



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE ESTRUCTURA QUIMICA
Y ACTIVIDAD DESACOPLANTE EN LA
FOTOFOSFORILACION DE ALGUNOS DERIVADOS
DEL ACIDO QUINICO Y DEL ACIDO BORICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARTHA ELENA CARRASCO FUENTES



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Blas Lolina Hensen
Vocal Prof. Norah Yolanda Barba Behrens
Secretario Prof. Silvia Elena Castillo Blum
1er. Suplente Prof. Rafael Moreno Esparza
2do. Suplente Prof. María Estela Cevallos Ferriz

Sitio donde se desarrolló el Tema:
Departamento de Química Inorgánica
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química

U N A M

Asesor:


Dra. Silvia Elena Castillo Blum.

Sustentante:


Martha Elena Carrasco Fuentes.

DEDICATORIA

A mis padres por haberme dado su apoyo durante todos estos años.

A mis hermanas Minerva y Carolina por su ayuda.

A mis amigas: Ruth, Graciela, Irma, Ada, Norma, Leticia, María de Jesús.

A mis compañeras de Carnot: Ofelia, Martha, Adriana, Araceli y Sara.

A mis grandes amigos y compañeros de laboratorio Paty, Victor, Fabian, Araceli, América, Reina, Rosa María y Horacio.

Agradezco a mi asesora la Dra. Silvia Elena Castillo Blum por su excelente disposición en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Noráh Barba Behrens , al Dr. Blas Lotina-Hennsen y a la Bióloga Patricia Fierro por su ayuda en la elaboración de este trabajo y sobre todo por las plantas de chícharo.

INDICE

	Página
Abreviaturas	
Resumen	1
Capítulo 1	
1.1. Introducción	3
1.2. Antecedentes	4
1.3. Morfología de cloroplastos	8
1.4. Fotosíntesis	9
1.5. Transporte de electrones	14
1.6. Componentes y enzimas de la reacción de Hill	18
1.7. Síntesis de ATP	22
1.8. Clasificación de herbicidas	26
1.9. Objetivos	33
Capítulo 2 Métodos experimentales	
2.1. Aislamiento de cloroplastos	34
2.2. Cuantificación de clorofila	34
2.3. Determinación de actividades bioquímicas	35
2.4. Caracterización bioquímica	42
Capítulo 3 Resultados y Discusión	
3.1. Compuestos con poca actividad herbicida	43
3.2. Compuestos que se comportan como inhibidores de la transferencia de la energía	45

3.3. Compuestos con propiedades desacoplantes	48
3.4. Compuestos que se comportan como inhibidores de la reacción de Hill.	57
Conclusiones	64
Bibliografía	66

ABREVIATURAS

DCP= difenilcarbazida

DCIP= diclofenolindofenol

PMS= fenazina metasulfato

Mv= metilviológeno

LHC= complejos cosechadores de luz

NADP= adenosindinucleótido fosfato

ATP= trifosfato de adenosín

(Cf_0 - Cf_1) = complejo de H^+ -ATPasa-sintetasa

P_Q =plastoquinona

PC=plastocianina

$\Delta\Psi$ =potencial eléctrico

$\Delta\mu H^+$ =gradiente electroquímico o fuerza protón-motriz

ΔpH =gradiente de protones

ADP=difosfato de adenosína

DCMU=3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea o diurón

DBMIB=2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona

TEB=transporte de electrones basal

TEF=transporte de electrones fosforilante

TED=transporte de electrones desacoplado

mV=milivolts

DAD=2,3,5,6 tetrametil p-fenildiamina

PS II=fotosistema II

PS I =fotosistema I

Ph=feofitina

μM =micromolar

RESUMEN

En la búsqueda de nuevas sustancias con propiedades herbicidas se investigó el efecto de los compuestos derivados del ácido quínico y ácido bórico en actividades fotosintéticas en la fase luminosa de la fotosíntesis. Las diferentes actividades fotosintéticas en que se midió el efecto fué en cloroplastos que son:

Captación de protones

Síntesis de ATP

Transporte de electrones (basal, fosforilante y desacoplante).

Estos experimentos indican el tipo de mecanismo de acción de los compuestos y permiten clasificarlos como: desacoplantes, inhibidores de la reacción de Hill o inhibidores de la transferencia de la energía.

Los compuestos derivados del ácido quínico, ácido bórico y metabolitos de la ruta del ácido shikímico que se estudiaron son: ácido gálico, ácido shikímico, ácido bórico, 3,4 fenilboronato quinida, 3,4 isopropiliden quinida, borato del ácido quínico, borato spiro del ácido quínico, ácido fenilborónico y el inositol.

Los estudios se realizaron en cloroplastos aislados de hojas de chícharos (*Pisum sativum*) como se describe en la literatura⁽¹⁻²⁾, se suspendieron en una solución de sorbitol 0,35 M, cloruro de magnesio 5 mM, cloruro de potasio 50 mM la cual se tamponó a pH=8,0 con tricina 1 mM, se adicionó metilviológeno 50 μ M como aceptor artificial de electrones para la reacción de Hill. Se determinó la concentración de clorofilas A y B espectrofotométricamente⁽³⁾, el transporte de electrones no cíclico de agua a metilviológeno⁽¹⁻⁴⁾; la captación de protones y la síntesis de ATP se determinaron de

acuerdo a métodos ya informados⁽⁵⁾. Se midieron en fotosistemas I y II⁽³⁾, flujo de electrones de agua a silicomolibdato de potasio⁽⁶⁾ como se ha reportado.

Se encontró que el ácido bórico no afecta las actividades fotosintéticas y que los demás compuestos se pueden clasificar como:

Compuesto	Actividad
Borato spiro del ácido quínico	desacoplante
3,4 Fenilboronato quinida	desacoplante
Ácido gálico	desacoplante
Inositol	desacoplante
Borato del ácido quínico	inhibidor de la reacción de Hill.
3,4 Isopropiliden quinida	inhibidor de la reacción de Hill.
Ácido fenilborónico	inhibidor de la transferencia de energía
Ácido shikímico	Inhibidor de la transferencia de energía

El borato del ácido quínico es un inhibidor de la reacción de Hill que presenta mayor inhibición en el fotosistema I e inhibe la enzima Q_B o P_Q .

CAPITULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

En la actividad agrícola se requiere el uso de herbicidas para controlar y exterminar malezas que compiten por el agua, los nutrimentos del suelo y por la disponibilidad de la luz solar, reduciendo la calidad y productividad de los vegetales útiles.

La mayoría de los herbicidas que se utilizan a nivel nacional son compuestos que en otros países ya no se usan dada su baja biodegradabilidad, y varios de ellos son tóxicos para toda forma de vida, y debido a que por su uso constante se acumulan en el suelo y evitan el crecimiento de plantas. La aplicación continua de un tipo de herbicida induce resistencia en las malezas por lo que se recomienda la rotación de cultivos y el uso de diferentes tipos de herbicidas.

Los sitios de inhibición de los herbicidas son desconocidos a nivel molecular, sin embargo, se ha informado que muchos actúan a nivel de la fotosíntesis, biosíntesis de microtúbulos, biosíntesis de carotenos e inhibición de una enzima en diferentes vías metabólicas. Por otro lado, se sabe que los herbicidas que actúan a nivel de la fotosíntesis presentan baja toxicidad en mamíferos⁽⁷⁾ dado que el aparato fotosintético (cloroplastos) solo se encuentran en plantas y algas.

Dados los problemas de contaminación de suelos por la acumulación de los herbicidas utilizados en la agricultura y dada su baja biodegradabilidad, surge el interés de buscar herbicidas de origen natural que causen efectos mínimos en vegetales útiles y en mamíferos, que sean biodegradables, de baja toxicidad, eficientes, estables en

diferentes condiciones de suelo, agua y temperatura y que no induzcan resistencia en las malezas.

