; Beinert, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 253, (1971), 110.
13. Freeman H. C.; Guss, J. M.; "Handbook of Metalloproteins", Ed. Alden, Sidney (2000), pp.1-18.
14. Andres, L. J., "Herbicides: Physiology, Biochemistry and Ecology", London Academia, 1976, Vol.1, p. 493-523.
15. Haehnel, W.; *Enciclopedia of Plant Physiology*, 19, (1986), 547-559, Springer, Berlin.
16. Christensen, E. M. H.; Conrad S. L.; Ulstrup J., *Photosynth. Res.* 25, (1990), 73-76.
17. Sigfrisson, K.; Hansson, O; Göran Karlsson, B.; Baltzer, L.; Nordling, M.; G. Lundberg, L., *Biochim. Biophys. Acta* 1228, (1995), 28-36.
18. Colman, P. M.; Freeman, H. C.; Guss, J. M.; Murata, M.; Norris, V. M.; Ramshaw, J. A. M.; Venkatappa, M. P., *Nature*, 272, (1978), 319.

19. Niles, M. D. D.; Freeman, H. C.; Harvey, I.; Lay, P.A.; Bond, A. M., *Inorg. Chem.*, 35, (1996), 7556-7165.

20. Sykes, A. G., *Chem. Soc. Rev.*, (1985), 283.

21. Rush, J. D.; Levine, F.; Koppenol, W. H., *Biochem.*, 27, (1988), 5876.

22. Armstrong, F; "Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms", ed. A.G. Sykes., 1, (1982), 65.

23. Adzamli, I. K.; Petrou, A.; Sykes, A. G.; Rao, K. K.; Hall, D. O., *Biochem. J.*, 211, (1983), 219.

24. Aliverti, A.; Hagen R. W., Zanetti G., *FEBS Lett.*, 368, (1995), 220-224.

25. Nordling, M.; Olausson, T.; Lundberg, L. G., *FEBS Lett.*, 276, (1990), 98-102.

26. Borchert, M.T., Wessels, J.S.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 197, (1970), 78-83.

27. Zee, M. L.; Krogmann, W., *Biochim. Biophys. Acta*, 1141, (1993), 105-106.

28. Hall, D. O.; Gibson, J. F.; Whatley, J. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, (1966), 81-84.

29. Ohmori, D.; Hasumi, H.; Yamakura, F.; Murakami, M.; Fujisawa, K.; Taneoka, Y.; Yamamura, T., *Biochim. Biophys. Acta*, 996, (1989), 166-172.

30. Segal, M. G.; Sykes, A. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 100, (1978), 4585.

31. Holwerda, R. A. ; Knaff, D. B.; Gray, H. B.: Clemmer, J. D.; Crowley, R.: Smith, J. M.; Mauk, A. G.; J. Am. Chem. Soc., 102, (1980), 1142.
32. Armstrong, F. A.; Driscoll, P. C.; Hill, H. A. O.; Redfield, C., J. Inorg. Biochem., 28, (1986), 171.
33. Christensen, E. M. H.; Conrad S. L.; Ulstrup J., J. Bioch. Biophys. Acta, 1099, (1992), 35.
34. He, S.; Modi, S.; Bendall, D. S.; Gray, J. C., EMBO J., 10, (1991), 4011.
35. Kyritsis, P.; Dennison, C.; McFarlane, W.; Nordling, M.; Vänngård, T.; Young, S.; Sykes, A. G., J. Chem. Soc. Dalton Trans, (1993), 2289.
36. Pladziewicz, J. R.; Brenner, M. S.; Inorg. Chem., 26, (1987), 3629.
37. McGinnis, J.; Sinclair-Day, J- D.; Sykes, A. G., J. Chem. Soc. Dalton Trans., (1986), 2007.
38. Lloyd, E.; Tomkinson, N. P.; Sykes, A. G., J. Chem. Soc. Dalton Trans., 753, (1992).
39. Driscoll, P. C.; Hill, H. A. O.; Redfield, C.; Eur. J. Biochem., 170, (1987), 279-292.
40. Dunham, W. R.; Bearden, A.; Salmeen, I. T.; Palmer, G.; Sands; R. H.; Orme-Johnson, W. H.; Beinert, H., Biochim. Biophys. Acta, 253, (1971), 134.