

Nº 15  
2EJ.



*Universidad Nacional  
Autónoma de México*

Facultad de Química

"EFECTO DE DOS LACTONAS SESQUITERPENICAS; IVALINA  
Y ZALUZANINA C, SOBRE LA FOTOSINTESIS"

T E S I S

Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

**ERNESTO BERNAL MORALES**



México, D. F.

1992

**FALLA DE ORIGEN**



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

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

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

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

## Indice

1.0.- Indice .....	1
2.0.- Apéndice.....	2
3.0.- Introducción.....	3
4.0.- Antecedentes.....	4
4.1. Fotosíntesis.....	4
4.1.1. Estructura del sistema Fotosintético.....	4
4.1.2. Elementos de la Fotosíntesis.....	8
4.1.3. Reacciones luminosas.....	15
4.1.4. Reacciones Oscuras.....	31
4.2. Lactonas Sesquiterpénicas.....	37
4.2.1. Actividades Biológicas.....	39
4.2.2. Aislamiento.....	49
5.0.- Objetivos.....	50
6.0.- Materiales y Métodos.....	51
6.1. Aislamiento de Cloroplastos.....	51
6.2. Determinación de Clorofila.....	52
6.3. Preparación de compuestos.....	53
6.4. Bomba de Protones y Síntesis de ATP.....	54
6.5. Transporte de electrones.....	57
6.6. Reacciones Parciales de la Cadena de Hill.....	62
7.0.- Resultados.....	68
8.0.- Discusión.....	74
9.0.- Bibliografía.....	87

## Apèndice

Citbs/f.... Citocromo bs/f.  
DAD..... 2,3,4,5-Tetrametil p-fenilendiamina.  
DBMIB..... 2,5-Dibromo 3-Metil 6-isopropil p-benzoquinona.  
DCMU..... 3-(3,4-diclorofenil ) 1,1-Dimetilurea.  
DCPIP..... 2,6-Diclorofenolindofenol.  
DPC..... 1,5-Difenilcarbazida.  
MV..... Metilviológeno.  
PD..... Plastoquinona.  
RC..... Centros de Reacción.

## Introducción

La ivalina y la zaluzanina C son miembros de las lactonas sesquiterpénicas; las cuales se obtienen de plantas de la familia *Compositae*, la cual es muy común en México.

Este tipo de compuestos tiene numerosos efectos entre los cuales se encuentra el de alelopatía, es decir son capaces de regular un ecosistema determinado debido a su efecto negativo sobre determinadas especies de plantas.

En este trabajo se busca conocer el efecto de los compuestos ensayados sobre la fotosíntesis, ya que la mayoría de los compuestos que afectan a las plantas tienen como blanco principal el transporte de electrones fotosintético y otros procesos relacionados con él.

Este efecto puede ser: bloqueo del transporte de electrones, desacoplamiento de la síntesis de ATP o inhibición de la transferencia de energía.

Para ello se midió el efecto de diferentes concentraciones de los compuestos en la bomba de protones, síntesis de ATP y transporte de electrones. Además se determinaron las reacciones parciales de la reacción de Hill para conocer el sitio de inhibición en la cadena de transporte de electrones.

De los resultados de estos experimentos se puede conocer el sitio y mecanismo de acción de estos compuestos. Los cuales pueden tener una aplicación como herbicidas.

## ANTECEDENTES

### FOTOSINTESIS

#### Estructura del sistema fotosintético .

La fotosíntesis se realiza en dos etapas. La primera es la fase luminosa donde ocurre la captación de la energía luminosa por los pigmentos que absorben la luz convirtiéndola en energía química. En la segunda fase los productos ricos en energía obtenidos en la primera fase son utilizados para fijar  $\text{CO}_2$  para dar carbohidratos.

La reacción química global de la fotosíntesis se puede expresar como:  $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{LUZ} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ .

En esta reacción se puede observar que se ha reducido el  $\text{CO}_2$  para formar carbohidratos y que los productos tienen más energía que los reactivos por lo cual se puede decir que en la fotosíntesis se utiliza la energía luminosa para obtener poder reductor y compuestos con mayor cantidad de energía ( 1 ).

En la reacción de la fotosíntesis se puede sustituir el aceptor y donador de electrones por otros aceptores y donadores por lo cual la reacción queda  $\text{A} + \text{H}_2\text{D} + \text{LUZ} = \text{D} + \text{H}_2\text{A}$ . A esta reacción se le conoce como reacción de Hill.

En los últimos años se ha descubierto la importancia de los factores estructurales en el desarrollo de la fotosíntesis. Uno de los factores de mayor importancia es la presencia de un sistema de membranas que permiten la formación de los gradientes electroquímicos necesarios para la formación de intermediarios de alta energía y la compartimentalización de los distintos componentes de tal forma que exista una relación adecuada entre todos los componentes necesarios para la fotosíntesis.

Este sistema de membranas internas se le conoce con el nombre de tilacoides los cuales se caracterizan por tener un radio superficie-volumen muy alto. En los tilacoides se encuentran los componentes necesarios para los primeros eventos de la fotosíntesis ( 2 ).

En las plantas superiores este sistema de membranas internas se encuentra rodeado por una doble membrana formando un organelo celular: el cloroplasto.

La mayoría de los cloroplastos de las plantas superiores tienen forma de lentes circulares o elongados con un diámetro máximo de 3-10 $\mu$ m. Una célula de espinaca típica contiene entre 20-60 cloroplastos cada uno de los cuales tiene un volumen de 34 $\mu$ m<sup>3</sup> (fig.1).

Estudios con cloroplastos intactos han demostrado que la membrana interna regula el transporte de metabolitos a través de ella mientras que la membrana externa es altamente permeable a la mayoría de las sustancias de bajo peso molecular; estas dos envolturas están separadas por un espacio de 10-20 $\mu$ m aunque se encuentran unidas en ciertos puntos. La envoltura interna se caracteriza por tener mayor cantidad de proteínas lo cual coincide con el gran número de actividades enzimáticas y de transporte asociadas a ella. Las dos membranas de la envoltura en las plantas *C<sub>3</sub>* son lisas. En contraste se pueden ver invaginaciones en proplastidios durante el enverdecimiento de etioplastos y durante el desarrollo de cloroplastos; estas invaginaciones tienen la finalidad de proporcionar espacio para las enzimas y otros materiales necesarios para el desarrollo del cloroplasto.

La matriz del cloroplasto llamada también estroma abarca todas las estructuras y moléculas comprendidas entre la membrana interna de la envoltura y los tilacoides, la mayoría de los cuales son hidrosolubles. En el estroma del cloroplasto se encuentran: las enzimas del ciclo de Calvin, los elementos necesarios para la síntesis proteica como DNA, RNA, ribosomas, etc., gránulos de almidón y los plastoglobuli: los cuales están formados por lípidos y sirven como almacén de ciertos lípidos membranales que se acumulan durante la degradación de membranas viejas o en la obscuridad (3).

Todos los sistemas de membranas del cloroplasto están estructurados de acuerdo al modelo del mosaico fluido común a las membranas biológicas, pero a diferencia de otras membranas la de los tilacoides está formada principalmente por lípidos polares no cargados siendo los principales el monogalactosildiacilglicerol y el digalactosildiacilglicerol; su función es empacar grandes complejos de proteínas en las membranas biológicas además de estabilizar regiones curvas de las membranas debido a la estructura cónica que poseen y volver a la membrana del tilacoide más fluida. Por lo cual estos lípidos son importantes en el funcionamiento de los complejos de proteínas, otros lípidos que se encuentran también en las membranas de los tilacoides son el fosfatidilglicerol, sulfoquinovosilglicerol, fosfatidilcolina, etc. (4, 5).

Los tilacoides están arreglados en una red continua de membranas simples no apesadas, interconectadas con membranas apesadas de los grana. Solo la superficie externa de las regiones no apesadas está en contacto directo con el estroma del cloroplasto donde ocurre la fijación del CO<sub>2</sub>, mientras que la



superficie interna del tilacoide encierra el espacio luminal, el cual es un espacio continuo entre todas las regiones apesadas y no apesadas ( 6 ).

Paolillo y Falk propusieron que múltiples planos de membranas no apiladas son arregladas helicoidalmente alrededor de la superficie de un núcleo cilíndrico de membranas apiladas. Estas membranas helicoidalmente arregladas forman uniones con los discos individuales de los grana por lo cual el lumen de las dos membranas es continuo. Esta asociación es tal que cada disco esta conectado a un número de membranas helicoidalmente arregladas y cada una de estas membranas esta conectada a varios discos del grana.

Esta diferenciación estructural en la mayoría de las plantas superiores de regiones apesadas y no apesadas es paralelo a una diferenciación funcional.

Se ha encontrado una relación entre el radio de regiones apiladas y no apiladas y distintos factores ambientales, por ejemplo se ha encontrado una relación inversa entre los tilacoides apilados y la intensidad de la luz, ciertos herbicidas producen un efecto semejante.

En los tilacoides se encuentran los elementos necesarios para captar la luz y transformarla en energía química. Estos elementos se encuentran estructurados en 4 complejos proteínicos: 1.- complejos captadores de luz, (LHC) 2.- Dos fotosistemas con sus centros de reacción (FS) 3.- un sistema para sintetizar ATP (CF<sub>1</sub>-CF<sub>0</sub>) 4.- Citocromos ;estos complejos interactúan entre sí gracias a una membrana muy fluida en donde pueden moverse moléculas como la plastoquinona, plastocianina, etc. Estos

complejos no están uniformemente distribuidos en las membranas de los tilacoides; esto se debe a que los complejos captadores de luz (LHC) pueden transferir su energía a cualquiera de los dos fotosistemas existentes lo cual no es deseable y por ello los fotosistemas están separados uno del otro y solo interactúan de la manera antes descrita ( 3 ).

La  $H^+$ -ATPase y el PSI se encuentran localizados en las regiones no apresadas donde se encuentran el ADP,  $NAD^+$  con el cual interactúan, en cambio el PSII que interactúa con una molécula pequeña como el agua se encuentra en las regiones apresadas, el complejo citocromo  $b_6/f$  se distribuye uniformemente en ambas regiones (fig.2).

De lo anterior se deduce que los cambios en los radios entre los tilacoides apresados y no apresados es una manera de cambiar la relación estequiométrica entre los PSI y PSII ( 6 ).

Se ha sugerido que el apilamiento de los cloroplastos es mediado por el complejo captador de luz del fotosistema II. Se piensa que algunas interacciones entre este complejo con algunas sales inorgánicas es el responsable de este proceso, esto se ha comprobado porque si los tilacoides son lavados en un medio bajo en sales se pierden los tilacoides apilados y una readición posterior de cationes invierte el proceso ( 1 , 5 , 7 ).

### **Elementos de la fotosíntesis**

#### **Pigmentos fotosintéticos**

Cualquier clase de pigmentos por definición absorben luz en la región del visible esto se debe a que tienen un sistema de dobles enlaces conjugados.

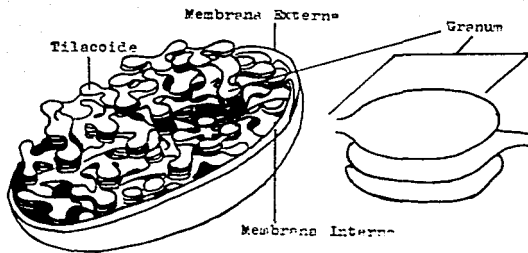


fig. 1 Diagrama de un Cloroplasto

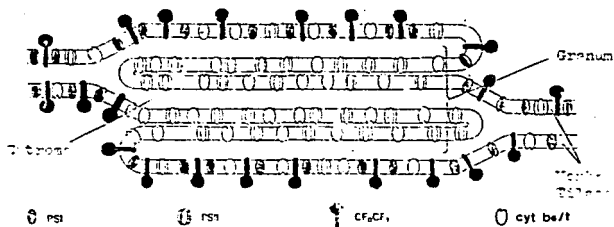


fig. 2 Modelo de la organización supramolecular de las membranas de los tilacoides. PSI ( Fotosistema I ), PSII ( Fotosistema II ), CFoCF1 ( H<sup>+</sup>-ATPasa ), Cyt b<sub>6</sub>/f (Citocromo b<sub>6</sub>/f).

El principal pigmento fotosintético es la clorofila. En esta molécula el sistema de enlaces conjugados se encuentra en el anillo porfirínico, el cual está formado por cuatro pirroles cíclicos unidos entre sí y que se encuentran conjugados con  $Mg^{2+}$ . A este anillo se encuentra unido un alcohol isoprenoide de cadena muy larga: el fitol el cual le da a las clorofilas sus características hidrofóbicas. Su función es la de anclar la molécula en las regiones hidrofóbicas de las proteínas membranales, además de permitir una cierta orientación del anillo porfirínico en la región hidrofóbica de la membrana.

Existen tres variedades de clorofila, la clorofila  $\alpha, b$  y las bacterioclorofilas; la clorofila  $\alpha$  se encuentra en las plantas superiores y en las algas, la clorofila  $b$  se encuentra solo en las plantas superiores y se diferencia de la primera en que tiene un grupo formilo donde la clorofila  $\alpha$  tiene un grupo metilo, este cambio produce un cambio en la hidrofobicidad de las moléculas que ocasiona que los espectros de absorción de ambos pigmentos sean ligeramente diferentes, la clorofila restante: la bacterioclorofila, se encuentra en las bacterias y se diferencia de las primeras en que un enlace sencillo es sustituido por un enlace doble en el sistema conjugado, esto provoca que el espectro de absorción de la bacterioclorofila sea también diferente aunque el espectro de absorción *in vivo* de todas clorofilas depende de otros parámetros como son uniones con proteínas, interacción con otros pigmentos y otras condiciones ambientales.

A pesar de que las clorofilas son los pigmentos más importantes para la fotosíntesis no son los únicos presentes ni los únicos que participan en la absorción de la luz.

Aproximadamente el 3% del peso de lípidos que se encuentran en los tilacoides corresponden a los carotenoides de los cuales los más comunes son la luteína,  $\beta$ -carotenovioloxantina y neoxantina. Los carotenos se caracterizan por tener un sistema extensivo de enlaces conjugados con una molécula cíclica unida en cada extremo, como resultado de esto absorben fuertemente en el azul. Sin embargo la eficiencia de la transferencia de energía a las clorofilas es muy baja, por lo cual se cree que su principal actividad es la de protección. Este proceso puede ser ejemplificado por el proceso de fotooxidación; las reacciones de oxidación son facilitadas por un gran número de compuestos coloridos que absorben luz en el visible como las clorofilas; en la luz estos compuestos pueden catalizar la oxidación de la mayoría de los componentes celulares por el mecanismo de fotooxidación. En este proceso la energía de un estado de la clorofila llamado triplete excitado que se obtiene cuando no hay un aceptor de  $e^-$  se transfiere al oxígeno para dar un estado excitado singulete del oxígeno:

$D + h\nu = D^*_{\text{S}}$  Estado excitado singulete del colorante

$D^*_{\text{S}} = D^*_{\text{T}}$  Estado excitado triplete del colorante

$D^*_{\text{T}} + O_2 = O_2^*$

Por estas reacciones el colorante actúa como un fotosensibilizador de la oxidación por activación del oxígeno, el estado excitado singulete del oxígeno es muy reactivo y puede oxidar enlaces dobles, grupos amino, etc., provocando la muerte celular si el daño es muy grande.

Las sustancias que protegen a la célula de estos procesos son los carotenoides los cuales atrapan la energía del estado triplete

excitado de la clorofila y lo liberan como calor sin oxidarse.

En ciertas algas se encuentran otro tipo de pigmentos que se encuentran en la superficie de los tilacoides formando agregados con unas proteínas llamadas ficobiliproteínas, estos forman agregados más grandes llamados ficobilisomas. Existen varios tipos de ficobiliproteínas pero los más importantes son la ficobilina y la ficoeritrina. Estos pigmentos son las ficobilinas las cuales están formadas por una estructura tetrapirrólica abierta y probablemente son productos de degradación del grupo HEM. Estos pigmentos se encuentran unidos a las proteínas por una adición del grupo sulfhidrilo de las proteínas a un etileno del pigmento y por la formación de un enlace éster entre ambas moléculas.

Los ficobilisomas sirven como complejos captadores de luz adicionales ya que absorben luz a una  $\lambda$  donde no absorben las clorofilas ( 2 , 8 ).

#### Complejos de Proteínas

El aparato fotosintético de los eucariontes contiene dos fotosistemas cada uno de los cuales es un complejo multicomponente pigmento-proteína, existen otros componentes proteínicos que no contienen pigmentos: el citb<sub>s</sub>/f y la H<sup>+</sup>-ATPasa ( 9 ).

La clorofila se encuentra formando agregados con las proteínas quedando en forma extendida esto permite a).- Mantener las distancias y orientaciones relativas entre los complejos formadores de luz y los centros de reacción para maximizar la transferencia de energía, b).- Crear distintos microambientes para aumentar el espectro de absorción de los complejos captadores de luz c).- Regular las interacciones entre los complejos captadores

de luz y los centros de reacción regulando así la absorción en cada fotosistema.

Para llevar el rango de absorción de la luz a los niveles más altos posibles, cada CR está rodeado por pigmentos que sirven como antenas (LHC). La luz captada por estos LHC es llevada a los centros de reacción dando como resultado que se absorba una mayor cantidad de energía que si actuaran solo los pigmentos del centro de reacción. Por lo cual cada fotosistema esta formado por un RC y su complejo captador de luz ( 6 , 10 , 13 ).

El fotosistema II es un ensamble de proteínas con clorofilas unidas , el cual es capaz de reducir por medio de la luz a la plastoquinona recuperando electrones del agua. Para efectuar el transporte de electrones en el centro de reacción se necesita una clorofila  $\alpha$  especial llamada P680, 2 o más dadores de electrones que actúan del lado oxidado del centro de reacción , un aceptor intermediario de electrones probablemente una feofitina y dos quinonas que actúan como aceptores primarios y secundarios; todos estos elementos se encuentran unidos a distintas proteínas. El donador primario P680, la feofitina, los aceptores primario y secundario se encuentran unidos a la proteína D<sub>1</sub> con un peso molecular de 32 kD, y D<sub>2</sub> con un peso molecular de 34 kD. Las otras clorofilas que forman el centro de reacción se encuentran unidas a otras dos proteínas con pesos moleculares de 43 y 47 kD. Todas estas proteínas permiten mantener un orden y orientación entre los componentes del centro de reacción ( 11 , 12 ).