1.2. ANTECEDENTES

Dentro de este contexto se ha seleccionado un grupo de compuestos derivados del ácido quínico y del ácido bórico. La elección de este grupo se debe a que el ácido quínico⁽⁸⁻⁹⁾ es un metabolito que se acumula en plantas unido a fenoles que intervienen en la regulación del crecimiento vegetal y aunque no se sabe específicamente el papel que desempeña el ácido quínico, se tiene información respecto a que se encuentra en microorganismos y plantas que biosintetizan aminoácidos aromáticos los cuales utilizan este ácido como fuente de carbono en condiciones de estrés. Adicionalmente, se ha reportado que el ácido quínico se comporta como un desacoplante^(10, 11) débil en la fotosíntesis, por lo que resulta interesante extender este estudio a otros compuestos con estructura similar, a compuestos derivados del ácido quínico y ácido bórico e investigar su comportamiento y la influencia que presentan en el desacoplamiento de la fotofosforilación del cloroplasto.

El grupo de compuestos estudiados es el siguiente: ácido gálico, ácido shikímico, 3, 4 fenilboronatoquinida, 3,4 isopropilenquinida, borato del ácido quínico, boratospiro del ácido quínico, ácido bórico, ácido fenilborónico e inositol.

Entre los compuestos estudiados esta: el ácido gálico constituyente de tejidos vegetales, ácido shikímico, el cual se encuentra relacionado estructuralmente con el ácido quínico (figura 1.1), el ácido shikímico es un intermediario en la síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y microorganismos.

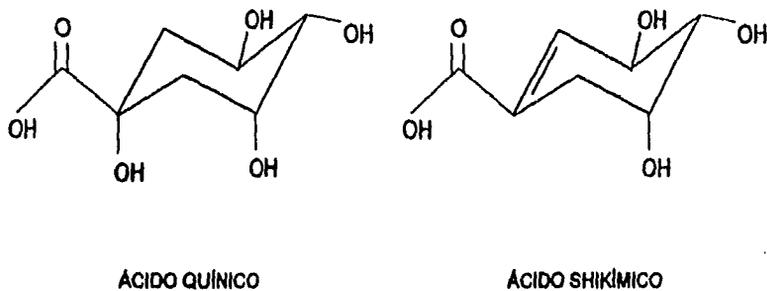


Figura 1.1. Ácido quínico y ácido shikímico.

En la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos⁽¹²⁾ el primer paso en la ruta del shikimato es la reacción entre la D-eritrosa y el fosfoenol-piruvato para producir el 3-deoxi-2-ceto-D-arabino heptuloseonato 7-fosfato, este compuesto posteriormente se cicla a ácido 5-deshidroquínico. Este producto intermediario se convierte luego en ácido shikímico, el cual, pasando por varios compuestos fosforilados, se transforma en ácido corísmico, en el que se produce una importante ramificación; una de las ramas conduce al ácido antranílico y después al triptófano, mientras que la otra lleva al ácido prefénico, el cual es un compuesto no aromático. El ácido prefénico puede aromatizarse por dos caminos: 1) por deshidratación y descarboxilación simultánea, produciendo ácido fenilpirúvico, que es el precursor de la fenilalanina, y 2) por deshidrogenación y descarboxilación, produciendo ácido p-hidroxifenilpirúvico, precursor de la tirosina.

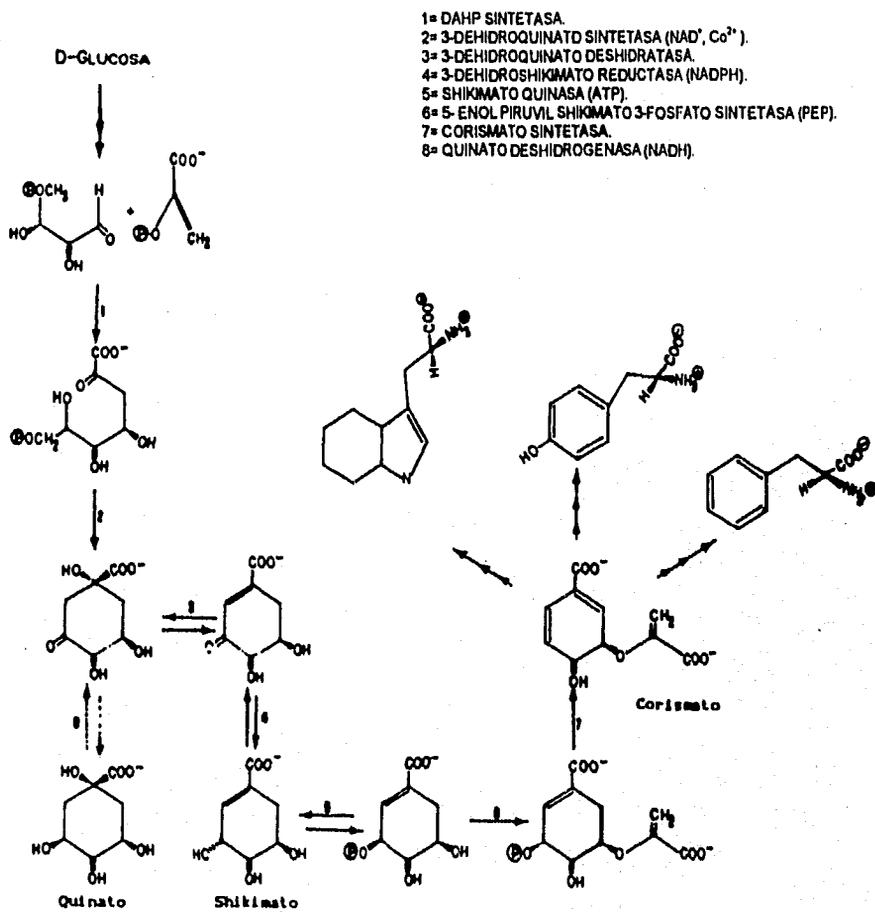


Figura No. 1.2. Ruta del shikimato de síntesis de aminoácidos aromáticos.

También se han seleccionado compuestos derivados del ácido quínico y el ácido bórico como: 3,4 fenilboronato quinida, 3,4 isopropiliden quinida, borato del ácido quínico, borato spiro del ácido quínico, ácido bórico, ácido fenilborónico y el inositol.

Es importante mencionar que la elección de estudiar compuestos derivados de boro se debe a que es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas. El boro⁽¹³⁾ tiene un papel importante en el transporte de carbohidratos con efectos sobre la transpiración (a través del control en la formación de almidón y azúcar), metabolismo de carbohidratos, desarrollo de células y elongación, síntesis de proteínas y formación de aminoácidos. Además se sabe que una deficiencia de Boro en la planta causa una disminución en la producción de almidón y azúcar, retarda el nuevo crecimiento y desarrollo y afecta la bomba de Ca y K, transpiración y transporte de los nutrimentos en la fotosíntesis.

Otros estudios han sugerido que el boro⁽¹³⁾ es efectivo para incrementar la producción y calidad de almacenaje del ajo.

Debido a las propiedades físicas y químicas del boro, actualmente es usado en quimioterapias^(14, 15). Se ha desarrollado una terapia contra el cancer llamada "Terapia de captura de neutrones por Boro (BNCT)", esta terapia requiere de ligantes específicos para las células tumorales para lograr la selectividad tumoral requerida, para ello se han estudiado análogos de boro con nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos, péptidos porfirinas, etc.

Para que un herbicida salga al mercado se requiere de mucho tiempo y la realización de muchos estudios. Una fase de estos estudios es la que se presenta en este trabajo y consiste en la determinación de los efectos que presentan los

compuestos, en las diferentes actividades fotosintéticas en cloroplastos de hojas de chícharos.

La fotosíntesis es un proceso muy complejo en el cual intervienen una serie de enzimas localizadas en la estructura membranal de tilacoides y en la fase acuosa del estroma de los cloroplastos. Estamos interesados en identificar los efectos que tienen algunos compuestos en los eventos fotosintéticos de las enzimas redox del tilacoide del cloroplasto de plantas superiores, por lo que es necesario describir brevemente la morfología de ellos así como la serie de reacciones que ocurren en el proceso de la fotosíntesis.