En el LHCII que rodea al CRII se encuentra la mitad de las proteínas y clorofilas que hay en los tilacoides incluyendo la mayoría de la clorofila b, carotenos y xantofilas, la proporción de

clorofila *a*, *b*, carotenos, xantofilas es 4:3:2:1, y el ratio *a/b* es de 1-1.4, estos pigmentos se encuentran unidos a unidades formadas por trimeros de 2 péptidos cuyo peso molecular es de 24-27kD., y se puede tener hasta 300 moléculas de clorofilas. Los LHC II tienen otro fragmento llamado CP29 el cual se dice que es un LHCII interno el cual sirve para unir el CR con el LHCII.

El LHCII no solo sirve como antena sino que contribuye a la diferenciación de la membrana del tilacoide en zonas apesadas y no apesadas esto se logra mediante la interacción de ciertos residuos de polipéptidos del LHCII con las membranas de los tilacoides; debido a esto y a la lateralidad en la distribución de los fotosistemas, el LHCII regula la cantidad de energía de excitación absorbida por los fotosistemas, esto está dado por la fosforilación de ciertos péptidos del LHCII el cual pasa así al estado II, lo cual hace que se una preferencialmente al PSI. Cuando este complejo no está fosforilado pasa al estado I y se encontrará en el PSII; la enzima que realiza esto es una cinasa que se encuentra unida a la membrana de los tilacoides cuya actividad es regulada por el estado redox de la plastoquinona. La fosforilación aumenta la carga negativa y por repulsión de cargas evita la formación de los sacos (9).

El fotosistema I es un ensamble de proteínas a las cuales están unidas las clorofilas y otros pigmentos, que son capaces de producir un oxidante débil inducido por la luz, el cual oxida a la plastoquinona y un reductor fuerte capaz de transferir electrones a la ferredoxina. Los componentes de esta transferencia de electrones son la clorofila *a*, del centro de reacción llamada P700 la cual se encuentra unida junto con otras clorofilas *a*, a dos



polipéptidos de 70kD, un aceptor intermediario y tres aceptores estables de electrones que son proteínas FeS de bajo potencial redox con un peso molecular de 16, 18, 40kD., y por último un péptido de 20kD., el cual une a la plastocianina al centro de reacción I.

Mientras que la existencia del LHCII ha sido conocida por mucho tiempo, la existencia de un LHCI homólogo ha sido revelada recientemente: está formado por 4 polipéptidos de 20-26kD y contiene aprox. 20 clorofilas con un radio  $a/b$  de 3.5-3.7 ( 9 ).

### Reacciones Luminosas

#### Eventos primarios de la fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso biológico por el cual se convierte la radiación electromagnética en energía química.

Es en el centro de reacción donde ocurren las primeras reacciones fotoquímicas las cuales consisten en una transferencia de electrones inducida por la luz de un donador D<sup>+</sup> a un aceptor. esta energía es conservada en la separación de carga y es usada por los organismos para llevar reacciones de transferencia de electrones que proveen energía para la síntesis de compuestos ricos en energía como el ATP ( 13 ).

Cuando un fotón es absorbido por un átomo o molécula su efecto es cambiar la configuración de la carga eléctrica asociada a la valencia. Como este estado tiene más energía que el estado basal se dice que la molécula está excitada. Esta transición se lleva a cabo solo bajo ciertas condiciones predichas por la mecánica cuántica.

En los pigmentos varios factores tienden a engrosar estas regiones en bandas como lo son los dobles enlaces conjugados.

debido a que cada doble enlace conjugado agrega un par de electrones compartidos por el sistema conjugado como un todo, por lo tanto el efecto del sistema conjugado es el de disminuir la transición entre el estado basal y el excitado; creando varios estados intermedios por lo cual estas sustancias absorben fotones con una  $\lambda$  menor. Otros factores que incrementan el número de estados cuánticos posibles: energía vibracional y rotacional de las moléculas.

Cuando un fotón de energía apropiada llega a una clorofila el pigmento entra en un estado excitado en  $10^{-15}$ s. Hay dos estados excitados en la clorofila *a*, el primer estado excitado producido por la luz roja y el tercer estado excitado producido por la luz azul.

Para los propósitos de la fotosíntesis el nivel energético más importante es el primer estado excitado singulete  $S_1$ . Las moléculas elevadas al tercer estado excitado singulete  $S_3$  regresan rápidamente a  $S_1$  a través de las transiciones de energía vibracional y rotacional liberándose calor durante el proceso; a esto se llama conversión interna, debido a esto un fotón de luz azul no da más energía que uno de luz roja.

Una vez que la clorofila se encuentra en el primer estado excitado singulete, puede seguir varias vías como son conversión interna con liberación de calor, puede regresar al estado basal emitiendo el fotón absorbido como fluorescencia, puede entrar a un estado de excitación diferente llamado el estado triplete, puede transferir su energía a otra clorofila o puede entrar en una reacción química.

El estado triplete se diferencia del singulete por la

orientación del electrón es decir por el número de spin, este estado se dice que es metaestable porque hay pocos eventos que cambien el spin de un electrón y por ello difícilmente puede pasar a Si o al estado basal.

La vía que sigue el primer estado excitado singulete depende de la velocidad en que ocurran cada uno de los eventos, este estado dura  $2 \times 10^{-9}$  s.

La mayoría de los pigmentos en el cloroplasto no toma parte en los procesos químicos de la fotosíntesis, la mayoría sirve como antena y por ello tienen que transferir la energía que absorbieron a los centros de reacción. Para que esto funcione correctamente se debe tener un mecanismo por el cual se transfiera la energía entre las clorofilas con gran eficiencia y velocidad para que supere a los otros eventos posibles (  $\theta$  ).

Cuando el tiempo de transferencia es mayor al tiempo de relajación vibracional intramolecular ( $10^{-12}$  s.), ocurre una transferencia unidireccional. El estado excitado de la molécula donadora se relaja a un estado vibracional basal antes de transferir su energía al aceptor. Después de la transferencia, la molécula aceptora se relaja vibracionalmente y cae la resonancia con el donador, el proceso inverso ocurre solo si el estado excitado del aceptor es mayor a un estado vibracional mayor. A esto se llama la teoría de Förster.

Cuando el tiempo es menor al tiempo de relajación vibracional intramolecular ocurre la transferencia bidireccional. En ella un cuanto de energía puede ser transferido repetidamente entre niveles de resonancia vibracional del donador y aceptor. En el extremo la energía se deslocaliza en varias moléculas que

interactúan fuertemente . A este proceso se le llama excitón ( 10 , 13 ).

El camino que sigue esta energía hasta llegar a la clorofila del centro de reacción se piensa que es una caminata al azar. Otra hipótesis dice que cada centro de reacción esta rodeado por un agregado fijo de pigmentos, se cree que la realidad es una mezcla de ambas ideas. El centro de reacción tiende a captar la energía de los LHC porque tiene una energía de absorción menor a las clorofilas del LHC.

Cuando la energía absorbida por el LHC alcanza a un centro de reacción eleva a la clorofila de este centro de reacción a un estado excitado singulete  $S_1$  lo que hace a esta molécula un donador de electrones muy fuerte, ya que un electrón en este estado esta unido más debilmente y por ello es transferido rápidamente a un aceptor de electrones vecino. Para que esta transferencia ocurra en un alto porcentaje debe vencer las otras vías que puede seguir el estado excitado singulete, ésto se logra porque este estado es relativamente estable por su baja energía ( 8 ).

Una vez que ha ocurrido la transferencia de electrones la energía luminosa ha sido transformada en una separación de carga, es decir en energía eléctrica. Para que esta reacción tenga lugar el donador y el aceptor tienen que estar lo más cerca posible y tener una cierta orientación, lo cual es proporcionado por las proteínas de los centros de reacción. La recombinación de la carga debe ser evitada para impedir la perdida de la energía, esto se logra por medio de una cadena de aceptores de electrones que van alejando las cargas entre sí y por una cadena de donadores de

electrones que reduce a  $P^+ (14)$ .

Hay dos sistemas de aceptores de electrones, uno que contiene quinonas con fierro y el otro más reductor con centros Fe-S, estos dos sistemas aceptores estan organizados en dos fotosistemas según el sistema de transporte de electrones de Hill-Bendall (fig 3,4.). Este modelo se basa en la siguiente evidencia experimental:

- a.- Se requieren 8 cuantos de luz para producir una molécula de oxígeno.
- b.- la menor eficacia en la fotosíntesis a longitudes de onda mayores a 685nm. y el efecto sinérgico de luz con longitudes de onda menores..
- c.- la presencia de dos citocromos cuyos potenciales difieren por 0.4v
- d.- La estimulación del flujo de electrones cuando hay fosforo ( 15 , 16 ).

En el fotosistema II se realiza la transferencia de electrones de P680, la oxidación de agua y la reducción de la plastoquinona.

El donador de electrones del fotosistema II es una clorofila especial llamada P680 llamada así para reconocer la longitud de onda de máxima absorción y ubicada en el interior de la membrana. Cuando ésta molécula es excitada por un fotón llega al estado excitado singulete  $P^*680$  en donde cede un electrón al aceptor primario llamado I, el cual es una feofitina, esto nos deja un par  $P^+680-I^-$ . Para evitar la recombinación de la cargas existen dos vías de transferencia de electrones conectadas a P680.

Del lado oxidado se encuentra el donador primario llamado Z el cual se cree que es un resto de tirosina en D1 el cual conecta a P680 con la enzima liberadora de oxígeno. En el fotosistema II se forma un reductor moderado y un oxidante muy fuerte que es  $P^*$  el cual puede extraer electrones de Z el cual a su vez oxida al

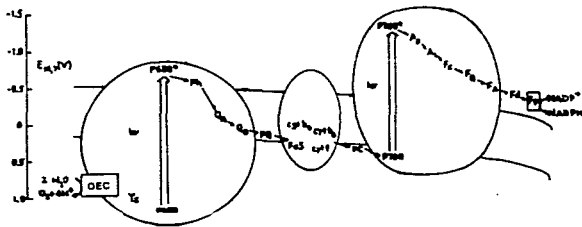
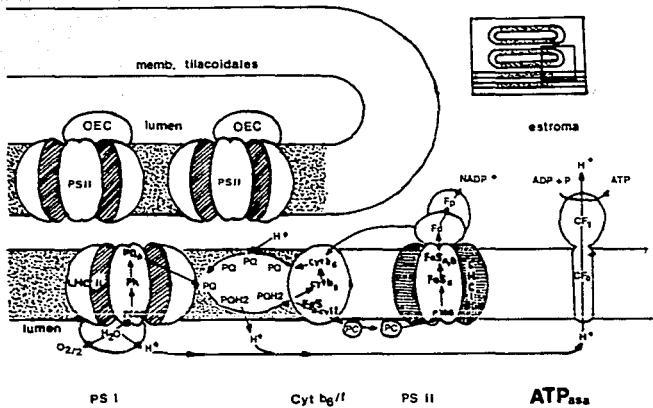
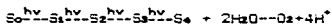


fig. 3,4 Representación Diagramática de la Cadena óxido reductora de transporte electrones y organización de los complejos de proteínas .

sistema liberador de oxígeno. El problema es que la oxidación del agua libera cuatro protones simultáneamente mientras que  $P^{680}$  puede aceptar electrones de uno en uno por lo cual se requiere que el centro liberador de oxígeno tenga un sitio catalítico que actúe como un acumulador de equivalentes oxidantes y de esta manera prolongar la oxidación del agua. Este sitio catalítico incluye un núcleo de manganeso tetranuclear al cual se unen 2 moléculas de agua. Cada uno de los equivalentes oxidantes necesarios para la formación de oxígeno a partir de agua son guardados en los diferentes estados de oxidación de núcleo de manganeso produciendo así diferentes estados de oxidación en la enzima liberadora de oxígeno los cuales son llamados  $S_i$  ( $i=0,1,2,3,4$ ) con el estado  $S_0$  generando espontáneamente oxígeno del agua y regresando al estado inicial  $S_0$ . Por lo que cada evento fotoquímico lleva al sitio catalítico de un estado  $S_i$  a un estado  $S_{i+1}$ , por lo tanto es una reacción enzimática multipasos en el cual el sustrato (agua) está unido en un paso temprano en el mecanismo y es oxidado secuencialmente para dar oxígeno.

Entre cada reacción luminosa hay reacciones oscuras que involucran la reoxidación de Z.

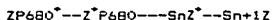


Durante el paso de  $S_0$  a  $S_1$  y de  $S_2$  a  $S_3$  se puede detectar la liberación de protones por el complejo al espacio luminal, otros dos protones son liberados simultáneamente con el oxígeno al pasar de  $S_4$  a  $S_0$ . Los estados  $S_0$  y  $S_1$  son estables en la oscuridad debido a que los estados de oxidación del manganeso en esos estados (II, III) son estables en el cloroplasto, los estados mayores decaen espontáneamente en la oscuridad a  $S_0$  debido a que

los estados de oxidación del manganeso en estos estados ( IV ) no son estables en el cloroplasto. Se cree que en este proceso esta involucrado el citocromo  $b_5$  ya que estos estados son potencialmente peligrosos para la célula, y se han propuesto varios modelos estructurales para la enzima según los datos anteriores sin embargo no se conoce aún la estructura de esta enzima.

El sitio catalítico del sistema liberador de oxígeno se encuentra en el lado interno de las proteínas  $D_1$  y  $D_2$ . Para su actividad se requiere la presencia de iones cloruro y calcio los cuales estabilizan los distintos estados de oxidación de la enzima. Todos estos constituyentes están rodeados por proteínas hidrofílicas de 33,23,17 kd las cuales se encargan de proteger al sitio activo ( fig.5 , 17 , 18 , 19 ).

La secuencia de reacciones globales es :



Del lado reductor,  $I^-$  traslada su electrón a  $Q_A$  y ésta a  $Q_B$  las cuales son fierro-quinonas unidas a la proteína del centro de reacción y que solo pueden transportar 1 electrón. El papel del átomo de hierro en estas quinonas no es conocido pues no participan en las reacciones redox como el grupo Hemo de los citocromos. Por último  $Q_B$  sirve como enlace entre el centro de reacción y el pool de plastoquinona ubicado en la parte exterior de la membrana, la plastoquinona al recibir dos electrones toma dos protones del medio externo y regresa al interior de la membrana por medio del complejo citocromo  $b_6/f$  ( 15 ).

El citocromo  $b_6/f$  se encuentra en el interior de la membrana del tilacoide. Está formado por 1 citocromo  $f$  unido a una proteína de 34+33kd, 2 citocromos  $b_6$  y una proteína con un centro  $[Fe-2S$



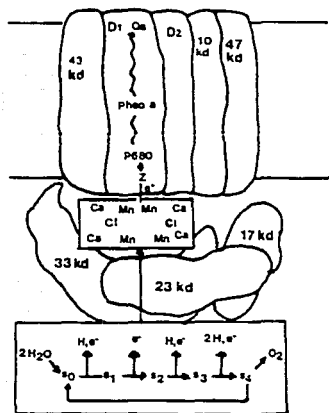


fig. 5 Evolución de oxígeno por el fotosistema II,  
Estructura de polipeptidos y cofactores inorgánicos.

llamada proteína de Rieske. Los citocromos se caracterizan por el modo de unión del grupo Hemo a la proteína, propiedades espectrales y el potencial redox del hierro del grupo Hemo. En el citocromo f el grupo Hemo está unido covalentemente a la proteína mientras que en los citocromos b<sub>6</sub> el grupo Hemo no lo está y participa en el flujo cíclico de electrones alrededor del complejo ( 2 ).

Este complejo tiene dos sitios de unión para la plastoquinona uno ubicado en el exterior llamado Q<sub>c</sub> donde se une PQ y otro llamado Q<sub>x</sub> ubicado en el interior de la membrana donde se une el plastoquinol. Este plastoquinol cede sus electrones simultáneamente al citocromo f y al citocromo b<sub>6</sub> dejando sus protones en el espacio luminal y Q<sub>x</sub> es reemplazado por otro plastoquinol. De los dos electrones cedidos uno sirve para reducir la plastoquinona ubicada en Q<sub>c</sub> a través de los citocromos b<sub>6</sub> y el otro es transferido vía proteína de Rieske a la plastocianina. En otro ciclo de reacciones la plastosemiquinona de Q<sub>c</sub> es reducida a plastoquinol siendo sustituida por otra plastoquinona, esto permite la formación de un gradiente electrónico a lo largo de este complejo ( 20 ).

La plastocianina es un transportador móvil de 1 electrón que une el complejo citocromo b<sub>6</sub>/f con el fotosistema I. La plastocianina es una proteína con cobre ubicada en la parte interior de la membrana con un potencial redox de 0.37v.( 2 ).

El siguiente elemento del transporte de electrones es el fotosistema I donde ocurre el segundo evento fotoquímico. Cuando el pigmento del centro de reacción P700 absorbe un fotón pasa al estado excitado singulete P<sup>\*</sup>700, el cual cede un electrón a una

molécula aceptora ubicada en el mismo centro de reacción, la orientación del centro de reacción asegura que la separación de carga sea perpendicular a la superficie de la membrana produciendo con el el fotosistema II una diferencia de potencial eléctrico transmembranal. La primera molécula reducida por  $P^{*700}$  es una estructura similar a la clorofila  $\alpha$  llamada  $A_0$ . La separación de carga  $P^{*700}-A_0$ , es estabilizada cuando  $A_0$  transfiere su electrón al aceptor secundario  $A_1$  cuya identidad química es desconocida. Los siguientes aceptores de electrones son  $F_A, F_B, F_X$  los cuales son centros  $4Fe-4S$  asociados a los polipéptidos IV, V, VI, del centro de reacción.

Por su potencial redox  $F_X$  es un aceptor anterior a  $F_A$  y  $F_B$ , los cuales actúan en paralelo. Estos compuestos son reductores muy fuertes y pueden ser utilizados para reducir nucleótidos de piridina o producir ATP por un flujo de electrones cíclico (15).

Estas proteínas reducen a la ferredoxina a través de la sustancia reductora de la ferredoxina. La ferredoxina es una proteína hidrosoluble ubicada en el exterior de la membrana que acopla la transferencia de electrones entre el fotosistema y  $NADP^+$  para formar NADPH.

Esta reducción es catalizada por la ferredoxin-NADP reductasa que esta asociada con la superficie de las regiones no apiladas de los tilacoides. En este proceso se cambia de un transportador de 1 electrón como es la ferredoxina a uno de 2 electrones como es el NADPH por lo cual esta enzima tiene en su grupo prostético un grupo  $FAD^+$ . Este grupo al aceptar dos electrones toma 2 protones del medio externo para formar  $FADH_2$ . Finalmente el  $NADP^+$  toma los electrones y un protón del  $FADH_2$  formando NADPH.