1.3. MORFOLOGIA DE CLOROPLASTOS

Los cloroplastos existen en una gran variedad de formas esféricas, elíptica o discooidal, tiene un diámetro de 4 a 10 μm .⁽¹⁶⁾

Los cloroplastos están rodeados por una envoltura constituida por un sistema de doble membrana; la membrana externa es una barrera permeable que regula la entrada y salida de los sustratos y productos de la fotosíntesis, la membrana interna presenta una gran organización estructural con regiones muy compactas que tienen aspecto de disco, estas pilas reciben el nombre de grana, y los discos, se llaman tilacoides. Las pilas de grana están comunicadas entre sí por estructuras lamelares llamadas intergrana. La membrana de los tilacoides está formada por una bicapa lipídica es la que se encuentran los complejos cosechadores de luz (LHC), los fotosistemas I y II, el complejo de citocromos y el complejo adenosín trifosfato sintetasa.

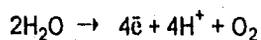
Los sistemas membranales están estructurados de acuerdo al modelo del mosaico que consiste de una capa de fosfolípidos en donde las cadenas hidrofóbicas se orientan hacia el interior y las cabezas polares hacia el exterior, en estas membranas es donde se lleva a cabo la reducción del nicotinamida adenosinucleótido (NADP⁺) y la síntesis del trifosfato de adenosina (ATP), necesaria para la fijación y asimilación de CO₂.

En el interior del organelo se encuentra la matriz o estroma que contiene a las enzimas solubles que catalizan las reacciones oscuras de la fotosíntesis, enzimas para el metabolismo, ácidos nucleicos (DNA, RNA), ribosomas y gránulos de almidón.

Las regiones apiladas y las laminillas del estroma contienen cerca del 30% de la clorofila, tiene la mayor parte del fotosistema I y del complejo de ATP sintasa (Cf₀-Cf₁) y sólo un 10-20 % del fotosistema II.⁽¹⁷⁾

1.4. FOTOSÍNTESIS

Es el proceso que realizan algas y las plantas superiores, utilizando energía solar, agua, sales minerales y dióxido de carbono atmosférico para elaborar carbohidratos y oxígeno.



La fotosíntesis convencionalmente se divide en dos fases: la fase oscura y la fase luminosa.

La fase oscura se lleva a cabo en el estroma del cloroplasto, comienza con la fijación de dióxido de carbono a la ribulosa 1-5 difosfato catalizada por la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa en plantas C₃ y que es convertido en varios pasos catalíticos a

hexosas en el ciclo de Calvin.⁽¹⁸⁾

La fase luminosa, mejor conocida como reacción de Hill o cadena transportadora de electrones o cadena redox, consiste de reacciones dependientes de la luz que involucran la absorción de energía (en forma de luz), transferencia de energía por los pigmentos, separación de cargas por el par centro de reacción-aceptor primario, transporte de electrones en enzimas redox, creación de gradiente electroquímico de protones, utilización de este gradiente para síntesis de ATP y reducción de NADP⁺.⁽¹⁹⁾

Estas reacciones se llevan a cabo en la membrana de los tilacoides con la participación en serie del fotosistema I y II y cuya discusión es más relevante en el presente trabajo.

PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

En la membrana de los tilacoides del cloroplasto se encuentran localizados los pigmentos cosechadores de luz o pigmentos antena, su función es proveer a la planta de un eficiente sistema de absorción de luz a través de todo el intervalo de luz visible.

Los pigmentos antena absorben luz dando inicio al proceso de la fotosíntesis, el proceso de convertir un fotón de energía luminosa en energía química ocurre en sitios denominados centros de reacción, estos sitios tienen una organización y posición bien definida en la membrana.

Hay dos tipos de centros de reacción: el centro de reacción del fotosistema I y el centro de reacción del fotosistema II, los centros de reacción contienen sólo una pequeña fracción de los pigmentos (aproximadamente 1%), tienen un conjunto de

moléculas especializadas de clorofila A, probablemente organizadas como dímeros unidos a proteínas, las cuales después de la excitación electrónica actúan como donador de electrones primario.⁽²⁰⁾

Los pigmentos fotosintéticos de las plantas superiores que forman parte en la absorción de la luz se clasifican en dos grupos: las clorofilas y los carotenoides.

Las clorofilas son los pigmentos que dan el característico color verde a las plantas. La molécula de clorofila es un complejo magnesio-porfirina (tetrapirroles cíclicos), poseen una larga cadena lateral formada por 20 átomos de carbono que corresponde a un alcohol o fitol, esta cadena alifática puede interactuar con proteínas y quizá con lípidos. En la transferencia de cargas las clorofilas pueden actuar como donadores y aceptores de electrones.⁽²¹⁾

En las plantas superiores hay dos clases de clorofilas que son designadas como clorofila A y clorofila B. La clorofila A se encuentra en mayor proporción en las plantas superiores y todas las algas, es débilmente fluorescente, presenta diversos máximos de absorción en longitudes de onda larga: 660, 670, 680, 685, 695 y 720 nm, se encuentra predominantemente en el fotosistema I. Las clorofilas A de longitud de onda corta son fluorescentes y se encuentran predominantemente en el fotosistema II.⁽¹⁶⁾

La molécula de clorofila A es el componente más importante de los pigmentos antena y de los centros de reacción, puede actuar como aceptor de electrones mediante el átomo central de magnesio y como donador esencialmente a nivel de los grupos carbonilo.

La clorofila B se encuentra en plantas superiores y en vegetales verdes, presenta máximos de absorción en 640 y 650 nm y la mayor proporción de ésta se

encuentra en el fotosistema II. En su estructura molecular contiene dos átomos de hidrógeno menos y uno de oxígeno más que la clorofila A.

Los carotenoides son pigmentos amarillos y anaranjados, comúnmente son llamados pigmentos accesorios, son moléculas grandes de poliisoprenoides que poseen dobles enlaces conjugados; cada extremo de la molécula contiene un anillo de ciclohexeno sustituido insaturado.

La función principal de los carotenoides es absorber luz en regiones del espectro visible en donde las clorofilas no la absorben; además ayudan a proteger a las clorofilas de la fotooxidación.⁽²²⁾

En el cloroplasto hay principalmente dos clases de pigmentos carotenoides: los carotenos y los carotenoles.

Los carotenos son hidrocarburos isoprenoides, los más abundante son los β carotenos y se encuentran principalmente en el fotosistema I. Los carotenoles son alcoholes, comúnmente son llamados xantófilas y se encuentran localizados en el fotosistema II.⁽¹⁸⁾

ABSORCIÓN DE LA LUZ

Las serie de reacciones que se llevan a cabo en la fase luminosa de la fotosíntesis comienza con la absorción de la luz por los pigmentos fotosintéticos de las plantas.

La luz visible es una forma de radiación electromagnética que se propaga en forma de fotones o quanta, el contenido de energía de un fotón se representa por $h\nu$.

Cuando los pigmentos fotosintéticos de la planta absorben luz, algunos electrones absorben energía y se hallan en estado excitado. La molécula excitada

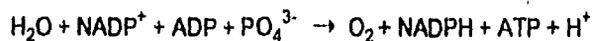
puede seguir dos rutas, una es que regrese a su estado de baja energía o estado fundamental con emisión simultánea de la energía absorbida durante la excitación, en forma de luz (fluorescencia), como calor o mediante ambas formas; la otra ruta es que la molécula excitada reaccione fácilmente con otra, por lo que la molécula excitada puede perder un electrón que cede a la otra molécula reaccionante.

Al absorber luz los pigmentos antena transfieren la energía, en forma de fotones, a los centros de reacción mediante el proceso de transferencia de energía, la eficiencia de esta transferencia es alta, sobre todo si se considera que la probabilidad de transferir un cuanto de luz entre dos pigmentos es más grande que la de competir por algún otro proceso tal como la fluorescencia, formación de estados metaestables o desperdicio fotoquímico. Como los procesos fotosintéticos ocurren en nanosegundos, la transferencia de la luz a través de la antena cosechadora y el sistema de pigmentos al centro de reacción deberán ocurrir en un tiempo mucho más corto.⁽²¹⁾

Al ser absorbida la luz por la clorofila y los carotenoides es transmitida al centro de reacción donde es convertida en energía química produciendo un equivalente de una especie oxidante y otro de una especie reductora. Es entonces cuando se reduce el aceptor primario de electrones quedando oxidado el centro de reacción que vuelve a su estado original cuando acepta electrones de un donador, la repetición de este proceso depende de la absorción de la luz, así continúa el transporte de electrones desde el H_2O hasta el $NADP^+$.