Cuando ha terminado el transporte de 2 electrones de agua a NADPH, han desaparecido tres protones del exterior y han aparecido cuatro protones en el interior esto provoca la aparición de un gradiente electroquímico transmembranal de  $H^+$  que será utilizado para la síntesis de compuestos ricos en energía como el ATP. De esta manera, durante el transporte de electrones se obtiene la energía y el poder reductor necesarios para reducir el  $CO_2$  a carbohidratos que se efectúa en las reacciones oscuras de la fotosíntesis ( 2 ).

### Fotofosforilación

Durante el transporte de electrones se produce suficiente energía para formar ATP; se han desarrollado diferentes teorías para explicar como se acopla este transporte de electrones con la fosforilación del ADP a ATP. La más aceptada es la teoría quimiosmótica de Mitchell; en ella se propone que el flujo de electrones y la fosforilación están acoplados indirectamente a través de un potencial electroquímico de iones hidrógeno a través de la membrana. Este potencial se produce porque durante el transporte de electrones se conducen protones hacia el interior de los tilacoides. A consecuencia de ello se crea un potencial electroquímico de protones a través de la membrana. Este gradiente consta de dos componentes; uno de los cuales es una diferencia en la concentración de protones ( $\Delta pH$ ) y el otro es una diferencia de potencial eléctrico ( $\Delta \Psi$ ). La síntesis de ATP se lleva a cabo por un flujo de protones en sentido inverso es decir a favor del gradiente.

La teoría quimiosmótica enfatiza la importancia de reacciones

vectoriales las cuales llevan a una transferencia de protones a través de la membrana. Esta hipótesis tiene 5 postulados:

1.- Las reacciones ocurren en una membrana impermeable a protones la cual separa una región de otra, esta membrana proporciona un medio interno controlado.

2.- En el flujo de electrones se alternan acarreadores de protones con moléculas que solo pueden transportar electrones. Estas reacciones secuenciales ocurren en lados opuestos de la membrana con una geometría restringida regulada por la concentración de los acarreadores de protones y electrones. El empleo de este sistema es posible porque los protones son solubles en agua mientras que los electrones no. Al interactuar una molécula que porta un átomo de hidrógeno completo con otra molécula que solo transporta electrones, se libera el protón a la solución acuosa. Si luego el acarreador de electrones cede su electrón a un acarreador de hidrógenos, éste toma un protón de la solución. De esta manera en los cloroplastos se toman protones del medio externo y son liberados en el medio interno. El efecto neto acopla el flujo de electrones a la traslocación de protones hacia dentro.

3.- El flujo de electrones hace que el medio interno sea más ácido y eléctricamente positivo lo cual crea un potencial eléctrico.

4.- El gradiente de protones consta de dos componentes un componente es la diferencia de concentración o actividad química de los protones a ambos lados de la membrana, la carga eléctrica llevada por los protones da lugar al segundo componente de la energía del gradiente. Debido a la diferencia de concentración de protones y potencial eléctrico los protones tienden a fluir en sentido inverso, a esto se le llama fuerza protonmotriz ( pmf )

cuya ecuación es:

$$pmf(mv) = \Delta\psi + RT/F (\Delta pH).$$

Esta es la fuerza que promueve la síntesis de ATP.

5.- La pmf forma ATP a través de una enzima membranal cuya actividad es vectorial. El efecto neto es la traslocación de protones por cada ATP escindido. Por lo tanto la hidrólisis de ATP aumenta la pmf y por ello un pmf elevado promueve la reacción inversa.

El fenomeno de acoplamiento resulta del hecho que la traslocación de protones es obligada en el transporte de electrones. Una vez que la actividad de protones es muy elevada en el interior del tilacoide, estos tienden a salir y como la membrana es impermeable a ellos, solo pueden salir produciendo ATP.

El acoplamiento es tal que la síntesis de ATP regula la velocidad del transporte de electrones pues cuando hay síntesis de ATP la energía del pmf se consume por lo cual se debe de aumentar la velocidad del flujo de electrones para mantener el pmf. Además el transporte de electrones se vuelve más lento cuando hay un pmf elevado pues es difícil seguir bombeando protones al interior bajo estas condiciones. Cuando el pmf es disminuido el bombeo de protones al interior se vuelve más fácil y por lo tanto se acelera el transporte de electrones.

Es importante notar que la membrana de los tilacoides es permeable a varios iones como cloruros,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , por lo cual hay un transporte de estos iones simultaneo a la traslocación de protones en ambos sentidos segun la carga del ión; esto ocasiona que en los cloroplastos el potencial eléctrico transmembranal desaparezca, con lo cual el único miembro del gradiente es la

diferencia de pH transmembranal ( 21 , 26 ).

La síntesis de ATP en cloroplastos es catalizada por una enzima que transloca protones la cual consiste de dos partes:  $CF_1$ , que es una proteína externa a la membrana y expuesta por lo tanto al estroma donde esta el pool de ATP y  $CF_0$  que es un agregado de proteínas hidrofóbicas embebidas en la membrana.  $CF_1$  contiene los sitios catalíticos de la  $H^+$ -ATPasa y  $CF_0$  une a  $CF_1$  a la membrana y sirve como canal de protones.

$CF_1$  puede verse en las microfotografías electrónicas como una esfera de 90 Å. Se ha calculado que tiene un peso molecular de 325-6kD y está formada por 5 polipéptidos llamados  $\alpha$  de 59kD,  $\beta$  de 56kD,  $\gamma$  de 37kD,  $\delta$  de 17.5kD y  $\epsilon$  de 13kD los cuales estan en una estequiometria de 3-3-1-1-1 respectivamente.

El sitio catalítico y los sitios de unión de nucleótidos reguladores están en  $\alpha$  y  $\beta$  los cuales estan en el exterior de la membrana. y esta envuelta en la traslocación de protones además de ser el sitio de unión de  $\epsilon$ ,  $\delta$  es necesaria para tener rangos máximos de fosforilación.  $\epsilon$  inhibe la actividad enzimática de hidrólisis de ATP de la enzima al bloquear el canal de protones y participa en la latencia de  $CF_1$  en vivo durante la obscuridad y en la regulación de la actividad de la enzima.

$CF_0$  esta formado por tres cadenas polipéptidicas I, II, III, las cuales forman un octámero que sirve de canal para los protones ( 22 ).

El mecanismo que utiliza la ATPasa para sintetizar ATP implica cambios conformacionales producidos por la traslocación de protones a través de la enzima. Se sabe que tanto el ATP como el ADP estan unidos a dos sitios en  $CF_1$  cada uno. Estos nucleótidos

fuertemente unidos participan en reacciones de intercambio, las cuales son pasos de la reacción global de síntesis de ATP. Las reacciones de intercambio ATP-ADP ocurren sin aporte de energía pues ambos nucleótidos están unidos a la proteína. El ATP resultante solo podría separarse con la adición de la energía proporcionada por el flujo de protones la cual ocasiona un cambio conformacional que libera al ATP.

La energía derivada de las reacciones redox se transforma en cambios conformacionales en  $CF_1$  que cambian la afinidad de la enzima por los nucleótidos. El ATP se encuentra unido a  $CF_1$  en un complejo nucleótido- $CF_1$ . Esta conformación es estable y puede ser aislada. Con energía proveniente del transporte de electrones el ATP es liberado por un cambio conformacional asociado a la energía, regresando a su conformación original ( 23 ).



Hay varias pruebas críticas para la teoría quimiosmótica las cuales son: 1.- La relación de protones trasladados a electrones transportados debe ser estequiométrica con el número de sitios de conversión de energía en la cadena de transporte de electrones 2.- Los protones consumidos por el gradiente y el ATP sintetizado deben tener un rango estequiométrico de uno o dos protones por ATP y 3.- Se debe establecer un gradiente químico mínimo para que ocurra la fosforilación ( 24 ).

Una suposición fundamental de los modelos de membrana de transducción de energía es que se transfieren dos protones por cada lugar de acoplamiento. En los cloroplastos se translocan 4 protones por cada par de electrones transportados, lo que produce una relación  $H^+/O$  de 4, además se requieren 3 protones por cada



ATP sintetizado por CF<sub>1</sub>, por lo cual se tiene que se forman 4 moléculas de ATP por cada 3 pares de electrones transportados.

Se ha calculado que la pmf producida por el gradiente electroquímico es de 4.8 kilocal/mol de protones. Dado que por cada ATP sintetizado retornan 3 protones a través de la membrana, se dispone de 14.4 kilocalorias para la fosforilación, lo cual coincide con la energía libre necesaria para la formación de ATP.

Además de la fotofosforilación que se realiza en el flujo normal de electrones, puede formarse ATP por medio de un flujo cíclico de electrones alrededor del PSI. Este flujo de electrones se caracteriza por no producir agentes reductores y funciona cuando el pool de NADP<sup>+</sup> es pequeño y se requiere ATP ( 25 ).

#### **Reacciones Oscuras de la Fotosíntesis**

Durante las reacciones luminosas de la fotosíntesis la energía luminosa del sol es utilizada para generar compuestos ricos en energía como el ATP y agentes reductores como el NADPH, los cuales se encargan de reducir al CO<sub>2</sub> durante las reacciones oscuras de la fotosíntesis.

El ciclo de la reducción de pentosa fosfato es la vía bioquímica básica por la cual el CO<sub>2</sub> es convertido en triosas fosfato durante la fotosíntesis. Esta vía se encuentra en la mayoría de los organismos que efectúan la fotosíntesis. En otras plantas llamadas C<sub>4</sub> existe una vía adicional llamada C<sub>4</sub> en la cual el CO<sub>2</sub> es incorporado primero al fosfoenolpiruvato y después es liberado para fijarse por el ciclo de la reducción de pentosa fosfato o llamado también ciclo de Calvin. La función del ciclo C<sub>4</sub>

es utilizar ATP para traer carbono a los cloroplastos para producir una concentración de  $\text{CO}_2$  elevada y mantener baja la actividad de oxigenasa de la Rubisco, una enzima del ciclo de Calvin.

Las enzimas del ciclo de Calvin se encuentran en el estroma del cloroplasto, son solubles en agua, en el ciclo hay solo tres pasos en los cuales se consume el ATP y NADPH.

El ciclo de Calvin puede dividirse en tres aspectos: carboxilación, reducción y regeneración del aceptor de  $\text{CO}_2$ ; en el ciclo de Calvin la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa cataliza la adición de  $\text{CO}_2$  a una molécula de ribulosa 1,5 difosfato con la formación de dos moléculas de fosfoglicerato ( PGA ) que son reducidas a triosas fosfato a expensas del NADPH. De estas triosas fosfato una se guarda como producto mientras que otras cinco se utilizan para regenerar el aceptor de  $\text{CO}_2$ .

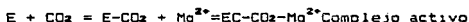
Una vez que se han formado las triosas fosfato estas pueden seguir diferentes vías metabólicas como la formación de almidón en el cloroplasto el cual puede ser el 40% del  $\text{CO}_2$  fijado, la otra vía metabólica da lugar a la formación de sacarosa en el citoplasma lo cual implica que las triosas fosfato son exportadas.

### Ciclo de Calvin

El primer paso del ciclo de Calvin es la reacción de la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa en la cual  $\text{CO}_2$  y agua son combinados con ribulosa 1,5 difosfato. En el proceso ésta molécula es rota entre los átomos de carbono 2 y 3 para dar dos moléculas de fosfoglicerato ( PGA ). El oxígeno puede competir con el  $\text{CO}_2$  para dar 1 molécula de PGA y una molécula de 2-fosfoglicerato.

Como el oxígeno compite con el CO<sub>2</sub> por el sitio catalítico el rango de la reacción es determinado por la concentración de los dos gases.

La ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa tiene un peso molecular de 550kD y está formada por 8 subunidades de 55kD sintetizadas en los ribosomas del cloroplasto y que contienen el sitio activo y otras 8 subunidades de 15kD las cuales son sintetizadas en el citoplasma; esta enzima requiere dos cofactores para activar a la enzima que son Mg<sup>2+</sup> y CO<sub>2</sub>. La forma inactiva de la enzima se une primero con CO<sub>2</sub> en forma lenta y este complejo se une al ión magnesio para formar el complejo activo.



La carboxilación ocurre cuando otra molécula de CO<sub>2</sub> reacciona con la enzima. La molécula de CO<sub>2</sub> que forma el complejo activo no participa en la reacción química.

La concentración de CO<sub>2</sub> en el estroma es controlada en las plantas por la enzima anhidrasa carbónica, de tal manera que el CO<sub>2</sub> utilizado en la reacción es sustituido por una molécula de bicarbonato.

Si se quita el CO<sub>2</sub> y el Mg<sup>2+</sup> se forma el complejo inactivo, por lo cual la actividad de la enzima es dependiente de estos dos factores. El Mg<sup>2+</sup> es proporcionado porque durante el transporte de electrones se bombean estos iones hacia el estroma del cloroplasto a contracorriente de la bomba de protones.

En la segunda reacción del ciclo de Calvin se fosforilan los ( PGA ) hacia difosfogliceratos ( DPGA ) esta reacción es catalizada por la 3-fosfoglicerato cinasa. En este paso se consume 1 ATP.

La reducción de DPGA a gliceraldehido fosfato es catalizada por una NADP-Deshidrogenasa que solo existe en los cloroplastos y que tiene un PM de 600kD. La formación de gliceraldehido 3-fosfato es el único paso reductor del ciclo y es uno de los sitio donde se libera fosfato. En esta reacción se utiliza el agente reductor NADPH el cual regula junto al ATP la actividad de esta enzima.

A continuación viene una reacción catalizada por una triosa fosfato isomerasa de PM de 53kD. Las triosas formadas son unidas por una aldolasa de PM de 150kD para dar fructosa 1,6-difosfato. Esta reacción es regulada por la proporción de las triosas fosfato.

La hidrólisis de la fructosa 1,6-difosfato para dar fructosa 6-fosfato es el segundo paso liberador de fosfato y es catalizada por una fructosa 6-fosfato fosfatasa propia de los cloroplastos de un PM de 160kD. Esta enzima se activa por la luz y se inactiva en la obscuridad a través de la formación de agentes reductores que reducen los grupos sulfhidrilo de la enzima volviendola activa.

En la siguiente reacción una transcetolasa de 140kD transfiere un segmento de 2 átomos de carbono de la fructosa 6-fosfato al aceptor gliceraldehido dando eritrosa 4-fosfato con 4 átomos de carbono y xilulosa 5-fosfato con 5 átomos de carbono. Esta enzima requiere tiamina, pirofosfato y magnesio para realizar su actividad. A continuación vuelve a actuar la aldolasa para dar sedoheptulosa 1,7-difosfato, la cual se desprende de un fosfato por la acción de una fosfatasa cuya actividad es regulada por la luz y agentes reductores. Entonces vuelve a actuar la transcetolasa transfiriendo un segmento de 2 átomos de carbono de la sedoheptulosa 7-fosfato al gliceraldehido 3-fosfato para dar

pentosas fosfato que después son fosforilados para dar el aceptor de  $CO_2$ , esta reacción es catalizada por la luz, agentes reductores, ATP, ADP, AMP, ETC. ( 26 ).

### **Regulación del ciclo de Calvin**

La regulación del ciclo de Calvin se basa en que en las reacciones luminosas de la fotosíntesis se producen metabolitos que alteran el ambiente de las enzimas del ciclo de Calvin.

La concentración de ATP y NADPH ejerce un control debido a que el ciclo de Calvin no puede funcionar sin estos metabolitos además el transporte de electrones provoca un aumento del pH en el estroma a 8-8.5 donde trabajan mejor las enzimas del ciclo de Calvin, además el gradiente de pH provoca que en el estroma haya concentraciones adecuadas de iones magnesio necesarios para varias enzimas aunque este efecto no es tan marcado *in vivo*.

Ha llamado la atención el hecho de que el ciclo es autocatalítico, lo cual se manifiesta como una inducción; esto se produce porque la luz provoca la activación de ciertos catalizadores y la síntesis de ciertos intermediarios.

Hay ciertas enzimas del ciclo de Calvin que son activadas por la luz lo cual se produce porque las reacciones luminosas de la fotosíntesis producen agentes reductores. Hay dos sitios en la cadena de transporte involucrados en este proceso. Uno en el lado reductor de PSI pero antes de la ferredoxina y la ferredoxina misma.

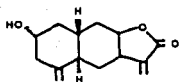
Se han desarrollado dos hipótesis para explicar esta activación. En la primera los agentes reductores de la cadena de transporte de electrones reducen a un compuesto llamado

thioredoxina por medio de una thioredoxina reductasa; esta thioredoxina reduce entonces puentes disulfuro de las proteínas provocando un cambio conformacional que las activa. La thioredoxina oxidada es reducida por la ferredoxina quedando lista para actuar de nuevo, en la oscuridad un agente oxidante oxida los grupos sulfhidrilo y la enzima se desactiva. En la otra teoría el transporte de electrones reduce los grupos sulfhidrilo de un componente único en la membrana llamado mediador del efecto de luz (LEM). cuando esto ocurre, se une a él una enzima y el LEM cataliza una reacción de intercambio entre un grupo sulfhidrilo y un enlace disulfuro de la enzima, lo que provoca su activación. La vía de desactivación ocurre en la oscuridad por medio de la reacción reversible ( 27 , 28 ).

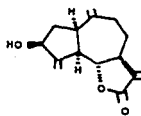
## LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

Los compuestos ensayados ivalina y zaluzanina C ( fig. 6), forman parte de la familia de las lactonas sesquiterpénicas, un tipo especial de terpenoides: en espera de datos experimentales generalmente se acepta que estos compuestos del tipo ciclodeca 1,5-dieno derivan del trans,trans farnesil pirofosfato. este compuesto se biosintetiza a través de condensaciones cabeza-cola de unidades de isopreno, siguiendo los siguientes pasos: acetato-mevalonato-isopreno(isopentilpirofosfato)-geranil pirofosfato-trans,trans farnesil pirofosfato ( 29 ).

Este compuesto sufre un proceso de ciclización para dar un anillo de 10 miembros el cual forma el esqueleto central de las lactonas sesquiterpénicas y se llama germacradiona (fig. 7): para sintetizar la lactona se llevan a cabo diversos procesos oxidativos que involucran hidroxilaciones en C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub> y formación de epóxidos en C<sub>12</sub> o C<sub>13</sub> que luego se transformarán en un grupo carboxilo, el cual da lugar a la formación del anillo lactónico que puede ser cis o trans al esqueleto carbocíclico. En la nomenclatura de las lactonas sesquiterpénicas el anillo lactónico se menciona con sufijo "olida", lo cual se basa en la custonalida que está relacionada con el sesquiterpeno carbocíclico de 10 miembros germacrona producto de la ciclización del trans,trans farnesil pirofosfato. Una vez que se ha formado el anillo lactónico tenemos el primer tipo de lactonas sesquiterpénicas: las germacranolidas a partir de las cuales pueden derivar los otros tipos de lactonas sesquiterpénicas mediante alteraciones en el esqueleto terpénico que incluye ciclizaciones transanulares las cuales se deben a la



I



II

fig 6 Estructura de Ivalina ( I ) y Zaluzanina C ( II ).