1.5. TRANSPORTE DE ELECTRONES

La reacción global de la fotosíntesis en la fase luminosa es un proceso no cíclico que conduce a la síntesis de ATP y NADPH, la reacción que se lleva a cabo la podemos representar de la siguiente manera:



Para que se lleve a cabo la reacción, las plantas requieren de cuatro cuantos de luz por cada NADP reducido y de otro a diez cuantos de luz para liberar una molécula de oxígeno.

El flujo de electrones del agua al dióxido de carbono se da en contra de un gradiente electroquímico de 1,2 volts; cuatro electrones deben ser transferidos, uno a la vez, al fotooxidar dos moléculas de agua, para liberar oxígeno molecular y reducir una molécula de dióxido de carbono a carbohidratos.

La reducción de NADP por el agua requiere de dos eventos fotoquímicos, los cuales no fotoactúan por sí mismos en forma eficiente; sin embargo, su eficiencia en la conversión de la energía se incrementa satisfactoriamente con la intervención de los fotosistemas I y II.⁽²³⁾

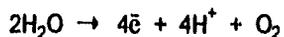
Los fotosistemas I y II están conectados entre sí por una serie de acarreadores de electrones móviles para transportar equivalentes reductores del fotosistema II al fotosistema I.

El proceso fotosintético comienza con la absorción de un fotón de luz por los pigmentos antena del fotosistema II, los pigmentos antena contienen de 300 a 400 moléculas de clorofila integradas en complejos cosechadores de luz y asociados a los

centros de reacción.

La energía de excitación es transmitida por resonancia a una molécula de clorofila A en el centro de reacción de la unidad fotosintética, la molécula es designada como P_{680} . La reacción fotoquímica del FS II reduce al aceptor primario I, el cual es una feofitina, generando una pareja de un oxidante fuerte- reductor fuerte, el producto es el par de radicales P_{680}^+ - feofitina $^-$. La feofitina transfiere inmediatamente un electrón a $Q_A^{(24)}$ (se produce una semiquinona), quedando Q_A^- reducida; P_{680}^+ al ser un oxidante fuerte acepta inmediatamente un electrón del donador Z oxidándolo a Z^+ .

El componente Z dona cuatro electrones (requiriendo cuatro fotocuantos) al centro de reacción P_{680} quedando con cuatro cargas positivas, las cuales son eventualmente neutralizadas por cuatro electrones provenientes de la oxidación de dos moléculas de agua con liberación de oxígeno y cuatro protones al medio.



Q_A^- reduce a Q_B (quinona unida a un polipéptido). Q_B^- reduce una molécula del almacén de plastoquinonas (la reducción total de una plastoquinona involucra 2 electrones y 2 protones).

La P_Q (plastoquinona) transfiere el electrón al complejo citocromo b_6f y posteriormente lo cede a la PC (plastocianina). De la plastocianina los electrones van del fotosistema I a través del P_{700} .

P_{700} y P_{680} absorben simultáneamente luz por medio de sus propios pigmentos antena. Una vez que P_{700} se encuentra en un estado excitado es capaz de donar electrones de uno en uno produciendo la reducción del aceptor primario de electrones A_0 , y se genera el par P_{700}^+ - A_0^- . A_0^- transfiere su electrón al aceptor A_1 y el P_{700}^+

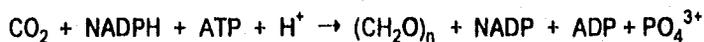
oxidado acepta electrones de la plastocianina reducida. A_1^- reduce a un aceptor de bajo potencial que contiene Fe y que se denota como X.

Los siguientes componentes de la cadena, que son dos centros de FeS, denotados como A y B aceptan electrones; el centro A (FeS) los transfiere a la ferredoxina que también es un centro FeS y de ésta pasan al $NADP^+$ para producir NADPH. Esta última reacción es catalizada por la enzima ferredoxina- $NADP^+$ reductasa.

En la reacción de Hill, además de producirse NADPH y oxígeno, se originan un gradiente de pH al oxidarse la molécula de agua y reducirse la plastoquinona, y un gradiente químico de cationes ($\Delta\phi$) Mg^{++} y K^+ . Estos cationes fluyen en sentido contrario a los H^+ cuando se iluminan los cloroplastos; la suma de estos componentes proporciona la energía libre necesaria para la síntesis de ATP.⁽²⁵⁾

Vale la pena mencionar que X^- no siempre dona su electrón para reducir el $NADP^+$ ya que puede regresar su electrón a un acarreador intermedio probablemente vía citocromo b_6 o reducir a otras enzimas como la tioredoxina. Cuando el transporte ocurre de esta manera forma un circuito cerrado en el cual sólo se utiliza el fotosistema I y se conoce como transporte de electrones cíclico. La producción de energía libre para la síntesis de ATP se lleva a cabo entre P_0 y el $cit\ b_1$ y el primer sitio de generación de energía libre es la fotólisis del H_2O .

Los productos de la reacción luminosa ATP y NADPH son utilizados para la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono en el ciclo de Calvin.



1.6. COMPONENTES Y ENZIMAS REDOX DE LA REACCION DE HILL

Las enzimas de oxido-reducción que participan en el transporte de electrones generalmente son más complejas en su estructura y mecanismo de acción que otro tipo de enzimas y por lo tanto menos conocidas dado que son liposolubles.

La mayoría de los componentes del transporte de electrones se encuentran en la membrana tilacoidal del cloroplasto por lo que su extracción y purificación resulta difícil, razón por la cual se conocen poco químicamente.

En el flujo de electrones de agua a oxígeno molecular participan diferentes tipos de enzimas y proteínasceptoras de electrones, entre ellas se pueden mencionar:

Las ferrosulfoproteínas, son proteínas que contienen hierro y azufre en cantidades equimolares; reciben el nombre de centros hierro-azufre. Estas proteínas actúan como transportadores de electrones, la primera en descubrirse fué la ferredoxina⁽²⁷⁾ cuyo potencial redox de $E'_0 = -0,42$ V, es soluble en agua y se encuentra ubicada en el exterior de la membrana, funciona como acarreador de electrones hacia el NADP^+ a través de la enzima Fd- NADP^+ reductasa.

Otros componentes de la cadena son:

P_{700} cuyo potencial redox $E'_0 = +0,43$ V. Hay evidencia que demuestra que P_{700} está constituido por un dímero de clorofila A' que es un epímero C 10 de la clorofila A unido a proteína.⁽²⁸⁾

A_0 es el aceptor primario de electrones del fotosistema I, es una molécula de estructura similar a la clorofila A y probablemente también se encuentra formando un dímero.

X es un aceptor de electrones que contiene hierro, su potencial redox es $E'_0 = -0,73$ V. Los centros hierro-azufre A y B presentan un potencial redox de $E'_0 = -0,55$ V y $E'_0 = -0,59$ V respectivamente.

P_{680} está formado por un dímero de la clorofila A unido a proteína su potencial de reducción es alrededor de $E'_0 = 0.81$ V.

La feofitina es una molécula de estructura similar a la clorofila, la diferencia es que en la feofitina el átomo central de magnesio es reemplazado por dos átomos de hidrógeno. En solución se ha encontrado que la feofitina tiene un potencial alrededor de $-0,64$ V.⁽²¹⁾

Q_A es una plastoquinona A unida a proteína que al reducirse da una semiquinona, la transferencia de un hidrógeno o de un electrón a una molécula de FAD (flavin-adenin-dinucleótido) o FMN (flavin-mono-nucleótido) conduce a la formación de una semiquinona o forma semireducida del flavin nucleótido.⁽²²⁾

Q_B es una quinona tipo plastoquinona A unida a un polipéptido de 32 KD que además tiene unido hierro.