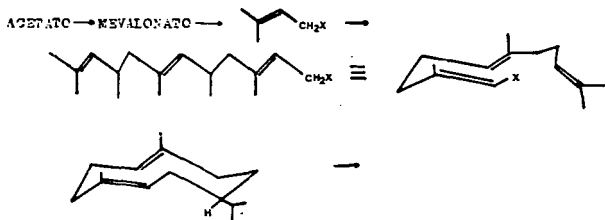
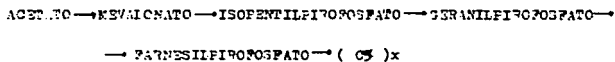


fig 7 Ruta de Biosíntesis de los precursores de los terpenos ( 29 ).



formación de epóxidos en los dobles enlaces y una posterior ciclización en medio ácido. Una vez formada, cada tipo de lactona puede sufrir diversas modificaciones en su esqueleto como son formación de epóxidos, incorporación de grupos hidroxilo, generalmente esterificados, etc.( 30 ).

Las lactonas sesquiterpénicas se clasifican en germacronalidas, eremofilanidas, eudesmanolidas que son anillo 6/6 y son llamados perhidronaftalenos, xantonolidas, guaianolidas que son anillos 5/7 y son llamados perhidroazulenos. Las pseudoguaianolidas se diferencian de estas últimas por un cambio del metil del C<sub>4</sub> A C<sub>5</sub>.

Las lactonas se han aislado de varias plantas principalmente de miembros de la familia *Compositae* y son las responsables del sabor amargo de éstas, una especie produce un solo tipo de esqueleto con diversas alteraciones oxidativas. Sin embargo en géneros que se encuentran distribuidos ampliamente, algunas de sus especies pueden biosintetizar varios tipos de esqueletos(31 , 40 ).

La localización y concentración de lactonas sesquiterpénicas varía en cada caso y a lo largo del desarrollo de la planta, aunque se encuentran generalmente en las hojas; el porcentaje en peso seco varía de 0.01 a 0.8%.

La composición de estas lactonas sesquiterpénicas puede variar de una población a otra debido a causas genéticas o en plantas de la misma población dependiendo del periodo de desarrollo de la planta ( 32 ).

#### **Actividad biológica de las Lactonas sesquiterpénicas**

Actividad citotóxica.- Se ha encontrado que todos los sesquiterpenos con actividad citotóxica conocida contienen una función lactónica, todas excepto una son  $\alpha$   $\beta$ -insaturadas y que este grupo  $\alpha$   $\beta$ -etileno es exocíclico, ( 33 ). La presencia de un doble enlace exocíclico conjugado a la  $\gamma$ -lactona es esencial para la citotoxicidad debido a que los compuestos con dobles enlaces endocíclicos dan aductos inestables con la cisteína ( 34 ); posteriormente, se descubrió que el grupo verdaderamente activo es  $O=CCH=CH_2$ , el cual puede estar formando parte de una lactona o una cetona ( 35 ). Esto nos lleva a ver la importancia del grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona para la actividad citotóxica de las lactonas sesquiterpénicas y nos sugiere el modo de acción de estos compuestos que consiste en reaccionar con grupos nucleofílicos de compuestos biológicamente importantes como lo pueden ser grupos sulfhidrilo, amino o hidroxilo ( 36 ); se ha demostrado que las lactonas sesquiterpénicas forman productos estables con el grupo sulfhidrilo de la cisteína y de algunas enzimas como la fosfofructocinasa, una enzima con varios grupos sulfhidrilos ( 37 ) y glucógeno sintetasa ( 38 ), provocando en ambos casos una disminución en la actividad lo cual se cree se debe a cambios conformacionales de las enzimas que provocan una alteración de su centro activo. Sin embargo los intentos de encontrar una correlación directa entre el rango de adición a cisteína y la citotoxicidad encontrada han fracasado ( 34 ).

Además existen otros grupos funcionales de las lactonas sesquiterpénicas que contribuyen a aumentar la citotoxicidad como lo son ésteres  $\alpha$   $\beta$ -insaturados por asistencia anquimérica,  $\alpha$ -metileno- $\delta$ -lactona y principalmente una  $\beta$ -ciclopentenona, sin

embargo estos grupos no proporcionan actividad citotóxica por sí solos; un factor que sí tiene una relación directa con la citotoxicidad es la lipofilicidad de la molécula; existen otros factores que también intervienen como impedimentos estéricos y electrónicos pero su efecto no ha sido lo suficientemente estudiado ( 34 ).

Se sabe que estos compuestos actúan con mayor efectividad sobre células tumorales, esto se debe a que una vez que se ha formado el aducto entre el grupo sulfhidrilo y la lactona sesquiterpénica por la reacción de Michael, los tioésteres formados son metilados menos eficientemente por los tejidos neoplásicos comparado con los normales; a esto se le llama la reacción de retro-Michael y es la principal vía de eliminación de estas sustancias en los tejidos, por lo cual los tejidos neoplásicos al no poder eliminar estas sustancias se vuelven más sensibles a ellas ( 30 ).

Antibióticos.- Los aceites de madera de varios árboles contienen lactonas sesquiterpénicas que inhiben la penetración en la piel de cercarias del trematodo *Schistosoma mansoni*. Se ha sugerido que la actividad squistosomicida de estas sustancias se debe a la inhibición de los grupos sulfhidrilo de las enzimas que permiten a la cercaria penetrar en la piel ( 40 , 41 ).

Se han encontrado dos grupos funcionales que determinan la actividad antibactericida de las lactonas sesquiterpénicas; estos son el grupo metileno exocíclico y un anillo de ciclopentenona  $\beta$ -insaturado ( 41 , 42 ).

Las bacterias gram ( + ) son más sensibles a las lactonas

sesquiterpénicas, este efecto se debe principalmente al anillo de ciclopentenona el cual no tienen efecto sobre las bacterias gram (-); el grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ - lactona incrementa la acción de la ciclopentenona y puede tener efecto por sí solo ( 42, 43 ).

De entre todos los tipos de lactonas sesquiterpénicas que se han ensayado el que más frecuentemente tiene actividad antibactericida son las eudesmanolidas y el tipo de lactona con menor actividad son las pseudoquaianolidas.

El que halla reacciones entre los grupos funcionales de ciclopentenona y metilenos exocíclicos conjugados al anillo lactónico con los grupos tioles de la cisteína de proteínas sugiere que la actividad bactericida de las lactonas sesquiterpénicas pueda ser debida a reacciones de este tipo. Sin embargo el hecho de que ciertas lactonas sin los grupos anteriores sean activas demuestran que existen otros factores que juegan un rol importante en la actividad bactericida de estos compuestos ( 43 ).

Alergenos.- Se ha encontrado que las lactonas sesquiterpénicas constituyen los principios activos de diversas plantas causantes de dermatitis de contacto atópica. este tipo de dermatitis solo la sufren aquellas personas que han adquirido una sensibilidad inmunológica especial contra estas sustancias tras un contacto previo con estas. Esta sensibilidad esta mediada por linfocitos T previamente sensibilizados ( hipersensibilidad tipo IV ).

Las lactonas sesquiterpénicas debido a su bajo peso molecular normalmente no serian antigénicas. sin embargo estos compuestos pueden atravesar la piel y pueden conjugarse mediante enlaces covalentes o no covalentes con proteínas y volverse de esta manera

antigénicos ( haptenos ). Este mecanismo de acción condiciona las características estructurales que debe tener la lactona sesquiterpénica para ser antigénica.

Una vez que se ha formado este complejo hapteno-proteína, éste puede activar el mecanismo inmunológico y de esta manera quedar los linfocitos T sensibilizados, los cuales en un segundo encuentro reconocerán de una manera específica el mismo complejo hapteno-proteína y al hacerlo liberaran linfocinas y otros mediadores que provocarán los síntomas de la dermatitis de contacto atópica o por alergia ( 44 , 45 , 46 ).

Se conocen alrededor de 80 lactonas sesquiterpénicas con actividad alérgica con al menos tres tipos de esqueletos carbocíclicos: eudesmanolidas, germacranolidas y pseudoguaianolidas las cuales se encuentran en varias plantas.

Todas las lactonas sesquiterpénicas alérgicas contienen un grupo funcional  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona el cual parece ser un requisito inmunológico necesario para provocar la dermatitis de contacto atópica, lo cual se debe a que este grupo le permite a la lactona sesquiterpénica formar el conjugado hapteno-proteína necesario para producir la respuesta inmunológica ( 47 ), la otra parte de la molécula parece regular el reconocimiento por parte del sistema inmunológico. Otro factor importante es la lipofilicidad ya que esta va a determinar la penetración de la sustancia en la piel. Se ha encontrado que compuestos biosintéticamente más simples como la custonalida son sensibilizadores más potentes.

Otro grupo que contribuye a la alergenidad es la  $\beta$ -ciclopentenona el cual al igual que el  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona puede actuar como agente alquilante y unirse a grupos sulfhidrilo sin

embargo la reacción en este caso es más lenta ( 45 ), aunque no existe un estudio que demuestre una correlación entre la actividad alérgica y reactividad frente a la  $\beta$ -ciclopentanona.

Un individuo puede presentar reactividad cruzada con varias lactonas sesquiterpénicas una vez que ha sido sensibilizado para una de ellas, esta reactividad cruzada puede darse incluso entre lactonas sesquiterpénicas con diferentes esqueletos carbocíclicos. Los patrones de reactividad cruzada varían según el individuo pero en general se observa que personas altamente sensibilizadas muestran un rango más amplio de reactividad que las personas débilmente sensibilizadas.

Defensa contra insectos.- Uno de los postulados de la moderna teoría de coevolución planta-insectos es que la mayoría de las plantas tienen que defenderse de los insectos con su metabolismo secundario. Varias lactonas sesquiterpénicas de plantas del género *Compositae* han sido implicadas como preventores de la alimentación de insectos de plantas, además se sabe que estas sustancias imparten un sabor amargo a las plantas lo cual las hace desagradables a algunos insectos; estas sustancias se encuentran generalmente en aquellas partes de la planta que están creciendo activamente como son la parte superior de las hojas, raíces, etc. Un factor que ayuda a este proceso es un latex pegajoso. Otro efecto observado es que estas lactonas sesquiterpénicas pueden disminuir el crecimiento larval de varios insectos ( 45 , 49 ).

Envenenamiento de vertebrados.- El envenenamiento por plantas de la familia *Compositae* está bien documentado en la literatura. Uno de

estas lactonas sesquiterpénicas la hymenovina afecta a las ovejas produciendo perdidas millonarias en Texas( 40 ). Un envenenamiento similar se observa en Sudafrica con las plantas *Geigeria sp.* entre las numerosas lactonas sesquiterpénicas encontradas en este género esta la ivalina la cual resulta tambien tóxica para los cueros ( 50 ).

Otro efecto diferente a su toxicidad es la de impartir un sabor amargo a la leche de las vacas que han consumido estas plantas lo que provoca que la leche sea intomable ( 40 ).

Reguladores del crecimiento de plantas.- Hay dos tipos de compuestos que regulan el crecimiento de las plantas: hormonas vegetales y otros compuestos cuya acción no es tan específica y que en algunos casos se forman a través del metabolismo secundario de ciertas plantas: a estas últimas se deben las propiedades fitotóxicas de ciertos exudados de plantas, las cuales contienen una mezcla compleja de terpenos, fenoles, etc. y que tienen un efecto negativo sobre el metabolismo celular especialmente respiración y mitosis ( 51 ).

Se sabe que los monoterpenoides son los principales componentes de los aceites esenciales de varias plantas y muchos de estos terpenoides incluyendo a las lactonas sesquiterpénicas han sido identificado como inhibidores del desarrollo de muchas plantas ( 31 , 52 ).

La inhibición producida por las lactonas sesquiterpénicas se caracteriza porque la planta afectada puede responder, una vez lavada, a las auxinas como el indol-3-acético por lo cual se piensa que estas sustancias pueden afectar la elongación de la membrana (

53 , 54 ).

Se ha encontrado que la acción reguladora de estas sustancias es completamente inhibida cuando se agrega al medio cisteína o cuando se reduce el grupo metileno exocíclico por lo cual se cree que el grupo  $O=CCCH_2$  es también importante para esta actividad. Este grupo junto con el anillo de ciclopentenona pueden ser vistos como agentes alquilantes que actúan sobre nucleófilos biológicos inhibiendo de esta manera la actividad metabólica, se ha demostrado que estos compuestos no alquilan el DNA y por lo tanto no actúan de esta manera ( 55 ).

En México se ha estudiado el efecto de las lactonas sesquiterpénicas en diversas plantas del estado de Veracruz con el fin de determinar la importancia de estos compuestos en los patrones de vegetación de la zona ( 56 ).

Otros efectos.- Ciertas lactonas sesquiterpénicas causan aberraciones cromosomales en células de ovario de hamster ( CHO ) y por lo tanto se cree que el núcleo es el blanco de estos compuestos . Al igual que en los casos anteriores, se vio que todos los compuestos tóxicos tenían un grupo  $O=CCCH_2$  y por ende pueden unirse a grupos nucleofílicos de las proteínas responsables de la mitosis por una reacción de Michael; se encontró que hay otros grupos que aumentan la toxicidad como la  $\beta$ -ciclopentanona el cual tiene un mecanismo de acción similar ( 57 ).

Las lactonas sesquiterpénicas de *Galigera aspera* entre las que se encuentra la ivalina son inhibidoras de la respiración mitocondrial y del consumo de fosfato; el sitio de inhibición se encuentra en los complejos I y II de la cadena de transporte de



electrones y en el complejo colina deshidrogenasa ( 58 ).

Ciertas lactonas sesquiterpénicas tienen acción bio-antimutagénica; este efecto parece deberse a la reactividad del grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona el cual tiene el mecanismo de acción ya descrito ( 59 ).

Los efectos anteriores nos demuestran la importancia de las lactonas sesquiterpénicas como aleloquímicos.

El término alelopatía fue acuñado por Molisch para referirse a interacciones bioquímicas entre todos los tipos de plantas incluyendo a los microorganismos, esta definición fue cambiada por Rice, para el cual alelopatía es cualquier efecto directo o indirecto de una planta o microorganismo en otro a través de la producción de compuestos que escapan al medio ( 60 ); este último punto es muy importante ya que permite separar a la alelopatía de la competencia, ambos términos quedan englobados en el término influencia.

La manera en que estos compuestos abandonan la planta son: volatilización, exudado de las raíces, extracción de químicos hidrosolubles de las partes superiores de las plantas y por descomposición de las mismas plantas.

Los compuestos aleloquímicos existen en una gran variedad de estructuras químicas, siendo la mayoría productos del metabolismo secundario de las plantas principalmente de la vía del Shikimato; los principales grupos son: a.- compuestos alifáticos, b.- lactonas insaturadas, c.- ácidos grasos y lípidos, d.- glicósidos cianogénicos, e.- terpenoides, f.- compuestos aromáticos.

En base a su efecto y el organismo que lo produce los compuestos aleloquímicos se clasifican en:

Fitotóxica.- inhibidor producido por plantas superiores efectivo contra otras plantas

Marasmina.- compuesto producido por microorganismos efectivo contra las plantas

Colina.-es un inhibidor químico producido por una planta superior efectivo contra los microorganismos.

Antibióticos.- es un inhibidor producido por un microorganismo y que actúa sobre microorganismos.

Existen varios factores que afectan la efectividad de los aleloquímicos, entre ellos está el tipo de suelo el cual determina la cantidad de compuesto retenido en él y la descomposición del compuesto lo cual puede estar mediado por microorganismos o por procesos químicos.

Es importante conocer que la mayoría de los efectos alelopáticos son el resultado de la acción combinada de varios compuestos lo cual provoca un efecto a una concentración menor de la encontrada cuando se ensaya cada uno de los compuestos por separado.

Los compuestos aleloquímicos pueden actuar a nivel molecular de diferentes maneras dependiendo esto de su estructura química y otros factores; los mecanismos de acción más comunes son: inhibición de la división celular y su elongación, inhibición de la acción producida por ciertas hormonas, unión a grupos sulfhidrilo de ciertas enzimas, inhibición del consumo de minerales, alteración de la permeabilidad de la membrana, inhibición de la síntesis de proteínas, de la de hemoglobina, e inhibición de la respiración y la fotosíntesis.etc. ( 60 , 61 ).

Los compuestos aleloquímicos son muy importantes en la

agricultura para la planeación de los cultivos, en la fitopatología, y principalmente en la ecología pues contribuyen a determinar los patrones de vegetación de ciertos lugares. Además de ayudar a explicar varios fenómenos que se observan en la naturaleza.

#### Aislamiento

En este trabajo se escogieron dos lactonas sesquiterpénicas la ivalina y la zaluzanina C para ver su efecto en la reacción de Hill y en la fotofosforilación.

La ivalina fue identificada por primera vez a partir de los extractos clorofórmicos de flores y hojas de *Iva microcephala* e *Iva tauricarpa* ( 62 ), dos plantas que pertenecen a la familia *Compositae*: estas plantas se encuentran todo el año en la costa suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica, la ivalina ha sido identificada en otras plantas de la familia *Compositae* como en las hojas de *P. leavigata* ( 63 ), extractos etanólicos de *Zaluzania triloba*, ( 64 ) y en *Serratulia latifolia* ( 65 ).

La zaluzanina C fue aislada por primera vez de *Zaluzania triloba* y *Zaluzania augusta* ( 64 ) las cuales son unas hierbas de la familia *Compositae* que se caracterizan por su sabor amargo y que se encuentran ampliamente distribuidas en el altiplano mexicano.

La estructura de ambos compuestos fue dilucidada utilizando espectros de resonancia magnética nuclear, infrarojo, ultravioleta, etc. Además de reacciones químicas para producir cambios en la estructura de la molécula e inferir de esta manera grupos funcionales por cambios en los espectros originales.

### Objetivos de Trabajo

Objetivo general: Encontrar el efecto de dos lactonas sesquiterpénicas: ivalina y zaluzanina C sobre la cadena de transporte de electrones en cloroplastos.

Objetivos particulares:

- a).- Aplicar técnicas polarográficas y potenciométricas para medir el transporte de electrones
- b).- Utilizar diversos tipos de inhibidores, donadores y aceptores de electrones para medir los efectos de las lactonas sesquiterpénicas en las reacciones parciales del transporte de electrones.

## MATERIALES Y METODOS.

### Aislamiento de cloroplastos

Para este trabajo se utilizaron cloroplastos sin doble membrana exterior ( clase II ), los cuales fueron aislados a partir de hojas de espinaca ( *Spinacea oleracea* ). Estas hojas deben tener bajo contenido de almidón y oxalato de calcio ( reconocidos por un anillo blanco en el botón de cloroplastos despues de la centrifugación ). Para ello se pueden seguir dos opciones: en la primera de ellas las plantas se hacen crecer idealmente en dias cortos en luz brillante; en la otra las hojas obtenidas de plantas adquiridas en el mercado son lavadas, se quitan las hojas maltrechas y se guardan en el refrigerador en una bolsa de plástico con algo de agua durante toda la noche ( 00 ).

Para iniciar el ensayo se cortan las hojas seleccionandolas de acuerdo a su tamaño, color, etc. Se les quita la vena central y la parte superior e inferior de la hoja; debido a que las plantas pueden adaptarse a distintas condiciones de luz alterando la composición de las membranas de sus tilacoides a lo largo de la hoja( 6 ); de esta manera se obtiene una población de cloroplastos más homogénea y representativa. Despues se cortan en trozos de aproximadamente  $1\text{cm}^2$ .

El método utilizado para la obtención de los tilacoides es la destrucción mecánica, el cual es un método rápido, económico y se obtiene un alto porcentaje de cloroplastos estables.

Se colocan los trozos de la hojas de espinaca en un vaso de licuadora previamente enfriado y se le agregan 200ml. de medio de aislamiento frío el cual contiene 400mM de Sacarosa, 50mM de  $\text{MgCl}_2$ .

10mM de KCl y 30mM de tricina ajustado a pH 8 con un potenciómetro Orion Research Model 701A1 Digital. Entonces se licúan las hojas por 5 segundos a velocidad máxima y se filtra a través de seis capas de gasa o muselina para eliminar desechos celulares gruesos. El filtrado es centrifugado a 5000rpm por 3 segundos a 4°C en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B ( Dupont Instruments ) con un rotor Sorvall tipo SS-34; de esta manera obtenemos cloroplastos intactos; el paquete de cloroplastos se resuspende con la ayuda de un pincel. Estos cloroplastos se guardan en un tubo de vidrio previamente enfriado y cubierto con papel aluminio para evitar la fotooxidación de los cloroplastos. Los cloroplastos sin doble membrana se obtienen en el momento del ensayo al colocarlos en un medio hipotónico que provoca la ruptura de la doble membrana. De esta manera se obtienen cloroplastos sin almidón y oxalato de calcio y con una actividad elevada y reproducible en cuanto al transporte de electrones.

#### Determinación de clorofila

La determinación de clorofila consiste en extraer la clorofila con un disolvente orgánico adecuado para medir su absorción y utilizar los coeficientes de absorción para los componentes de los pigmentos para calcular la concentración de clorofila.

Un disolvente orgánico no disuelve únicamente las clorofilas sino también los pigmentos accesorios como los carotenos; sin embargo esto no es problema en las plantas superiores, pues los carotenos absorben en la región azul pero no en la roja, por lo cual la medición se realiza en la región roja a unas longitudes de onda de 645 y 663 nm. ( 67 )

El método consiste en colocar 5ml de acetona al 80% en agua en tres tubos. Luego se agregan a dos de ellos 50µl de la muestra que queremos medir y se deja el último tubo como control. Se cubren inmediatamente los tubos con papel aluminio para evitar la foto-oxidación y se dejan incubar los tubos 5 minutos en hielo. Al terminar este periodo se centrifugan los tubos con la muestra a 3000rpm. en una centrifuga clinica para sedimentar las proteínas que han precipitado debido al tratamiento con acetona. Luego se lee la absorción de los problemas a unas longitudes de onda de 645 y 663 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65. Para calcular la concentración de clorofila se utiliza la siguiente ecuación.

$$CHl_{10}(\mu\text{gml}^{-1}) = 20.29A_{663} + 8.05A_{645} \quad (66)$$

Esta es la cantidad de clorofila en el tubo; para calcular la cantidad que tenemos que agregar para los ensayos se tienen que hacer las siguientes operaciones.

$$CHl_{10} \times 5\text{ml de acetona} = CHl_{10}(\mu\text{g})$$

Esto corresponde a la cantidad de clorofila que hay en los 50µl. de muestra que se agregaron para hacer el ensayo.

En los ensayos para medir el transporte de electrones se usa comunmente una concentración de clorofila en el medio de  $20\mu\text{gml}^{-1}$ . En los ensayos realizados se utilizó siempre un volumen de 3 ml por lo cual en cada ensayo se agregan  $60\mu\text{g}$  de clorofila.

Entonces si tenemos que  $CHl_{10}(\mu\text{g})$  corresponde a 50µl  $60\mu\text{g}CHl_{10}$  corresponde a  $x \mu\text{l}$  a agregar en el tubo de ensayo.

### Compuestos

En este trabajo se caracterizaron dos compuestos la ivalina y

la zaluzanina C. Después de varias pruebas se llegó a la conclusión de que las soluciones stock de la ivalina y la zaluzanina C deberían de tener una concentración de 133.3mM Para su preparación se pesaron 0.02976g de ivalina (PM=248) y 0.02952g de zaluzanina C (PM=246) y se disolvieron en la menor cantidad de N,N-dimetilformamida llevándose a un volumen de 0.9ml. con agua, para dar de esta manera la concentración de 133.3mM

De estas soluciones stock se agrega el compuesto a la mezcla de reacción en volúmenes crecientes que van de 20 $\mu$ l a 150 $\mu$ l La concentración final de los compuestos en el medio de reacción se calcula de la siguiente manera.

133.3mM=40 $\mu$ moles en 300 $\mu$ l $\times$  $\mu$ l agregados=x $\mu$ moles en 3ml del medio. De aquí se puede calcular fácilmente la concentración en el medio de reacción.

Efectos no deseados del disolvente sobre los tilacoides fueron también explorados haciendo un control en el cual se agregó el disolvente en las cantidades usualmente utilizadas en los ensayos sin que se vieran cambios significativos en la actividad normal de los tilacoides.

Tanto la ivalina como la zaluzanina C se descomponen lentamente en compuestos más polares debido probablemente a que se abre el anillo lactónico por lo cual los dos compuestos se ensayan en el momento en que fueron preparados ( 50 ).

#### **Bomba de Protones**

En la fotosíntesis durante el transporte de electrones de agua a NADP<sup>+</sup>, los tilacoides bombean protones hacia su interior para formar de esta manera el gradiente electroquímico necesario para la formación del ATP, este fenómeno provoca una alcalinización del



medio circunvecino al tilacoides que puede ser medido por técnicas potenciométricas y evaluar de esta manera la capacidad de los tilacoides de formar el gradiente electroquímico.

Para ello se agregan a una cubeta 5ml del medio de bomba de protones el cual contiene 5mM de  $MgCl_2$ , 100mM de  $KCl$  y 1mM de tricina ajustado a un  $pH=8$ . La cubeta debe tener una camisa para aislar el medio de reacción del calor pues un cambio de  $1^{\circ}C$  provoca una disminución en el  $pH$  producido de 0.02 ( 69 ).

Para medir el cambio de  $pH$  se utiliza un microelectrodo de combinación Cole Parmer con un potenciómetro Corning Model 12 utilizado en escala expandida y esto conectado a un registrador Beckman colocado a 0.01volts y una velocidad de 1 pulgadamin<sup>-1</sup>.

La cubeta con el medio de reacción se coloca sobre una base de agitación magnética Sybron Thermolyne type 1000 para mantener la mezcla de reacción homogénea. Una vez colocado el medio de bomba de protones se debe ajustar el  $pH$  de este lo más cerca posible de 8 con la ayuda de  $KOH$  y  $HCl$ . Entonces se conecta el registrador y se agrega la cantidad adecuada de cloroplastos para tener una concentración de 20 $\mu gml^{-1}$ . Se espera a que la señal que da el registrador se estabilice y se ilumina la suspensión de cloroplasto con luz actínica proporcionada por un proyector GAF-2660; esta luz se hace pasar a través de un lente de Izawa que consiste en un recipiente de vidrio con  $CuSO_4$  al 5% el cual sirve para usar la longitud de onda adecuada, como filtro contra el calor y para concentrar el haz luminoso y tener así mejores rendimientos.

Se deja transcurrir entonces un periodo de poco más de un minuto y entonces se apaga la fuente luminosa y poco después el registrador. Se lava la celda tres veces con agua deionizada y se

repite la operación. El ensayo anterior sirve como control para medir la actividad normal de los cloroplastos. Cuando se agregan los compuestos a ensayar, estos se agregan con microjeringa antes de agregar los cloroplastos.

Para calibrar el sistema se agrega una cantidad conocida de KOH 0.01N con la mezcla de reacción completa ya que los cloroplastos tienen capacidad buffer la cual incluso depende de si haya luz o no ( 69 , 70 ).

Para medir síntesis de ATP se utiliza el mismo procedimiento pero se agrega los sustratos de la reacción, es decir ADP y fosfato con la ayuda de microjeringas o pipetas automáticas.

Se agregan al medio de reacción 15µl de una solución de ADP que tiene una concentración 100mM lo cual da una concentración en la cubeta de 0.5mM. Para el fosfato se agregan a la cubeta 15µl de una solución de fosfato con una concentración de 300mM para tener un concentración de fosfatos en el medio de 1.5mM.

El bombeo de protones da una curva que asciende rápidamente coincidiendo esto con la formación del gradiente electroquímico. Una vez que éste ha sido formado el trazo de la curva llega a un valor constante. Para calcular la velocidad de esta bomba de protones se mide la altura del trazo en un periodo de un minuto. Y se toma en cuenta la calibración efectuada con el KOH.

-Calibración  $0.01\mu\text{eqml}^{-1} \times 15\mu\text{l} \text{ agregados} = 0.15\mu\text{eqKOH}$  --- X Altura  $x\mu\text{eqKOH}$  --- Y altura ensayo

-Cálculo de la velocidad de la bomba de protones

Y altura en el ensayo  $\text{min}^{-1} \times 0.15\mu\text{eqKOH} \times \text{altura}^{-1} \times 60 \text{min.} = 1\text{hr.}^{-1} \text{mgchlo}^{-1} = \text{velocidad de la bomba de protones en } \mu\text{eqKOH hr}^{-1} \text{mgchlo}^{-1}.$

En la síntesis de ATP se obtiene un trazo diferente debido a que lo que aquí se mide es la reacción de formación de ATP. Que es  $\text{ADP}^{3-} + \text{HPO}_4^{-} + \text{H}^+ = \text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O}$ .

Por lo que la alcalinización producida en el medio se debe a la desaparición de un protón por la reacción de fosforilación.

El trazo que se obtiene en la síntesis de ATP comienza con una rápida alcalinización producida por la formación del gradiente electroquímico. Durante este período no hay formación de ATP; una vez que el gradiente electroquímico se ha formado comienza la fosforilación; esto se ve en la curva porque a diferencia de la curva de bomba de protones la curva de síntesis de ATP no llega a un valor estable sino que comienza a aumentar de manera lineal ( 70 , 24 ). Esta es la parte del trazo que se toma en cuenta para hacer los cálculos de velocidad de formación de ATP, siguiendo un procedimiento similar al de la medición del bombeo de protones aunque las unidades cambian a  $\mu\text{eqATP Hr}^{-1}\text{mgchlo}^{-1}$  pues la relación estequiométrica en la reacción entre protones y ATP es de 1:1 (70).

#### Transporte de electrones

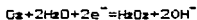
Durante el transporte de electrones se mide la reacción de Hill, la cual consiste en una producción de oxígeno dependiente de luz en cloroplastos aislados. Esta requiere la reducción de algún aceptor de electrones adecuado representado por A en la ecuación:  
 $\text{H}_2\text{O} + \text{A} = \text{AH}_2 + 1/2\text{O}_2$

De tal manera que para medir el transporte de electrones se puede medir el oxígeno producido o la reducción de un aceptor de electrones por medio de una técnica espectrofotométrica; sin embargo generalmente se mide el oxígeno producido a menos que se

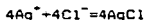
utilice un dador de electrones diferente al agua o se dude de la estequiometría de la reacción.

El transporte de electrones en la fotosíntesis se midió utilizando una técnica polarográfica por medio de un electrodo de oxígeno tipo Clark.

La medición eléctrica del oxígeno es posible porque éste es reducido en el cátodo de platino en donde se efectúa la reacción:



Con un ánodo de plata y KCl como electrolito de soporte, la reacción en el ánodo es:



La corriente eléctrica resultante es proporcional a la concentración de oxígeno en la muestra. Una condición para que la reacción se lleve a cabo es que el cátodo se mantenga a  $-0.05$  volts con referencia al ánodo, con el tiempo de respuesta del aparato limitado por la difusión del oxígeno de la mezcla de reacción al cátodo. ( 71 ).

El tiempo de respuesta disminuye incrementando el área del cátodo en contacto con la muestra, pero esto también incrementa la cantidad de oxígeno consumida por el cátodo por sí mismo. Para mediciones continuas un cátodo pequeño se prefiere para que la cantidad de oxígeno consumida por él sea muy pequeña respecto a la que medimos durante el transporte de electrones ( 72 ).

En esta medición se debe tener un buen control sobre la temperatura ya que la solubilidad del oxígeno es dependiente de ella; además se tiene que mantener la mezcla de reacción a

temperatura constante pues ésta afecta los procesos que estamos midiendo: el transporte de electrones en tilacoides aislados es más estable a 15°C a pesar de que los cloroplastos intactos trabajan mejor entre 20-25°C ( 71 , 73 ).

En el electrodo tipo Clark se cubrieron los electrodos con una membrana permeable al oxígeno pero casi impermeable a otras sustancias en solución. las membranas más utilizadas son las de teflón y polietileno. Esto permite aislar el electrodo química y electricamente pudiéndose agregar muchas sustancias sin temor a que reaccionen en el cátodo.

En el electrodo de Clark la presión de oxígeno dentro de la membrana es 0, esto provoca que el oxígeno de la muestra difunda a través de la membrana con una fuerza igual a la presión de oxígeno fuera de la membrana por lo cual el cátodo mide la presión de oxígeno en la muestra.

El electrodo de oxígeno se conecta a un oxímetro YSI model 5300 el cual controla el voltaje polarizante entre el ánodo y el cátodo y que debe estar entre 650-700volts; también aquí se encuentran los controles para colocar la escala y el cero en el registrador con un input 1mV.

Para ajustar la escala se coloca en la cubeta de reacción agua destilada y se deja que exista un intercambio libre entre el agua y el aire, se introduce el electrodo de Clark y se llevan los controles hasta 80% oxígeno entonces empieza una desviación; cuando se termina se ajusta la escala al 100% de oxígeno y esta lectura corresponderá a la concentración de oxígeno que hay en agua destilada saturada de aire a las condiciones de presión y temperatura en que se hizo la operación ( 73 ).

Para realizar las mediciones se utilizó un sistema similar al que se uso en la bomba de protones.

Para saber como actúa una sustancia se mide el transporte de electrones bajo tres condiciones diferentes: basal, fosforilante y desacoplado, ésto se logra alterando en cada caso la mezcla de reacción.

En el transporte de electrones basal se utiliza un medio que contiene 100mM de sacarosa, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de KCl y 15mM de tricina ajustado a pH=8 .Para efectuar el ensayo de cadena de transporte se agrega al medio metilviológeno, el cual es un aceptor de electrones. Esto se lleva a cabo por la reacción:



pero el oxígeno es consumido simultaneamente por una combinación de una reacción de autooxidación y dismutación.



la suma de estas ecuaciones es un caso especial de la reacción de Hill llamada la reacción de Melher



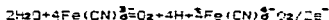
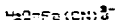
la cual da la estequiometría usual de la reacción de Hill. Para asegurar esta estequiometría se debe de evitar la presencia de agentes reductores como el ascorbato o manganeso que interfieren con el proceso de dismutación, e inhibir la actividad de la catalasa endógena ( 75 ).

El metilviológeno tiene un potencial red-ox similar a la ferredoxina y la puede reemplazar en ciertas reacciones enzimáticas; su bajo potencial re-ox asegura su reducción en el PSI y su rápida autooxidación a la forma reducida. Debido a esto el MV es menos susceptible a contribuir a pasos limitantes no

deseados incluso en reacciones PSI muy rápidas y por lo tanto es menos susceptible de permitir flujo de electrones cíclico alrededor de PSI, también es menos susceptible a inactivación por reactivos y condiciones ( 74 ).

Para medir el transporte de electrones basal se agregan 3ml de este medio a la cubeta y se esperan 5 minutos para que se establezca la temperatura del medio de reacción con la del baño, entonces se agregan los cloroplastos para tener una concentración de clorofila de 20µg/ml. Se coloca el electrodo de Clark en forma adecuada para impedir intercambios de aire con el medio externo y se enciende el agitador. Se espera a que el oxímetro dé una lectura cercana a 100% y entonces se aplica la luz actínica de un proyector pasada a través de un lente de Izawa. Se deja transcurrir un tiempo de un minuto. Este ensayo sirve como control del transporte de electrones basal en condiciones normales y en los siguientes ensayos se agregan los compuestos a probar. Para medir el transporte de electrones fosforilante se agrega a la mezcla de reacción ADP y fosfato en cantidades iguales a los de la síntesis de ATP y para medir el transporte de electrones desacoplado se agrega 60µl de anonio de una solución stock con una concentración de 250mM lo cual da una concentración en la mezcla de reacción de 50mM. Siguiendo en todos los casos el mismo procedimiento.

Para calibrar el sistema se agrega una cantidad conocida de ferricianuro de potasio 8.91mM. Las reacciones que ocurren durante la calibración son:



y altura x pi e q e^- / altura cal x 60 min / 1 hora x mg cl o^-1.

Una vez que se han hecho los ensayos anteriores se puede saber el efecto de los compuestos probados en la velocidad del transporte de electrones. el siguiente paso consiste en identificar en que parte de la cadena de transporte de electrones están afectando los compuestos. Esto se logra midiendo determinadas partes de la cadena de transporte de electrones mediante la utilización de inhibidores específicos de la cadena de transporte de electrones y donadores y aceptores de electrones artificiales, también específicos.

### **Reacciones Parciales Del Transporte de Electrones**

Los principales inhibidores utilizados en este trabajo fueron el DCMU, el cual se une a un péptido de una proteína localizada en el lado reductor del PSII induciendo un cambio conformacional que afecta el potencial re-dox de Q; este compuesto a altas concentraciones puede tener un efecto desacoplante por lo cual debe utilizarse en concentración de  $1\mu\text{M}$ ; el DBMIB inhibe la oxidación de la plastoquinona ya que compete con el plastoquinol por el sitio oxidante de la proteína de Rieske y a altas concentraciones puede inhibir la reducción de la plastoquinona, por lo cual se utiliza en concentraciones de  $1\mu\text{M}$ ; el último inhibidor utilizado fue un tratamiento con tris  $\text{pH}=6,0,8\text{M}$  que elimina la actividad de la enzima que efectúa la fotólisis del agua ( 75 ).