La plastoquinona A (PQ_A) es el acarreador más abundante de la cadena transportadora de electrones. Hay cerca de 10 moléculas de plastoquinona⁽²⁸⁾ por cadena transportadora de electrones, son dos quinonas liposolubles con un potencial redox $E'_0 = 0,1$ V. La plastoquinona reducida es un acarreador móvil que puede difundirse libremente a través de la membrana regresando a la superficie interna del tilacoide donde la PQH_2 (plastoquinona reducida) libera los protones dentro del tilacoide y transfiere sus electrones a $cit\ b_6f$.

Los citocromos son proteínas transportadoras de electrones que contienen una

ferroporfirina, sólo se encuentra en células aeróbicas; el citocromo b_{6f} es un complejo formado por un citocromo f con un grupo hemo unido covalentemente a una proteína de 34 KD; dos citocromos b en el que el grupo hemo no está unido de modo covalente y por tanto participa en el flujo cíclico de electrones alrededor del complejo y una proteína con un centro hierro-azufre, a este complejo formado por tres enzimas redox se conoce como complejo b_{6f} o plastoquinona oxidasa PC reductasa.⁽³⁰⁾

La plastocianina es una proteína que contiene un átomo de cobre por molécula, su peso molecular es de 10 500 daltones. En forma oxidada (Cu^{2+}) tiene un característico color azul, su potencial redox es $E'_0 = 0,37 V$, esta enzima se reduce a $PC(Cu^+)$. Se encuentra fuertemente enlazada a la superficie interior del tilacoide.⁽³¹⁾

En la figura 1.4 se muestra la trayectoria de electrones de agua a $NADP^+$ en la fotosíntesis.

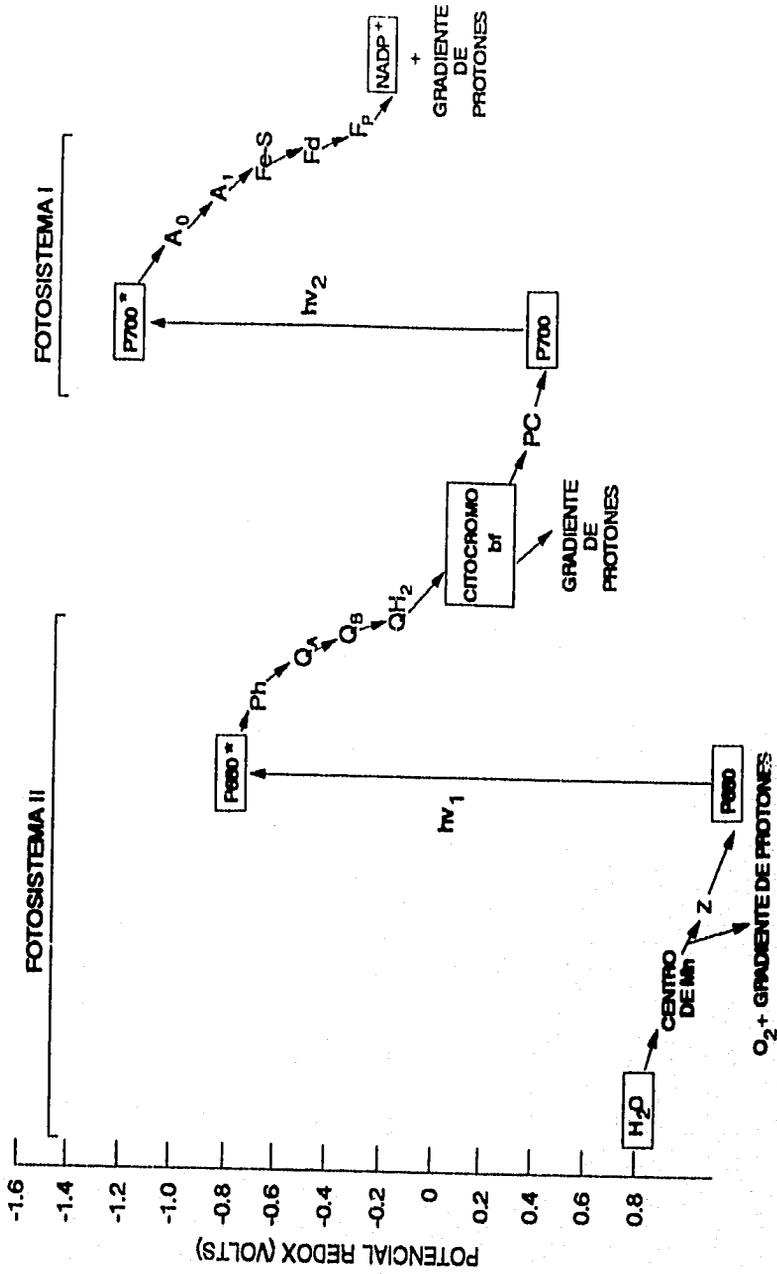


Figura 1.4. Trayectoria de electrones de agua a $NADP^+$ en la fotosíntesis

1.7. SÍNTESIS DE ATP

En los últimos años ha sido de gran controversia el tema del mecanismo por el cual se acopla el flujo de electrones a través de la cadena redox de la fotosíntesis a la síntesis de ATP.

Se han desarrollado varias hipótesis para explicar el mecanismo por el cual el flujo de electrones puede dar lugar a la formación de moléculas de alto contenido energético. Tres son las hipótesis que han atraído una mayor atención: la del acoplamiento químico, la del acoplamiento conformacional y la del acoplamiento quimiosmótico.⁽³²⁾

HIPÓTESIS QUÍMICA

Fue la primera hipótesis propuesta para interpretar el mecanismo de la síntesis de ATP. Postula que durante el transporte de electrones se produce energía que se acopla a la síntesis de ATP, a través de un intermediario químico de elevada energía que involucra un enlace covalente entre este intermediario y un acarreador de electrones, el intermediario aporta la energía necesaria para la formación de ATP a partir de ADP y P_i .⁽³³⁾

Esta hipótesis prevaleció durante mucho tiempo, sin embargo, tiene dos limitaciones. Una de ellas es que el mencionado intermediario químico de elevada energía no ha sido detectado y después de una intensa búsqueda se ha llegado a la conclusión que tal intermediario no existe. La segunda es que la hipótesis no proporciona una explicación acerca de que la membrana interna deba permanecer intacta y continua, como una vesícula cerrada, para que tenga lugar la síntesis de

ATP.⁽³⁴⁾

HIPÓTESIS CONFORMACIONAL

Postula que durante el transporte de electrones se produce un estado energizado de la membrana transductora. Este estado de energía o condición energética se debe a las diferentes concentraciones de H^+ o electrones dentro de la membrana, ocasionadas por la expulsión de H^+ de la membrana, durante el transporte de electrones.

Tales distribuciones de carga en la membrana producen cambios en los estados conformacionales de las proteínas embebidas en la membrana. La energía inherente del estado conformacional de elevada energía de la proteína es empleado para la síntesis del ATP; simultáneamente las proteínas regresan a su estado original de bajo contenido energético.

Una observación que favorece esta hipótesis es que la membrana tilacoidal experimenta cambios fisicoquímicos muy rápidos a medida que los electrones fluyen a través de la reacción de Hill. Así como el CF_1 que sufre cambios conformacionales en la transición oscuridad-iluminación durante la fotofosforilación detectados por modificación química de grupos-SH de la subunidad γ , incorporación de agua tritiada en dicha transición, fluorescencia en una de las conformaciones de fluoróforos, aunque no han reportado una correlación Δ conformación y síntesis de ATP.^(22, 35)

HIPÓTESIS QUIMIOSMÓTICA

Gran parte de los resultados que existen en la literatura relacionan a la hipótesis quimiosmótica como el mecanismo básico de la fosforilación.