Las primera reacciones parciales del transporte de electrones que se midieron fueron las del PSII que va de agua a DAD o reacción tipo III según la clasificación de Trebst( 76 ) tabla 1. Para medir esto se utilizó el mismo sistema y medio que para el transporte de

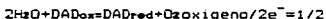


Tabla 1 Reacciones parciales de la cadena de transporte de electrones( 78 ).

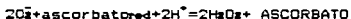
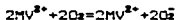
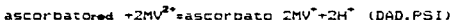
Reacción	transporte de e <sup>-</sup>	Ac/Don	Inhibidor	medición
Tipo 1	H <sub>2</sub> O>NADH	H <sub>2</sub> O/NADH	-----	espectrofotometría
Tipo 2	H <sub>2</sub> O>MV	H <sub>2</sub> O/MV	-----	evolución de O <sub>2</sub> .
Tipo 3	H <sub>2</sub> O>PG	H <sub>2</sub> O/DAD	DBMIB	evolución de O <sub>2</sub> .
Tipo 4	PG>MV	DAD/MV	DCMU	evolución de O <sub>2</sub> .
Tipo 5	P680>MV	Asc/MV	-----	evolución de O <sub>2</sub> .
Tipo 6	P680>PG	DPC/DCPIP	DBMIB	espectrofotometría.

\* Ver apéndice para conocer el significado de las abreviaturas.

electrones con la excepción de metilviológeno y en el momento del ensayo se agregan 1µl de DBMIB de una solución stock con una concentración de 3mM en etanol. Como aceptor de electrones se utiliza DADox en una concentración final de 100µM. Para medir el transporte de electrones el DAD da sus electrones al ferricianuro el cual tiene que estar en una concentración del triple que la del DAD. La reacción que aquí se efectúa es:



Para medir el PSI (DAD=MV) se utiliza el mismo sistema que para medir el transporte de electrones basal pero se agrega DCMU, el cual elimina la actividad del PSII. Este compuesto se agrega a partir de una solución stock de 5mM en etanol. Aquí también se agrega DAD pero ahora actuará como donador de electrones; para mantenerlo reducido se agrega también ascorbato para tener una concentración final de 300µM, el aceptor de electrones será el MV. En este sistema la relación oxígeno/2e<sup>-</sup> es de 2, este valor se obtiene porque el ascorbato reduce al intermediario superóxido de la reducción del oxígeno en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a la vez de funcionar como donador alternativo al agua; esto debe tomarse en cuenta en el cálculo de la velocidad del transporte de electrones ( 74 ).



Por lo cual la reacción queda como:



Esta es la reacción tipo IV de Trebst.

Con estas pruebas se puede saber en que fotosistema actúa el compuesto ensayado y con base en esto se analizan tramos más cortos

de la cadena de transporte de electrones, por lo cual se mide el transporte de agua a silicomolibdato ( SiMo ) el cual acepta electrones a nivel de Oa; este compuesto actúa cambiando propiedades de la membrana incluyendo a Cfi, por lo cual el transporte de electrones y la fosforilación no están acoplados, para evitar esto se agregan cantidades bajas (100µM). El transporte de electrones de agua a SiMo es inhibido por la presencia de desacoplantes a pH 9 ( 77 ). Como inhibidor se utiliza el DCMU y se efectúan los mismos pasos de los métodos anteriores.

Para medir la cadena de transporte de electrones de P680 a Oa el primer paso consiste en eliminar la actividad de la enzima que efectúa la fotólisis del agua. Como ya se dijo, esto se logra tratando los cloroplastos obtenidos, con TRIS pH=8 0.8M durante 15 minutos. El TRIS se agrega para tener una concentración de cloroplastos de 25µg/ml y se tiene la ventaja de que los cloroplastos conservan la capacidad de fosforilar y con un transporte de electrones bajo control ( 78 ).

Para este sistema un problema es elegir cual es la pareja donador-aceptor de electrones, ya que debido a su cercanía en la escala re-dox pueden reaccionar entre sí; la pareja utilizada fue de DPC y DCPIP. A diferencia de los ensayos anteriores, el transporte de electrones se va a medir siguiendo la reducción del DCPIP el cual pasa de azul a incoloro. Se agrega al medio DBMIB como inhibidor, 0.2 mM DPC como dador de electrones en P680 y DCPIP para tener una concentración final de 0.1mM. Primero se toma una lectura inicial de la mezcla de reacción con todos sus componentes en la obscuridad y entonces se realiza el ensayo por 1.5 min y se toma la lectura de la absorbancia a 600nm ( 79 ) de la forma más

rápida posible, esto se compara con una lectura inicial; el blanco consiste en la mezcla de reacción sin DCPIP ( 80 ). Las lecturas se hicieron en un espectrofotometro Beckman DU-65.

Para calcular la velocidad del transporte de electrones se usó el coeficiente de extinción del DCPIP y se hicieron los siguientes cálculos:

$$vel = \Delta A / \epsilon \times l \times 1.5 \text{ min} \times 60 \text{ min} / \text{horaxl} / \text{chlomg/ml.}$$

En los cloroplastos el rango de flujo de electrones es controlado por el sistema de fosforilación, por lo cual se puede agregar magnesio, ADP y fosfato o como se hizo, agregando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para tener una concentración final de  $1\text{mM}$ ; de esta forma se obtiene una actividad máxima. Debido a esto también el pH óptimo de la fosforilación determina el pH óptimo del transporte de electrones el cual es de 8 ( 70 ).

Es importante hacer notar que los aceptores y donadores agregados pueden tener un efecto sobre el transporte de electrones y la fotofosforilación y con base en esto se clasifican en :

Clase I.- Se caracterizan por reducirse lentamente cuando no hay fosforilación, la adición de ADP y fosfato incrementa el rango 2 a 3 veces y se obtiene un rango de  $p/2e^-$  arriba de 1.3. Los desacopliantes incrementan el rango de reducción al máximo. ej: ferredoxina, ferriciauros, metilvioldgenos, flavinas etc.

Clase II.- Se reducen rápidamente independientemente de la fosforilación y la adición de los desacopliantes no afecta el rango de reducción. no hay formación de ATP. Estos compuestos aparte de ser aceptores o donadores actúan como desacopliantes y son ácidos débiles, solubles en lípidos en su forma protonada no ionizada. Por ejemplo el DCPIP.

Clase III.- Se reducen rápidamente independientemente de la fosforilación; los desacopliantes provocan poco aumento en el rango de reducción del aceptor, sin embargo se observa fosforilación al agregar ADP y fosfato ( 81 ).

## RESULTADOS

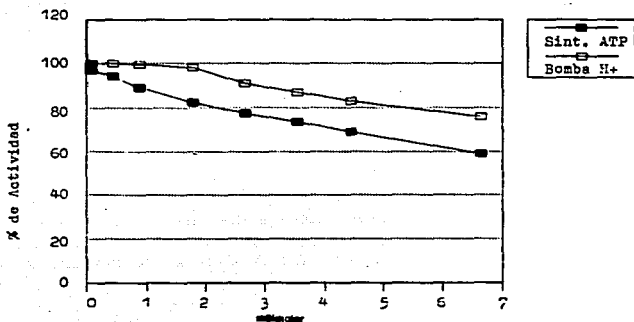
Para caracterizar el efecto de la ivalina y la zaluzanina C sobre la fotosíntesis *in vitro*, se empezó por ensayar su efecto sobre la síntesis de ATP y sobre la bomba de protones: como se muestra en las gráficas ( figs. 8,9 ) ambos compuestos inhiben parcialmente la fosforilación fotosintética y la bomba de protones asociada a la reducción del metilviológeno en la cadena de ox-red no cíclica; de los dos compuestos ensayados la zaluzanina C fue el más potente en inhibir ambas actividades pues tiene un  $I_{50}$  ( concentración que produce en 50% de inhibición ) de 4.4 mM para la síntesis de ATP y produce un 40% de inhibición en la bomba de protones con concentraciones mayores a 6.6 mM.; mientras que la ivalina necesita de concentraciones mayores para lograr los mismos porcentajes de inhibición que la zaluzanina C.

Una vez que se ha determinado que estos compuestos tienen cierta acción sobre las reacciones luminosas de la fotosíntesis descritas, se procedió a dilucidar cual es la acción de estos compuestos la cual podría ser:

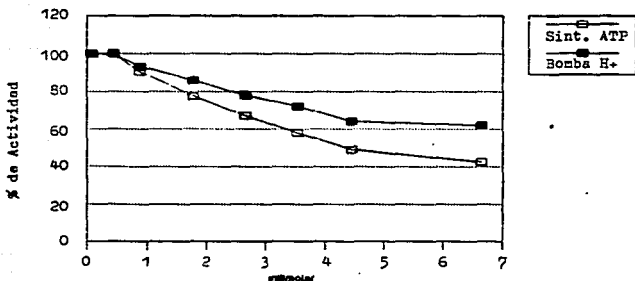
a).- Bloqueando el transporte de electrones. Estos reactivos inhiben la síntesis de ATP debido a que no se forma el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP. Ya que se encuentra bloqueada una enzima de oxido-reducción.

b).- Desacoplando la síntesis de ATP del transporte de electrones. Las sustancias que pueden incrementar la permeabilidad de los tilacoides a los protones, desacoplan la fosforilación del flujo de electrones. Los desacoplantes no inhiben la reacción de

**Fig. 8 Efecto de la ivalina sobre la síntesis de ATP y Bomba de protones fotosintética**



**Fig. 9 Efecto de la zaluzanina C sobre la síntesis de ATP y Bomba de protones fotosintética**



La mezcla de reacción para la bomba de protones contiene 5mM de  $MgCl_2$ , 100mM de KCl y 1mM de tricina (pH 8.0) y cloroplastos equivalentes a 60  $\mu$ l, esto en un volumen de 3ml. Para la síntesis de ATP se colocan 0.5mM de ADP y 1.5mM de fosfatos. Las condiciones del experimento como en materiales y métodos.

fosforilación en sí pero al eliminar el gradiente electroquímico necesario para que ésta se lleve a cabo, la síntesis de ATP se ve interrumpida. Bajo estas circunstancias el transporte de electrones ocurre a mayor velocidad debido a que la fosforilación acopla a la formación del gradiente electroquímico es la que regula la actividad del transporte de electrones.

c).- Bloqueando la reacción de fosforilación en sí misma: a estos compuestos se les llama inhibidores de la transferencia de energía. En contraste con los otros mecanismos, estos inhibidores bloquean la fosforilación y la porción del transporte de electrones que es una consecuencia del flujo de electrones unido a la fosforilación ( 82 ).

Para determinar el tipo de mecanismo de inhibición producido por estos compuestos, se midió su efecto sobre el transporte de electrones de agua a metilviológeno en distintas condiciones experimentales como son basal, fosforilante y desacoplado.

Se encontró que tanto la ivalina como la zaluzanina C inhiben principalmente el transporte de electrones desacoplado. Con la zaluzanina C se encontraron valores de  $I_{50}$  de 1.57 mM y para la ivalina de 4.7 mM. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos con la síntesis de ATP y la bomba de protones volviendo a ser la zaluzanina C el compuesto más activo en la inhibición. Sin embargo en el transporte de electrones desacoplado se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores, destacando el valor obtenido con la zaluzanina C. El transporte de electrones basal y fosforilante también fue inhibido por ambos compuestos pero con menor potencia que la observada en condiciones desacoplantes



Fig. 10 Efecto de la Ivalina sobre el transporte de electrones no cíclico de agua a metilviologen

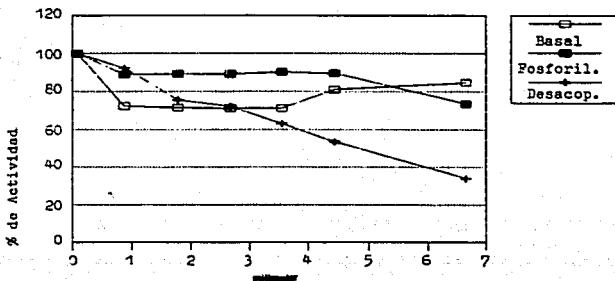
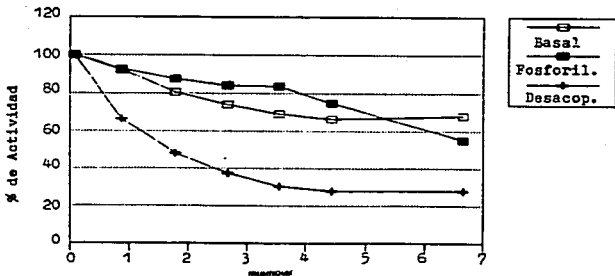


Fig. 11 Efecto de la saluzanina C sobre el transporte de electrones no cíclico de agua a metilviologen

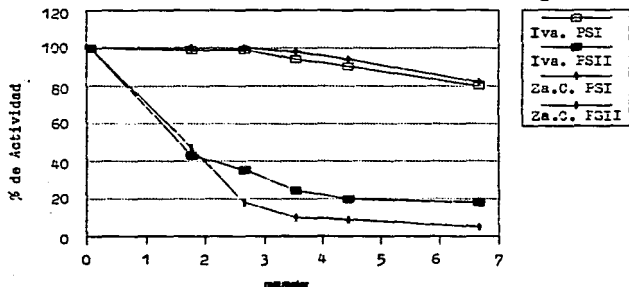


La mezcla de reacción del transporte de electrones consta 100mM de sacarosa, 10mM KCl, y 15mM de tricina (pH 8.0) y 50M de metilviologen como aceptor de electrones y cloroplastos equivalentes a 60  $\mu$ l. en un volumen de 3ml. Para el transporte de electrones fosforilante se agrega ADP y fosfatos en una concentración similar al ensayo de síntesis de ATP y para el transporte de electrones desacoplado se agrega 60 $\mu$ M de  $\text{NH}_2\text{OH}$ .

(fig.10,11). Estos datos sugieren que cuando el tilacoide está energizado se protege el sitio donde actúan la ivalina y la zaluzanina C, disminuyendo así el potencial de inhibición. Con estos datos se puede deducir que la ivalina y la zaluzanina C bloquean la cadena de transporte de electrones de la reacción de Hill. El siguiente paso consistía en conocer que sección de la cadena de transporte de electrones era el punto de acción de estos compuestos. Para ello se midió el efecto de estos compuestos sobre tramos específicos de la cadena de transporte de electrones utilizando una combinación apropiada de inhibidores, aceptores y donadores de electrones. El primer tramo medido fue el del transporte de electrones asociado al fotosistema I el cual va de DAD ( 2,3,4,5-tetrametil-p-fenilendiamina ) a metilviológeno; en esta sección el efecto de las lactonas sesquiterpénicas ensayadas fue limitado, alcanzándose porcentajes de inhibición muy bajos. 20% con 6.6 mM ( fig.12 ), lo cual no corresponde a la inhibición observada en los experimentos efectuados en toda la cadena de oxidación de la reacción de Hill, por lo que a continuación se midió el fotosistema II el cual va del agua al DAD. Los resultados muestran una inhibición significativa para ambos compuestos con una Iso de 1.4 mM para la ivalina y de 1.6 mM para la zaluzanina C. Es de notarse que a pesar de que la zaluzanina C tiene un valor menor de Iso, lo cual no coincide con los experimentos efectuados en toda la cadena de oxidoreducción, produce a concentraciones cercanas a 6mM, una inhibición mayor ( 95% ) que la ivalina ( 83% )(fig.12), lo cual si coincide con los primeros resultados; de lo anterior se deduce que el blanco de acción de estos compuestos está ubicado en

Fig. 12 Efecto de la ivalina y la zaluzanina C sobre el Transporte de electrones aciclico.

Fotosistema I ( DAD a MV ); Fotosistema II ( H<sub>2</sub>O a DAD )



La mezcla de reacción para medir el transporte de electrones de ambos fotosistemas consta del medio para medir el transporte de electrones desacoplado agregando en cada caso una pareja de donador/aceptor específica y un inhibidor específico; de acuerdo a la tabla 1 en materiales y métodos.

el transporte de electrones asociado al fotosistema II. Una vez que se sabe lo anterior se sigue la misma estrategia ensayando tramos más cortos de la cadena de redox dentro del fotosistema II. De acuerdo con lo anterior se midió el transporte de electrones de agua al silicomolibdato lo cual corresponde a un tramo menor al fotosistema II que va de  $H_2O \rightarrow O_2$ . Esta parte de la cadena de transporte de electrones es inhibida por estos compuestos con mayor intensidad que con la que inhibían el fotosistema II, pues se obtuvo una  $I_{50}$  de 1.2 mM para la zaluzanina C y de 1.0 mM para la ivalina. Una vez que se obtuvieron estos datos se deduce que solo quedan dos sitios posibles de inhibición, por lo cual se estudió el efecto de los compuestos ensayados sobre una porción de la cadena de transporte de electrones que solo tenga uno de los sitios de inhibición. En el siguiente experimento se midió el transporte de electrones que va de la 1,5-difenilcarbocida al diclorofenolindofenol, es decir de  $P680 \rightarrow O_2$ . Los resultados encontrados muestran que no hay efecto de la ivalina y la zaluzanina C sobre este tramo de la cadena de transporte de electrones por lo cual se deduce que el sitio de inhibición no se encuentra en este tramo. **Tabla 2.** De los resultados anteriores se infiere que las lactonas sesquiterpénicas ivalina y zaluzanina C tienen como blanco principal de la cadena de transporte de electrones fotosintética la enzima que fotoliza el agua, la cual se encuentra antes del centro de reacción del fotosistema II ( P680 ).

#### Discusión

Hay una gran variedad de sustancias que pueden inhibir el lado

Tabla 2 Efecto de la ivalina y la zaluzanina C sobre reacciones parciales de la cadena de transporte de electrones fotosintetica.

Compuesto	Cantidad agregada ( mM )	% de inhibición		
		H <sub>2</sub> O>DAD	H <sub>2</sub> O>SiMo	DPC>DCPIP
Ivalina	0.00	0.0	0.0	0.0
	0.88	---	45.0	---
	1.77	57.0	59.0	8.0
	2.66	64.5	66.0	1.0
	3.55	75.5	70.0	0.0
	4.44	80.0	73.5	9.5
	6.66	82.0	80.5	10.0
Zaluzanina C	0.00	0.0	0.0	0.0
	0.88	---	39.0	---
	1.77	53.0	58.0	2.0
	2.66	82.0	63.5	---
	3.55	---	69.0	0.0
	4.44	91.0	71.0	3.0
	6.66	95.0	75.0	5.0

oxidado del fotosistema II, la mayoría de los cuales tienen distintos modos de acción y diferentes características químicas.

I.- Inhibidores que actúan en el sitio de oxidación del agua.

-El sitio de inhibición de la hidroxilamina, metilamina, amoníaco, etc. es el sitio de ruptura del agua, la forma activa de estos compuestos es la base no protonada de la amina, lo cual determina el pH en el cual hay inhibición para cada sustancia. De esta manera el amoníaco y la metilamina necesitan de un pH mayor a 8 para tener su base no protonada y ejercer así su acción inhibitoria. A valores bajos de pH o bajas concentraciones el efecto desacoplante de estas sustancias predomina. La hidroxilamina es una base más débil y tal vez por ello tiene efectos inhibitorios a valores de pH menores y a menores concentraciones ( 75 ); sin embargo la inhibición con hidroxilamina es más compleja, a bajas concentraciones de hidroxilamina, dos de estas moléculas se unen en la luz de manera reversible a cada centro liberador de oxígeno, produciendo de esta manera la inhibición ( 83 ), de tal manera que la hidroxilamina a bajas concentraciones actúa como análogo del agua donando electrones a la cadena de transporte de electrones, compitiendo efectivamente con ésta por el sitio activo del centro liberador de oxígeno ( 84 ); sin embargo a concentraciones mayores (1 a 10mM ), en la obscuridad se provoca la pérdida irreversible de la capacidad de liberar oxígeno concomitante con la liberación de 2/3 del manganeso unido al cloroplasto, estos cloroplastos son capaces aún de oxidar a varios donadores de electrones artificiales incluyendo a la hidroxilamina misma con una efectividad del 60%. Cuando el tratamiento se hace en la luz, se produce la destrucción del sistema

liberador de oxígeno ( 83 ).

Otros inhibidores como el amoníaco y la hidrazina también liberan el manganeso unido a la membrana, por lo cual se piensa que tienen el mismo mecanismo de acción. En el mecanismo más aceptado se reemplazan dos moléculas de agua por dos moléculas de hidroxilaminas en el estado S<sub>1</sub>, después se lleva a cabo la oxidación del complejo con un fotón dando el estado S<sub>0</sub> con la liberación de dos protones y una molécula de nitrógeno ( 84 ).

-La inhibición por TRIS ocurre a nivel de la oxidación del agua. La forma activa es, al igual que en las aminas, la base no protonada ya que se requieren valores de pH mayores de 9 para su acción. Los cloroplastos tratados con TRIS retienen su capacidad de fosforilar cuando transfieren electrones de donadores de electrones a MV. La incubación de cloroplastos con TRIS en la luz lleva a la destrucción de la capacidad del sistema liberador de oxígeno, por lo cual los cloroplastos tratados con TRIS solo pueden oxidar donadores de electrones artificiales, esta destrucción se debe a la acumulación de oxidantes producidos por el fotosistema II ( 85 ).

- Tratamientos de 3' a 50° y 5' a 45° inactivan a la enzima liberadora de oxígeno, este tratamiento libera el manganeso unido a la membrana, sin embargo la readición de manganeso no restaura la actividad por lo cual otro factor debio ser alterado por el calor. ( 75 ).

- La remoción de iones calcio y cloruro provoca la inhibición completa de la evolución de oxígeno debido a que los iones calcio y cloruro son esenciales para la estabilidad de los distintos estados de oxidación de la enzima liberadora de oxígeno. La remoción de

manganeso produce inhibición debido a que forma el sitio activo de la enzima ( 75 ).

- Valores de pH externos de 9-9.3 en presencia de desacoplantes provocan una elevación del pH interno. Esto afecta al estado  $S_2$  de la enzima liberadora de oxígeno, el cual es sensible al pH interno, lo que se traduce en una inhibición en el flujo de electrones (85).

- Diversos modificadores químicos han sido utilizados como inhibidores de la cadena de transporte de electrones en las membranas de los cloroplastos. Entre los más utilizados están el diazonio bencen sulfónico ( DABS ), el cual inhibe el transporte de electrones en el nivel de oxidación del agua. Este reactivo provoca una mayor inhibición cuando los cloroplastos son modificados en la luz.

El DABS es un compuesto químico hidrosoluble y por lo tanto no permeable en las membranas de los tilacoides; reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina, hidroxilos, sulfhidrilos, imidazol, de los restos de aminoácidos que forman las proteínas. El DABS inhibe el transporte de electrones al nivel de la oxidación del agua solo en la luz; concomitante a esta inhibición hay un incremento de 3 a 4 veces en la incorporación de DABS en las membranas en comparación a la incorporación en la obscuridad. Este aumento en la incorporación de DABS es el responsable de la inhibición, ya que hay una correlación entre la intensidad de la luz, inhibición al fotosistema II e incorporación del reactivo. Esto, junto al hecho de que la presencia de DCMU previene la inhibición, indica que el transporte de electrones de agua-PD es necesario para aumentar la unión de DABS y producir la inhibición, por lo tanto se deduce que



## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

el transporte de electrones provoca un cambio conformacional que expone centros reactivos ocultos al DABS en la oscuridad lo cual provoca la mayor incorporación del reactivo y la inhibición de la oxidación del agua. Esto queda confirmado porque la presencia de desacoplantes que aumentan la velocidad del transporte de electrones en la luz, aumenta la incorporación y la inhibición de DABS. El cambio conformacional detectado por DABS es resultado directo de los protones liberados durante la oxidación del agua, los cuales probablemente se unen a una proteína provocando el cambio conformacional.

En la oscuridad el DABS tiende unirse al fotosistema I, el cual es más accesible a un reactivo hidrosoluble. Esto provoca una inhibición del transporte de electrones de *Ao*-ferredoxina y de Ferredoxina-NADP<sup>+</sup>.

Se han probado otros modificadores químicos para saber cual es la naturaleza química de los grupos afectados por el DABS. El iodoacetato reacciona solamente con grupos sulfhidrilo, este modificador químico al igual que el DABS se incorpora más en la luz y presenta otras características en común con la inhibición con DABS, en cambio el anhídrido acético que reacciona con grupos amino se incorpora menos en la luz, lo cual indica que el cambio conformacional producido por el transporte de electrones oculta los grupos reactivos al anhídrido acético, además de volver los grupos amino de la lisina menos reactivos al transformarlos en su forma más protonada (  $\text{NH}_3^+$  -  $\text{NH}_2$  ).

- Los agentes quelantes hidrofílicos inhiben sitios del transporte de electrones donde hay metales como cobre, hierro, manganeso

unidos a una enzima. Dentro de la cadena de transporte de electrones fotosintética, estos compuestos tienen tres sitios de acción siendo uno de ellos el sitio de manganeso o de oxidación de agua, por ejemplo saliciladroxima, acridina, dithizona, etc. ( 90 ).

- Anticuerpos dirigidos contra componentes del fotosistema II como la clorofila inhiben la oxidación del agua. Los anticuerpos no pueden atravesar la membrana de los tilacoides debido a su tamaño, sin embargo al unirse a componentes del fotosistema II provocan un cambio conformacional en él: éste altera el funcionamiento del sistema liberador de oxígeno. Esto indica que el fotosistema II y el sistema liberador de oxígeno forman un complejo proteínico transmembranal de tal manera que el ataque de anticuerpos por el lado externo de la membrana afecta las actividades de todo el complejo. ( 85 ).

- El ácido linoleico produce inhibición total del transporte de electrones al nivel de la oxidación del agua en concentraciones de 300µM. Su inhibición es poco usual porque no es revertida por dadores de electrones artificiales, es revertida parcialmente por la adición de albumina serica bovina y manganeso, produce una pérdida lenta e irreversible del manganeso unido al sistema liberador de oxígeno, induciendo una pérdida del cambio de absorbancia a 690nm atribuido a P680, lo cual se explica por el hecho de que los ácidos grasos tienen dos sitios de acción uno entre la feofitina y D<sub>1</sub> y otro entre Z y P680 ( 91 ).

- El cacalol es un sesquiterpeno extraído de la planta *Cacalia decomposita*, el cacalol inhibe el transporte de electrones a nivel de la enzima liberadora de oxígeno. El cacalol es la primera

sustancia descubierta de origen biológico que tiene como blanco de acción a la enzima liberadora de oxígeno. ( 82 ).

- Los estados de oxidación  $S_2$  y  $S_3$  del sistema liberador de oxígeno regresan espontáneamente en la oscuridad al estado  $S_1$ . Las sustancias ADRY ( acceleration of deactivation reactions of water splitting system Y ), como su nombre indica aceleran el decaimiento de los estados  $S_2$  y  $S_3$ . Esto provoca una inhibición en el transporte de electrones a nivel de oxidación del agua. Debido a ésto el efecto ADRY se ve mejor a baja intensidad de luz y bajas longitudes de onda donde la evolución de los estados de la enzima liberadora de oxígeno no es tan eficiente y puede ser alterada por el efecto ADRY ( 92 ).

Los agentes ADRY se caracterizan por tener un grupo ácido, siendo la forma aniónica de la molécula la forma activa.

Los agentes ADRY producen un flujo de electrones cíclico interno tomando electrones de diversos puntos de la cadena de transportadores de electrones y utilizándolos para reducir los estados  $S_2$  y  $S_3$  a través de la inducción de cambios conformacionales o por la directa intervención de los agentes ADRY como transportadores de electrones. Algunos agentes ADRY modifican otras reacciones redox catalizadas por el fotosistema II como : disminución del rango de la reacción de deactivación normal, inducción de la fotooxidación del Citocromo ~~c~~ y de los carotenos y aumento en el rango de reducción del acarreador de electrones intermedio Z fotooxidado en cloroplastos lavados con TRIS ( 93, 94 ).

- Hay una gran variedad de iones metálicos que afectan el sistema liberador de oxígeno en el fotosistema II. Los iones zinc provocan

la pérdida del manganeso del sitio catalítico de la enzima liberadora de oxígeno con la consiguiente inhibición del transporte de electrones en el lado oxidado del fotosistema II en algas. En cambio en los cloroplastos de plantas superiores el sitio de inhibición se encuentra más cercano al centro de reacción del fotosistema II ( 95 , 96 ). Los iones cadmio afectan también en el lado donador del fotosistema II actuando sobre la enzima liberadora de oxígeno, a bajas concentraciones de  $Cd(NO_3)_2$  se ve un efecto desacoplante, el cual cambia por un efecto inhibitor a concentraciones mayores. Los iones  $Cu^{2+}$  inhiben el transporte de electrones en cloroplastos de espinaca en varios puntos, los cuales son: el lado oxidante del fotosistema II, el lado reductor del fotosistema II cercano al centro de reacción, el citocromo c, en lado reductor del fotosistema I y en la ferredoxina. El cobre se caracteriza porque a bajas concentraciones inhibe principalmente en el fotosistema II y a concentraciones mayores en el fotosistema I, el cobre también produce una inhibición mayor con una preincubación en la luz, ésto es muy importante porque todos los iones metálicos actúan uniéndose a proteínas membranales y cambiando de esta manera la actividad fisiológica de esa proteína, por lo cual la mayor inhibición del cobre en la luz indica que un cambio conformacional producido por la luz expone los centros reactivos del cobre aumentando de esta manera la inhibición ( 97 , 98 ).

Las sustancias que afectan el transporte de electrones a nivel de la oxidación del agua cubren una gran variedad de modos de acción y características estructurales, lo cual determina que su efecto sobre el sistema liberador de oxígeno no tenga la misma intensidad

Tabla 3. Esto puede explicarse por el hecho de que el fotosistema II se encuentra embebido en las membranas de los tilacoides de los grana y por ello se encuentra menos expuesto a éstas sustancias. Esto determina que muchas de éstas sustancias sean partículas pequeñas como iones o sustancias que puedan atravesar la membrana debido a sus características hidrofóbicas. Sin embargo ciertas sustancias hidrofílicas pueden afectar el funcionamiento del sistema liberador de oxígeno actuando sobre el lado externo del fotosistema II produciendo de esta manera un cambio conformacional, el cual afecta la actividad de la enzima que se encarga de oxidar el agua. Esto es consecuencia de la organización de los distintos polipéptidos que forman el fotosistema II, pues la enzima liberadora de oxígeno se encuentra en los mismos polipéptidos que el centro de reacción del fotosistema II.

En cuanto a la potencia de su acción, las sustancias que por su modo de acción actúan directamente en el sitio catalítico del sistema liberador de oxígeno necesitan de concentraciones elevadas y en algunas su acción depende del pH; todo esto determinado por la dificultad para llegar al sitio de acción; en cambio las sustancias que actúan sobre la parte externa del fotosistema II necesitan de concentraciones menores, lo que indica que no necesitan llegar al sitio activo para ejercer su acción.

El hecho de que caluzanina C y la ivalina afecten principalmente el transporte de electrones en condiciones desacoplantes, sugiere que estas sustancias se incorporan mejor cuando no hay cambios conformacionales relacionados con la fotofosforilación y cuando si hay cambios conformacionales debidos

Tabla 3 Efecto de diferentes compuestos en las reacciones de oxidación del agua

Compuesto	Concentración ( mM )	% de Inhibición
amoníaco <sup>*</sup> (75)	10	100
metiamina <sup>*</sup> (75)	100	100
hidroxilamina <sup>*</sup> (75)	1	100
TRIS <sup>*</sup> (85)	800	60-80
DCMU <sup>*</sup> (93)	0.2	80
Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> <sup>**</sup> (99)	0.005	80-100
Cacalol <sup>*</sup> (82)	0.06	100
ANT2p <sup>*</sup> (92)	0.0005	80
DABS <sup>*</sup> (88)	1.5	50
Ivalina <sup>**</sup>	1.4	50
zaluzanina C <sup>**</sup>	1.6	50

\* Los números que están al final de cada compuesto, representan la numeración bibliográfica.

\*\* Son los compuestos caracterizados en este trabajo.

al transporte de electrones ya que el transporte de electrones más afectado fue el desacoplado en el cual el transporte de electrones ocurre a una mayor velocidad; ésto en conjunto ocasiona que los centro reactivos a la zaluzanina C y a la ivalina que estaban ocultos queden expuestos a la acción de estas lactonas sesquiterpénicas produciéndose así la inhibición observada. Esto sugiere que una preincubación de los cloroplastos con las lactonas sesquiterpénicas en la luz podría incrementar los porcentos de inhibición observados.

Además de la zaluzanina C y la ivalina, solo una de las sustancias que tienen actividad sobre la oxidación del agua provienen de fuentes naturales: el cacalol y algunos de sus derivados que al igual que la zaluzanina C y la ivalina es un sesquiterpénico e inhiben en mayor grado el transporte de electrones desacoplado, lo cual puede indicar que actúan de la misma manera. Sin embargo el cacalol es mucho más potente que las lactonas sesquiterpénicas de este trabajo ya que produce un 100% de inhibición con una concentración de 60  $\mu\text{M}$  por 1.2 mM de las lactonas sesquiterpénicas. ésto sugiere la importancia del esqueleto sesquiterpénico u otros factores en la actividad sobre el sistema liberador de oxígeno, disminuyendo la importancia del grupo  $\alpha$ -metileno  $\gamma$ -lactona considerado como el grupo reactivo de las lactonas sesquiterpénicas. Probablemente sea importante la participación de estos compuestos, lo que hace que queden lejos de la enzima que fotoliza al agua, dificultando su acción y por ello se requieren concentraciones mayores.

Estas sustancias son productos del metabolismo secundario de

alguna plantas y se piensa que actúan como aleloquímicos alterando las relaciones de las plantas que los producen con otras plantas y animales afectando de esta manera el entorno ecológico de la planta. Los resultados obtenidos sugieren que la ivalina y la zaluzanina C pueden actuar como agentes aleloquímicos interfiriendo con la cadena de oxidación-reducción de las plantas, aunque no se pueden sacar conclusiones determinantes al respecto.

En el estudio realizado se encontró que dos lactonas sesquiterpénicas, la ivalina y la zaluzanina C, producidas por plantas comunes en el altiplano de México actúan como inhibidores de la reacción de Hill actuando a nivel de la oxidación del agua; sin embargo, con los datos obtenidos en este trabajo no se pueden sacar conclusiones respecto al posible papel de estas sustancias como aleloquímicos y acerca de las características estructurales de estas lactonas sesquiterpénicas que determinan la inhibición sobre la reacción de Hill, debido a las pocas sustancias disponibles para el ensayo, en un estudio anterior sobre el cacalol, otro sesquiterpeno, se vio la importancia de los grupos hidroxilo del cacalol para su actividad sobre el sistema liberador de oxígeno, por lo cual los grupos hidroxilo de la ivalina y la zaluzanina C pueden ser también importantes para dar la inhibición observada. El siguiente paso consistiría en encontrar otros sesquiterpenos que actúen sobre el sistema liberador de oxígeno y realizar modificaciones químicas sobre estas sustancias para ver el efecto de este cambio estructural sobre la actividad, relacionando de esta manera la actividad con la estructura para encontrar los grupos funcionales que determinan la actividad inhibitoria.



#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Miller K.R. ( 1979 ) " The photosynthetic membrane " Sci. Am. 241,100-113.
- 2.- Hooper J.K. ( 1984 ) " Chloroplasts " Plenum, New York.
- 3.- Staehelin L.A. ( 1986 ) " Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membrane " in Enciclopedia of Plant Physiology tomo 19, eds. Staehelin L.A. Arntzen C.V. pp 1-84. Springer-Verlag. Berlin.
- 4.- Gounaris K., Barber J. ( 1983 ) " Monogalactosyl diglycerol. The most abundant polar lipid in nature." Trends Biochem. Sci. 8,10:378-381.
- 5.- Ort D. ( 1985 ) " Energy transduction in Oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism " in Enciclopedia of plant Physiology tomo 19 " Photosynthesis III " eds. Staehelin L.A., Arntzen C.V., pp 143-196. Springer-Verlag. Berlin.
- 6.- Anderson J.M., Andersson B. ( 1988 ) " The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion " Trends Biochem Sci. 13,351-355.
- 7.- Kaplan S., Arntzen C.V. ( 1982 ) " Photosynthetic membrane structure and function " in Photosynthesis energy conversion by plants and bacteria ed. Govindjee , Academic Press. New York.
- 8.- Govindjee, Govindjee R. ( 1974 ) " Absorption of light in photosynthesis" Sci. Am. 233,68-82.
- 9.- Thornberg S.P. ( 1986 ) " Biochemical and structure of

pigment proteins of photosynthetic organisms "in Enciclopedy of Plant Physiology tomo 19 " Photosynthesis III " eds. Staehelin L.A., Arntzen C.V. pp 98-142, Springer-Verlag Berlin.