La hipótesis quimiosmótica postula que:

La membrana constituye una parte integral del mecanismo de acoplamiento entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP, debe estar intacta y con baja permeabilidad a protones en una membrana acoplada para una óptima fotosforllacion.⁽³⁶⁾

Las enzimas redox transportadores de electrones se encuentran formando parte de la estructura membranal del tilacoide, dispuestos asimétricamente en la membrana de tal forma que las reacciones puedan operar vectorialmente, en dirección definida, es decir que las reacciones en las que reaccionan protones con los acarreadores enzimáticos en el exterior del tilacoide (estroma) se trasloquen en la cara interna de la membrana tilacoide (el lumen) y durante la oxidación de los acarreadores se produzca un gradiente pH que posteriormente es utilizado en flujo de H⁺ (CF_o) para la fotosforllacion.⁽³⁷⁾

El flujo neto de protones a través de la membrana provoca que el interior sea más ácido y más positivo que el exterior, es decir se crea un gradiente de carga o potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) y gradiente de protones (ΔpH), que son función de la concentración relativa de iones a través de la membrana. A la suma de ambos gradientes se les denomina gradiente electroquímico o fuerza protón-motriz.⁽³⁸⁾

El intermediario de alta energía entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP es el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$) o fuerza protón-motriz) que se expresa:

$$\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\Psi + (\Delta\text{pH}) RT/F$$

Donde a $\Delta\mu\text{H}^+$ se expresa en milivoltio, R es la constante de los gases, T la

temperatura absoluta y F es la constante de Faraday.⁽³⁹⁾

Las evidencias que apoyan esta hipótesis son:

Cuando los cloroplastos son sometidos a la acción de luz en condiciones adecuadas para que realice el transporte de electrones, se puede observar que el medio en el que se encuentran suspendidos se hace más alcalino, debido a que los cloroplastos acarrear protones en el interior del tilacoide.

Se ha comprobado que se necesita una membrana intacta e impermeable a protones para que se alcance el medio y después se realice la síntesis de ATP utilizando el ΔpH .

Se ha demostrado que durante el flujo de electrones en la cadena redox se acarrear protones al interior de la membrana del tilacoide llamado captación de protones y que la síntesis de ATP va acompañada por el movimiento de protones hacia el exterior, acarreados por el canal de protones CF_0 que los transporta al sitio catalítico de CF_1 .⁽⁴⁰⁾

Otra evidencia que refuerza la hipótesis quimiosmótica es que al sumergir los cloroplastos en un medio ácido artificial, para descender su pH interno, y mezclar rápidamente, en la oscuridad, con un medio que contiene ADP y fosfatos tamponados a $pH = 8,5$, se crea un gradiente de pH a través de la membrana que es utilizado estequiometricamente en la síntesis de ATP. En otras palabras, al imponer artificialmente un gradiente de pH a través de la membrana del cloroplasto se puede sintetizar ATP sin necesitar energía luminosa demostrándose que la H^+ -ATPasa utiliza el gradiente de pH, que en condiciones fisiológicas es generado por la cadena redox cuando se ilumina con luz visible.⁽⁴⁰⁾

1.8. CLASIFICACIÓN DE HERBICIDAS

Los herbicidas que específicamente inhiben la fotosíntesis, presentan baja toxicidad en mamíferos, por ello el aparato fotosintético es utilizado para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad herbicida potencial.⁽⁷⁾

Los medios por los cuales, la fotosíntesis puede ser inhibida por herbicidas incluye interferencias en la reproducción, desarrollo, estructura e integridad de cloroplastos, rutas biosintéticas y rutas involucradas en la conversión de energía radiante a energía química.⁽⁴¹⁾

Los herbicidas que específicamente afectan las reacciones fotoquímicas de cloroplastos aislados de hojas de espinaca o chícharo pueden ser clasificados como:

Inhibidores del transporte de electrones o de la reacción de Hill.

Desacoplantes

Inhibidores desacoplantes

Inhibidores de la transferencia de energía

Aceptores de electrones.

INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES

Los inhibidores del transporte de electrones o inhibidores de la reacción de Hill son herbicidas que actúan eliminando o inactivando uno o más enzimas redox de la cadena de oxido-reducción del cloroplasto.

Por ejemplo, los herbicidas que interaccionan con la enzima redox Q_B ,

provocan cambios conformacionales que afectan su estructura tridimensional y por lo tanto, provocan cambios cinéticos y termodinámicos que se manifiesta por la inhibición del transporte de electrones.⁽⁴²⁾

Dentro de esta clasificación se puede mencionar al herbicida más estudiado el DCMU o mejor conocido como diurón, su sitio de inhibición no ha sido identificado para la satisfacción de todos los investigadores y existe controversia en la literatura, sin embargo, se cree que interacciona con unión no-covalente a nivel del polipéptido de 32 KD que es donde se une la plastoquinona en la enzima Q_B . El diurón compite con Q_B por el sitio de unión a la proteína de 32 KD, evitando que el electrón sea transferido a la plastoquinona.⁽⁴³⁾

Otro inhibidor conocido de la reacción de Hill es el DBMIB, que es un análogo de la plastoquinona, e interfiere con la función oxido-reducción de ésta. A concentraciones bajas ($1 \mu\text{M}$) actúa sobre el lado de la reducción de P_Q pero a concentraciones altas ($> 5 \mu\text{M}$) su acción es sobre el lado de la oxidación de la plastoquinona.⁽⁴⁴⁾

De los herbicidas que se comportan como inhibidores de la reacción de Hill en cloroplastos aislados se pueden mencionar: p-alquilanilidas, p-alquiltioanilidas, aminotriazinas, bis-carbamatos, ciclopropano-carboxamidas, triazinonas, piridazinonas, urea-carbamatos y uracilos.

DESACOPLANTES

Son compuestos químicos que disocian el acoplamiento entre el transporte de

electrones y la síntesis de ATP, disipando en algún punto el estado de alta energía de la membrana, antes de que ésta pueda ser utilizada para la formación de ATP.⁽⁴¹⁾

Los desacoplantes permiten el flujo de electrones en ausencia de ADP, fosfato inorgánico o magnesio, disipan el gradiente de pH al actuar como acarreadores de protones, por lo tanto desaparece la energía libre que contenía ΔpH , evitando la fosforilación del ADP a ATP, en cambio no afecta la velocidad del transporte de electrones desacoplado.⁽⁴⁵⁾

Hoy día se conocen muchos desacoplantes, la mayoría de ellos son sustancias liposolubles que contienen un grupo ácido y generalmente un anillo aromático, Entre los desacoplantes que resultan eficaces se encuentran los iones NH_4^+ , aminas simples, ciertos fenoles, atebrina, clorpromazina y el único herbicida que se ha reportado que funciona como un desacoplante ideal de la fosforilación a pH= 8 es la perfluidona.⁽⁴⁴⁾

Otra clase de desacoplantes son los ionóforos los cuales sólo actúan si se encuentran presentes ciertos cationes monovalentes. Estos desacoplantes son llamados ionóforos debido a que forman complejos liposolubles con cationes específicos facilitando su transporte a través de la membrana. Los ionóforos impiden la fotofosforilación porque obligan a los cloroplastos a utilizar la energía que se genera durante el transporte de electrones para bombear los cationes como K^+ y Na^+ al interior de la matriz en lugar de utilizarla para la síntesis del ATP. De esta clase se pueden mencionar a los antibióticos: valinomicina, nigericina y nonactina que necesitan la presencia de K^+ para ejercer su efecto inhibitor, otro de ellos es la gramicidina que actúa tanto en presencia K^+ como de Na^+ .⁽⁴⁶⁾

INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE LA ENERGIA

Son sustancias que actúan directamente sobre la fosforilación del ADP, se considera que interfieren en un paso terminal de la fosforilación uniéndose a el complejo de la H^+ -ATPasa.⁽⁴⁷⁾

Los inhibidores de la transferencia de energía evitan tanto la fosforilación como el transporte de electrones fosforilante, sin embargo, la adición de un desacoplante que proporciona una ruta alterna para disipar el gradiente de pH, permite el flujo de electrones a su máxima velocidad pero no la formación de ATP ya que no hay Δ pH. Algunos de los inhibidores de la transferencia de energía se considera que interfieren en un paso terminal de la fosforilación, sobre el factor 1 de acoplamiento y otros los hacen a través del canal de protones F_o .⁽⁴⁸⁾

El factor 1 de acoplamiento o ATPasa F_1 posee un peso molecular de 325 ± 6 KD, contiene cinco clases diferentes de subunidades proteicas, se encuentra en las superficies membranosas del tilacoide con una estequiometría $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$.⁽⁴⁹⁾ Juega por lo menos dos papeles en la fotofosforilación: cataliza el paso terminal de la fosforilación de ADP y la prevención de la salida rápida de protones del tilacoide.⁽⁵⁰⁾

Compuestos herbicidas que se comportan como inhibidores de la transferencia de energía incluyen a el Dio-9, que es un antibiótico, diciohexilcarbodimida, tris-n-butildoruro, el p-cloromercurobenzoato, el cloranfenicol, tentoxina, sulfatos y sintalina.