- 10.-Junge W. ( 1977 ) " Physical aspects in light harvesting, electron transport, and electroquemical gradient generation in photosynthesis of green plants" in Enciclopedy of Plant Physiology Tomo 5 " Photosynthesis I " eds. Trebst A, Avron M pp 59-93.Springer-Verlag Berlin.
- 11.- Okamura M.J., Feher G., Nelson N. ( 1982 ) " Reaction Centers " in Photosynthesis energy conversion by plants and bacteria ed. Govindjee, Ed. Academic Press. New York.
- 12.- Vermaas W.F.J., Pakrasi V.B.,Arntzen C.J. ( 1987 ) " Photosistem II and inhibition by herbicides " in Models in Plant Physiology and Biochemistry. eds. Newman D.W.,Wilson K.P. pp 9-12. CRC press.Boca Raton, Florida.
- 13.- Sauer K. ( 1975 )" Primary events and the trapping of energy " in Bioenergetics of photosynthesis, ed. Govindjee, pp 116-181. Academic Press. New York.
- 14.- Parson W.W., Ke B. ( 1982 ) " Primary photochemical reactions " in Energy conversion by plants and bacteria ,ed. Govindjee, Ed. Academic Press. New York.
- 15.- Nugent H.A. ( 1984 ) " Photosynthetic electron transport in plants and bacteria " Trends Biochem. Sci. 9,1:354-357.
- 16.- Golbeck J.H., Lien S., San Pietro A. ( 1977 ) " Electron transport in chloroplasts " In Enc. of Plant Physiology. eds. Trebs A., Avron M. pp 94-116. Springer Verlag. Berlin.

- 17.- Yocum C.F. ( 1987 ) " Oxygen evolution by photosystem II. Polipeptide structure and inorganic constituents " in Models in plant Physiology and Biochemistry. eds. Newman D. W., Wilson K.G. pp 3-5. CRC press. Boca Raton Florida.
- 18.- Homann P.H. ( 1988 ) " Explorations in the inner sanctum of the photosynthetic process; the water oxidizing system " Plant Physiol. 88,1-5.
- 19.- Govindjee, Coleman W.J. ( 1990 ) "How plants make oxygen " Sci. Am. Feb. 42-51.
- 20.- Joliot P., Joliot A.C. ( 1986 ) " Cytochrome b<sub>6</sub>/f -quinol interactions " in Enciclopedy of Plant Physiology tomo 19 " Photosynthesis III " eds. Staehelin L.A., Arntzen C.V., pp 529-539. Springer-Verlag. Berlin
- 21.- Jagendorf A. ( 1975 ) " Mechanisms of Photophosphorylation " in Bioenergetics of Photosynthesis ed. Govindjee pp 414-492. Academic Press. New York.
- 22.- Mcarty R.E., Nalin C.M. ( 1986 ) " Structure, Mechanism and regulation of the H<sup>+</sup>-ATPase (CF<sub>1</sub>-CF<sub>0</sub>) in Enciclopedy of Plant Physiology tomo 19 eds. Staehelin L.A., Arntzen C.V., pp 576-583. Springer-Verlag. Berlin.
- 23.- Shavit N. ( 1977 ) " Bound nucleotides and conformational changes in photophosphorylation " in Enciclopedy of Plant Physiology tomo 5 " Photosynthesis I " eds. Trebst A, Avron M. pp 350-357. Springer Verlag Berlin.
- 24.- Schwartz M. ( 1968 ) " Light induced proton gradients links electron transport and photooxidation " Nature (219): 915-919.

- 25.- Hinkle P.C.,Mcarty R.E. ( 1978 ) " How cells make ATP " Sci Am. 238(3),104-123.
- 26.- Robinson S.P.,Walker D.A. ( 1981 ) " Photosynthetic carbon reduction cycle "in The biochemistry of Plants eds Hatch M.W.,Boardmann N.K. pp 194-236 Academic Press New York.
- 27.- Buchanan B.B.,Wolosiuk A.A.,Schürmann P. ( 1979 ) " Thioredoxin and enzyme regulation " Trends Biochem Sci. abril,93-95.
- 28.- Bassham J.A. ( 1979 ) " The reductive pentose phosphate cycle and its regulation " in Enciclopedia of plant Physiology tomo 6 " Photosynthesis II " eds. Gibbs M.,Latzko E.pp 9-30, Springer Verlag Berlin.
- 29.- Fischer N.K.,Wiley R.A., Perry D.L. ( 1976 ) " Sesquiterpene lactones from *Melampodium* ( *Compositae*, *Helianthae* ) structural and biosynthetic considerations " Rev. Latinoamer. Quím. 7,87-93.
- 30.- Geissman T.A. ( 1973 ) " The biogenesis of sesquiterpene lactones of the *Compositae* " in Recent advances in Phytochemistry " Terpenoids:Structure, Biogenesis and distribution " eds Runeckless V.C.,Mabry T.J. 6,65-96 Plenum New York.
- 31.- Rodriguez E. ( 1977 ) " Sesquiterpene lactones. Chemotaxonomy, Biological activities and isolation " Rev. Latinoamer. Quím. 8,56-62.
- 32.- Geissman T.A.,Griffin S.,Wadell T.G.,Chen H.H. ( 1957 ) " Lactones sesquiterpenes. Some new constituents of *Ambrosia* species " Phytochem. 8,145-150.

- 33.- Hartwell J.L., Abbott B.J. ( 1969 ) " Antineoplastic principles in plants. Recent developments in the field " in Adv. Pharmacologic Chemoter. 7, 117-209.
- 34.- Kupchan S.M., Eakin M.A., Thomas P.M. ( 1971 ) " Structure cytotoxicity relationships among sesquiterpene lactones " J. Med. Chem. 14, 1147-1152.
- 35.- Lee K.H., Huang E.S., Piantadosi C., Pagano J.S., Geissman T.A. ( 1971 ) " Citotoxicity of sesquiterpene lactones " Cancer Res. 31, 1649-1654.
- 36.- Kupchan S.M., Fessler D.C., Eakin M.A., Giacobbe T.J. ( 1970 ) " Reactions of  $\alpha$ -methylene lactone tumour inhibitors model biological nucleophiles " Science 168, 376-378.
- 37.- Hanson R.L., Lardy H.A., Kupchan S.M. ( 1970 ) " Inhibition of phosphofructokinase by quinone methide and  $\alpha$ -methylene lactone tumour inhibitors " Science 168, 378-380.
- 38.- Smith C.H., Lerner J., Thomas A.M., Kupchan S.M. ( 1972 ) " Inactivation of glycogen synthase by tumour inhibitor vernalopin " Biochim. Biophys. Acta 276, 94.
- 39.- Kupchan S.M. ( 1975 ) " Advances in the chemistry of tumour inhibitory natural products " in Recent advances in Phytochemistry. eds Runeckless V.C. 8, 167-188. Plenum New York.
- 40.- Rodriguez E., Towers G.H.N., Mitchell J.C. ( 1976 ) " Biological activities of sesquiterpene lactones " Phytochem. 15, 1573-1580.
- 41.- Calzada J., Cicervo J.F., Echandi G. ( 1980 ) " Antimicrobial activity of the helianeside chromolaenide and related

- sesquiterpene lactones " *Phytochem.* 10,967-968.
- 42.- Lee H.H., Ibuka T., Wu R.Y., Geissman T.A. ( 1977 ) " Structure antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds " *Phytochem.* 16,1177-1181.
- 43.- Pickman A.K., Towers G.H.N. ( 1983 ) "Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones " *Biochem. Systematics Ecol.* 11:4,321-327.
- 44.- Roit I.M. ( 1980 ) " Essential Immunology " Blackwell Sci.Pub. Londres.
- 45.- Rodriguez E. ( 1978 ) " Allergenic and irritant plants constituents " *Rev. Latinoamer. Quím.* 9,125-131.
- 46.- Mitchell J.C. ( 1975 ) " Contact allergy from plants " in *Recent advances in phytochemistry.* eds Runeckless V.C.9,119-138 Plenum New York.
- 47.- Dupuis G., Towers G.H.N., Mitchell J.C. ( 1974 ) " Reaction of alantolactone an allergenic sesquiterpene lactone with some aminoacids. Resultant loss of immunological reactivity " *Can. J. Biochem.* 52(7),575-581.
- 48.- Rees S.B., Harborne J.B. ( 1985 ) The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant " *Phytochem.* 24:10,2235-2231.
- 49.- Burnett W.C., Jones S.B., Mabry T.J., Padolina W.J. ( 1974 ) *Biochem Systematics Ecol* 2.25.
- 50.- Vogelzang M.E., Vermeulen N.M.J., Potgieter D.J., Strauss V.F. ( 1978 ) " Ivalin in *Geigeria aspera* " *Phytochem.* 17,2030-2031.
- 51.- Gross D. ( 1975 ) " Growth regulating substances of plant

origin " *Phytochem.* 14,2105-2112.

- 52.- Dalvi R.R.,Singh B.,Salunkhe D.K. ( 1971 ) " Study on phytotoxicity of alantolactone " *Chem. Biol. Interactions* 3,13.
- 53.- Sequeira L.,Hemingway R.J.,Kupchan S.M. ( 1968 ) " Vernolepin a new reversible plant growth inhibitor " *Science* 161,789-790.
- 54.- Garcidueñas M.R.,Dominguez X.A.,Fernandez J.,Alanís G. (1972) " New growth inhibitors from *Pharbitis hysterothorus* " *Rev. latinoam. Quím.* 2,52-53.
- 55.- Shibaoka H.,Mitsuhashi M.,Shimokongang M. ( 1967 ) " Promoting activity of terpenic lactones in *Phaseolus* rooting and their reactivity toward cysteine " *Plant cell Physiol.* 8,161-170.
- 56.- Del Amo S.,Anaya-Lang A.L. ( 1978 ) " Effect of some sesquiterpene lactones on the growth of certain secondary tropical species " *J. Chem. Ecol.* 4:3,305-313.
- 57.- Abeysekera B.F.,Abramowski Z.,Towers G.H.N. ( 1985 ) " Chromosomal aberrations caused by sesquiterpene lactones in chinese hamster ovary cell " *Biochem. Systematics Ecol.* 13,365-369.
- 58.-Van Answegen C.H.,Potgieter D.J.J.,Vermeulen N.M.J. ( 1982 ) " Site of respiratory inhibition by sesquiterpene lactones from *Geigeria* " *South Afr. J. Sci.* 78,125-127.
- 59.- Korada M.,Yoshida D.,Kodama H. ( 1987 ) Bioantimutagenic effects of sesquiterpene lactones from costus root oil " *Agr. Biol. Chem* 51 (2),585-587.

- 60.- Rice E.L. ( 1979 ) " Allelopathy, an update " The botanical Rev. 45,15-109.
- 61.- Brushan Mandava N. ( 1985 ) " Chemistry and biology of allelophatic agents " in The chemistry of allelopathy. eds. Thompson A.C. pp 33-54 Am Chem Soc Washington D.C.
- 62.- Herz W., Högenauer G. ( 1962 ) " Ivalin a new sesquiterpene lactone " J. Org. Chem. 27,905-909.
- 63.- Herz W., Bhat S.V. ( 1970 ) " Isolation and structure of two germacranolide from *Polynia uvodalia* (L) " J. Org. Chem. 35:8,2605-2611.
- 64.- Romo de Vivar A., Cabrera A., Ortega A., Roao J. ( 1967 ) " Constituents of *Zaluzania* species II. Structures of Zaluzanin C and Zaluzanin D " Tetrahedron 23,3903-3907.
- 65.- Tschinitzis F., Jakopovic C.J., Böhlmann F. ( 1990 ) " Sesquiterpene lactones and farnesol derivates from *Arctotis* and *Arcotheca* species " Phytochem. 29:1,195-203.
- 66.- Leegood R.C., Malkin R. ( 1986 ) " Isolation of subcellular photosynthetic systems " in Photosynthesis energy transduction. A practical Approach. eds. Hipkins M.F., Baker N.R.
- 67.- Strain H.H., Cope T.B., Svec W.A. ( 1971 ) " Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls " in Methods in Enzimology. Vol 23 eds San Pietro A. 42,452-476. Academic Press New York.
- 68.- Hipkins M.F., Baker N.R. ( 1986 ) " Spectroscopy " in Photosynthesis energy transduction. A practical Approach, eds Hipkins M.F., Baker N.R.



- 69.- Dilley R.A. ( 1971 ) " Ion transport (  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  ) exchange phenomena " in Methods in Enzimology Vol 24. eds. San Pietro A. 4, 68-74. Academic Press New York.
- 70.- Chance B., Nishimura N. ( 1967 ) " Sensitive measurements of changes of  $H^+$  concentration " in Methods in Enzimology Vol 10. eds. Estabrook R.W., Pullman M.E. 99, 641-650. Academic Press New York.
- 71.- Allen Holmes ( 1986 ) " Electron tranport and redox titration " in Photosynthesis energy transduction. A practical approach. eds. Hipkins M.F., Baker N.R.
- 72.- Fork D.C. ( 1971 ) " Oxigen electrode " in Methods in Enzimology Vol 24. eds. San Pietro A. 10, 113-122. Academic Press New York.
- 73.- Manual del Oximetro YSI Model 5300 ( Yellow Spring Inst. Co.)
- 74.- Ort D., Izawa S. ( 1974 ) " Studies on energy coupling sites of photophosphorilation. Phosphorylation efficiencies associated with aerobic photooxidation of artificial electron donors " Plant Physiol. 55, 370-376.
- 75.- Izawa S., Good N.E. ( 1971 ) " Inhibition of photosynthetic transport and photophosphorylation " in Methods in enzimology Vol 24. eds. San Pietro A. 32, 355-381 Academic Press New York.
- 76.- Trebs A. ( 1971 ) " Measurements of Hill reactions and photoreductions " in Methods in Enzimology Vol 24 eds. San Pietro A. 14, 146-165 Academic Press New York.
- 77.- Giaquinta R.T., Dilley R.A. ( 1975 ) " A partial reaction in photosystem II. Reduction of SiMo prior the site of DCMU

- inhibition " *Biochim. Biophys. Acta* 397,288-305.
- 78.- Yamashita F.,Butler W.L. ( 1969 ) " Photooxidation of photosistem II by TRIS-washed chloroplast " *Plant Physiol.* 44,1342-1346.
- 79.- Armstrong J.M. ( 1964 ) " The molar extinction coefficient of 2,6-diclorophenolindophenol " *Biochim. Biophys. Acta* 86,194-196.
- 80.- Vernon L.F.,Shaw E.R. ( 1969 ) " Oxidation of 1,5-diphenilcarbazide and measure of photosistem II activity in subchloroplast fragments " *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 36,878-884.
- 81.- Saha A.,Ouitrakul R.,Izawa S.,Good N.E. ( 1971 ) " Electron transport and phosphorylation in chloroplast as a function of the electron acceptor " *The J. Biol. Chem.* 246:10,3204-3209.
- 82.- Lotina-Hennsen B.,Roque-Resendiz J.L.,Jimenez M.,Aguilar M. ( 1991 ) " Inhibition of oxigen evolution by cacalol and its derivates " *Z-Naturforsch* 46c,1265-1268.
- 83.- Izawa S. ( 1977 ) " Inhibition of electron transport " in *Enciclopedy of Plant Physiology Tomo 5. " Photosynthesis I "* eds Trebst A.,Avron M.pp 266-282. Springer Verlag.Berlin.
- 84.- Vassam B.,Renger B. ( 1985 ) " Studies on the interaction between  $NH_2OH$  and  $NH_4^+$  as substrate analogues and the WOES's in isolated spinach chloroplasts " *Biochim. Biophys. Acta* 810,225-234.
- 85.- Trebst A. ( 1980 ) " Inhibition of electron flow, tools for the functional and structural localization of carriers and energy conversion sites " in *Methods in Enzimology* Vol 69.

- eds San Pietro A. pp 675-715. Academic Press New York.
- 86.- Giaquinta R.T., Dilley R.A. ( 1977 ) " Chemical modifications of chloroplast membranes " in Enciclopedy of Plant Physiology vol 5, eds Trebst A. Avron M. pp 297-303. Springer Verlag Berlin.
- 87.- Prochaska L.J., Dilley R.A. ( 1980 ) " Analysis of membrane structure and function relationship. A chemical approach " in Methods in Enzimology Vol 69. eds San Pietro A. 48,502-510 Academic Press New York.
- 88.- Giaquinta R.T., Dilley R.A., Selman B.R., Anderson B.J. ( 1974 ) "Chemical modifications studies of chloroplast membranes. Water oxidation inhibition by DABS " Arch. Biochem. Biophys. 162,200-209.
- 89.- Prochaska L.J., Dilley R.A. ( 1978 ) " Chloroplast membrane conformational changes measured bu chemical modifications " Arch. Biochem. Biophys. 187:1,61-71.
- 90.- Barr R., Crane L.F. ( 1976 ) " Organization of electron transport in photosistem II of spinach chloroplast according inhibition sites " Plant Physiol. 57,450-453.
- 91.- Golbeck J.H., Warden J.T. ( 1984 ) " Interactions of linoleic acid with bound quinones molecules in photosistem II " Biochim. Biophys. Acta 767,263-271.
- 92.- Renger G. ( 1972 ) " The action of 2-anilinothiopenes as ADP in the water splitting enzyme sistem of photosynthesis " Biochim. Biophys Acta 256,428-439.
- 93.- Renger G., Bouges Bouquet B., Delosme P. ( 1973 ) " Studies on the ADP agent induced mechanism of the discharge of the hole

- trapped in the photosynthetic water splitting system " Biochim. Biophys. Acta 292,796-807.
- 94.- Packham N.K., Ford R.C. ( 1986 ) " Deactivation of the photosynthetic oxidation ( s ) states by 2-(3-chloro-4-trifluoromethylanilino)-3,5 dinitrothiphen and the putative role of the carotenes " Biochim. Biophys. Acta 852,183-190.
- 95.- Tripathy B.C., Mohanty P. ( 1980 ) " Zinc inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplast " Plant Physiol. 66,1174-1178
- 96.- Van Assche F., Clijsters H. ( 1986 ) Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatments with toxic concentrations of Zinc. Effects on electron transport and photophosphorylation " Physiol. Plant. 66,717-721.
- 97.- Van Duijvendjik-Matteoli M.A., Desmet G.M. ( 1975 ) " On the inhibitory action of cadmium on the donor side of photosystem II in isolated chloroplast " Biochim. Biophys. Acta 408,164-169.
- 98.- Singh D.P., Singh S.P. ( 1987 ) " Action of heavy metals on Hill activity and oxygen evolution in *Anacystis nidulans*" Plant Physiol. 83,12-14.