ACEPTORES DE ELECTRONES

Son compuestos que compiten por los electrones con algún cofactor de las enzimas de la reacción de Hill, experimentando una subsecuente reducción. Esta clase de compuestos tales como ferricianuro de potasio, PMS y FMN son utilizados para estudiar reacciones parciales de la reacción de Hill, y no son fitotóxicos.⁽⁵¹⁾

Dentro de esta clase podemos mencionar a las sales de bipyridilio tales como el diquat y paraquat (metilviológeno) que son capaces de competir con la ferredoxina por dos electrones, tienen un potencial redox entre -0,3 a -0,5 V y presentan actividad herbicida.⁽⁵²⁾

DESACOPLANTES INHIBIDORES

Los desacoplantes inhibidores son compuestos que presentan actividad de inhibidores de la reacción de Hill y desacoplantes. Esta clase de compuestos inhiben el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplante.

Algunos compuestos como los dinitrofenoles y alquildinitrofenoles son clasificados como desacoplantes, su efecto se observa a valores de pH alrededor de 6,0 la acción se atribuye a la forma protonada del compuesto, sin embargo a pH=8 estos compuestos se comportan como inhibidores del transporte de electrones, por tanto deben ser considerados como desacoplantes inhibidores.⁽⁴⁴⁾

Hay compuestos que en concentraciones altas se comportan como inhibidores del transporte de electrones y a concentraciones bajas presentan acción desacoplante,

de esta clase de compuestos se pueden mencionar a los N-fenilcarbamatos, acilanilidas, bencimidazoles sustituidos e imidazoles sustituidos.⁽⁵³⁾

Una comparación del comportamiento de los inhibidores de la reacción de Hill, desacoplantes e inhibidores de la transferencia de energía en cloroplastos aislados se muestran en la figura 1.5.⁽⁴⁸⁾

1.9. OBJETIVOS

1.- En este estudio buscamos determinar el efecto que tienen en la fotosíntesis en cloroplastos el ácido bórico y algunos derivados del ácido quínico: 3,4 fenilboronatoquinida, 3,4 isopropilidenquinida, ácido fenilborónico, borato del ácido quínico, borato spiro del ácido quínico y algunos metabolitos secundarios de plantas - como: ácido gálico, inositol y ácido shikímico tienen sobre las actividades fotosintéticas de los cloroplastos.

2.-Caracterizar los mecanismos de acción de los diferentes compuestos y clasificarlos de acuerdo a las propiedades que presenten en la fotosíntesis tales como:

Inhibidores de la reacción de Hill.

Desacoplantes

Inhibidores de la transferencia de energía.

Aceptores de electrones

Desacoplantes Inhibidores.

3.- Identificar el sitio de acción de estos compuestos.

CAPITULO 2

METODOS EXPERIMENTALES

2.1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS

El método de aislar cloroplastos intactos consiste en lo siguiente: a 50 g de hojas de chícharo (*Pisum sativum*) (lavadas previamente con agua destilada y refrigeradas una noche a 4 °C) se les quita la vena central y los tallos, se colocan en un vaso de licuadora con 100 mL de medio de aislamiento a 4 °C. Este contiene: sorbitol 0,35 M, cloruro de magnesio 5mM y cloruro de potasio 50 mM a pH 8,0 (tricina 1mM).

Se homogeniza durante 10 segundos a velocidad máxima con una licuadora y se filtra inmediatamente a través de 4 capas de gasa previamente humedecida con medio de aislamiento para eliminar pedazos de hojas remanentes.

Se centrifuga 2 veces a 3500 rpm en una centrifuga Beckman 21 durante 4 min, el sobrenadante se elimina y la pastilla de cloroplastos obtenida se resuspende cuidadosamente con un pincel de fibras suaves en 1 mL de medio de aislamiento. Se separan los cloroplastos en alícuotas de 0,5 mL y se mantienen en la oscuridad a 4 °C durante una hora antes de usarlos.

2.2. CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA

Existen dos tipos de clorofila la **A** y la **B** y cada una de ellas presenta un espectro de absorción diferente.

La cuantificación de clorofila se realiza por el siguiente método:

Se adicionan 20 µL de suspensión de cloroplastos a un matraz de 5 mL y se lleva al aforo con acetona al 80 % (en H₂O v/v), se transfiere a un tubo de centrifuga y se

mantiene en la oscuridad por 5 min, para extraer las clorofilas en acetona y evitar su degradación. Este procedimiento se hace por duplicado. Transcurrido el tiempo se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min para sedimentar las proteínas y los residuos de cloroplastos. Se lee la absorción del sobrenadante a 645 y 663 nm en un espectrofotómetro, como blanco se utiliza acetona al 80 % (en H₂O v/v).

Para la cuantificación de la clorofila⁽⁵⁴⁾ se utiliza la siguiente fórmula que se obtiene al aplicar la ley de Lambert-Beer, conociendo los valores de los coeficientes de extinción molar de las clorofilas a las dos diferentes longitudes de onda.

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{L/mL}) = 8,02 A_{663} + 20,29 A_{645}$$

2.3. DETERMINACION DE ACTIVIDADES BIOQUIMICA

Captación de protones

Síntesis de ATP o fotofosforilación

Transporte de electrones basal, fosforilante, desacoplante y reacciones parciales del fotosistema I y II.

Para evaluar la velocidad de captación de protones y la fotofosforilación se utiliza un método potenciométrico.

El equipo utilizado consiste de: un microelectrodo combinado de respuesta rápida, un potenciómetro de escala expandida (Corning model 12), un registrador (Beckman recorder) conectado al potenciómetro (a 10 mV y 1 mm/seg), un vaso termostático para mantener la temperatura de la suspensión constante, ya que por cada grado que aumenta la temperatura el pH disminuye 0,02 unidades⁽⁵⁾, un agitador magnético que ayuda a que la concentración sea uniforme y la mezcla homogénea, una fuente de iluminación

(Proyector Kodak S-AV con una lámpara de 500 watts) que proporciona 2×10^5 ergs cm^{-2} seg^{-1} , una lente de Izawa que funciona como filtro de infrarrojo y que además evita el calentamiento de la muestra debido a los destellos de la luz; generalmente se utiliza como lente de Izawa un matraz de 5 cm de espesor con agua y vestigios de sulfato de cobre.

CAPTACIÓN DE PROTONES

El método potenciométrico para determinar la velocidad de la captación de protones se basa en medir los cambios de pH o gradiente electroquímico de protones inducidos por la luz, en la membrana del tilacoide durante el transporte de electrones en la cadena redox.⁽⁵⁾

La medición de la captación de protones se realiza de la siguiente manera: en el vaso termostático se adiciona 3 mL de una solución que contiene sorbitol 0,35 M, MgCl_2 5 mM, KCl 50 mM la cual se tampona a pH= 8,0 con tricina 1 mM. Se adiciona 20 $\mu\text{g/mL}$ de cloroplastos, se ajusta el pH a $8 \pm 0,5$ con KOH 0,05 M, la suspensión se agita a velocidad constante y se ilumina a través de la lente de Izawa durante 1 minuto. Al iluminar la muestra el graficador registra los cambios de pH en función del tiempo. Cuando transcurre un minuto, la suspensión se deja de iluminar, se esperan 30 s y se calibra el sistema con una cantidad conocida de KOH 5 mM.

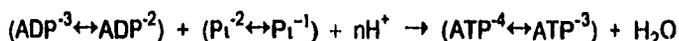
La determinación de este ensayo sirve para medir la actividad normal de los cloroplastos y se denomina control. Después, en otras alícuotas se determina el efecto que provoca la adición de los diferentes compuestos.

SINTESIS DE ATP O FOTOFOSFORILACIÓN

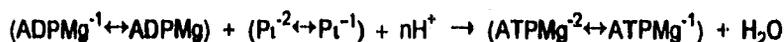
El gradiente electroquímico (ΔpH) que es generado a través de la membrana del tilacoide al iluminar los cloroplastos, provee la energía libre necesaria para la síntesis de

ATP.⁽⁵⁵⁾

El método potenciométrico⁽⁵⁶⁾ para evaluar la fotofosforilación se basa en medir los pequeños cambios de pH ocasionado por la disminución de la concentración de H⁺. En un intervalo de pH entre 7 y 9 la reacción puede ser expresada como:



donde el valor de $n = (\Delta\text{H}^+ / \Delta\text{P}_i)$ se calcula teóricamente. En presencia del ion magnesio, especialmente a $\text{pH} > 7$ se asume la formación del complejo de magnesio y la reacción puede ser expresada como:



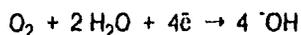
La medición de la velocidad de la síntesis de ATP se realiza en forma similar a la descrita para la captación de protones; la diferencia radica en que la solución para determinar la síntesis de ATP se le adiciona ADP y fosfato de sodio de forma que las concentraciones finales sean 1 mM y 3 mM respectivamente.

TRANSPORTE DE ELECTRONES

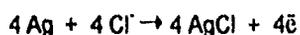
La medición del transporte de electrones basal, fosforilante, desacoplado y las reacciones parciales de los fotosistemas I y II se realizan por el método polarográfico.⁽⁴²⁻⁵⁷⁾

El equipo utilizado está constituido por un oxímetro (YSI modelo 5300) que cuenta con un electrodo tipo Clark, un graficador (Beckman recorder) conectado al oxímetro, un vaso termostático, una lente de Izawa y una fuente de iluminación.

El electrodo tipo Clark está compuesto por dos electrodos, uno es el cátodo de platino y el otro un ánodo de plata-cloruro de plata. En el primero se lleva a cabo la reducción del oxígeno proveniente de la fotólisis del agua:



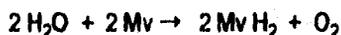
El otro es un ánodo de plata-cloruro de plata donde ocurre la reacción:



Ambos electrodos están inmersos en una solución concentrada de cloruro de potasio cubiertos por una membrana de polietileno o teflón de 25.6 μ de espesor, la membrana es permeable a gases (oxígeno) pero no a iones.

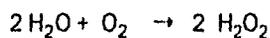
El usar este tipo de electrodo tiene varias ventajas, entre ellas podemos mencionar que las mediciones se pueden realizar fácil y rápidamente, es muy sensible a concentraciones bajas de oxígeno, el tener protegido el ánodo de plata evita que sea envenenado fácilmente por compuestos orgánicos, la superficie del electrodo está aislada física y eléctricamente de la muestra, además las sustancias que se depositan en la membrana se pueden remover fácilmente.

Durante el transporte de electrones se miden los cambios en la concentración de oxígeno, éste se desprende como producto de la fotólisis del agua en la reacción de Hill. Para que se lleve a cabo esta reacción en cloroplastos aislados se requiere de un aceptor artificial de electrones. Las reacciones que se llevan a cabo se representan de la siguiente manera:



donde Mv es metilvológeno.

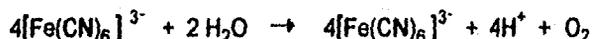
La reacción global, reacción de Melher, es un caso especial de la reacción de Hill.⁽⁵⁸⁾



La medición de los transportes de los electrones basal, fosforilante, desacoplado y las reacciones parciales se determinan esencialmente de la misma manera, la diferencia entre ellos está en la solución utilizada para la medición.

Los experimentos se realizan de la siguiente manera: en el vaso termóstático con 3 mL de la solución correspondiente al transporte de electrones que se va a medir, se adiciona una alícuota de cloroplastos intactos de 20 µg/mL. El electrodo se introduce en la solución evitando que queden burbujas de aire entre la suspensión y el electrodo, se mantiene en la oscuridad con agitación y cuando el oxímetro registra una lectura constante se ilumina con la fuente de iluminación a través de la lente de Izawa, simultáneamente el graficador registra la liberación de oxígeno en función del tiempo. Para la calibración se utiliza la solución correspondiente al transporte de electrones que se está determinando pero sin metilviológeno y se le adiciona 10 µL de ferricianuro 40 mM en donde un equivalente de ferricianuro acepta un equivalente de electrón cuando se reduce.

La reacción se puede expresar como:



Los experimentos se realizan como ya se ha mencionado; en todos los casos se realizan varias pruebas control, en otras alícuotas se realizan más pruebas adicionando concentraciones crecientes del compuesto y obtener mediciones de las diferentes actividades en función de la concentración de los compuestos.

La solución para medir el transporte de electrones basal contiene: sorbitol 100 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5mM y como aceptor artificial de electrones metilviológeno 50 µM; se

tamponó a pH 8.0 con tricina 10 mM.

El transporte de electrones fosforilante se determina en una solución semejante a la usada para el transporte de electrones basal pero se adiciona ADP y P_i (sustratos de la H^+ -ATP sintetasa) de forma que se tenga una concentración final sea de 1 y 3 mM respectivamente.

En el caso del transporte de electrones desacoplado, a la solución del transporte de electrones basal se le adiciona un desacoplante: NH_4Cl , de forma que su concentración final sea de 3 mM.

Si un compuesto se comporta como un inhibidor de la reacción de Hill, se determina el sitio de inhibición estudiando de manera independiente el flujo de electrones desacoplado de los fotosistemas I y II. Las reacciones redox de los fotosistemas, se pueden estudiar de manera independiente adicionando a la solución que se utiliza para determinar la actividad del transporte de electrones desacoplado, inhibidores y aceptores artificiales de uno u otro fotosistema.

Así para estudiar el fotosistema I se utilizan los siguientes inhibidores y aceptores artificiales (para obtener la concentración final que se indica).

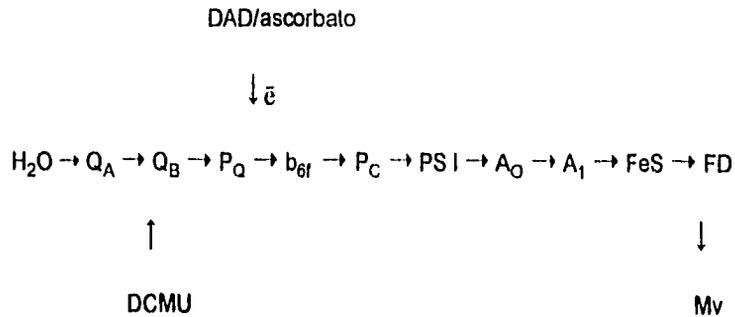
2,3,5,6 tetrametil p-fenildiamina (DAD) 50 μM

3-(3,4 diclorofenil)-1,1 dimetilurea (DCMU) 10 μM

Acido ascórbico 200 μM

Metilviológeno 50 μM

Si representamos la cadena del transporte de electrones en forma lineal el flujo de electrones se realiza de la siguiente manera:



El DCMU o diurón funciona inactivando la actividad del fotosistema II a nivel de Q_B ; el DAD dona electrones a la plastoquinona, para ello debe permanecer reducido, por la razón se adiciona ácido ascórbico; el aceptor de electrones es el metilviológeno:

En este caso, solo se está midiendo el flujo de electrones en el PSI; el flujo de electrones es del complejo b_{6f} al aceptor de electrones artificial Mv. Si el compuesto estudiado inhibe esta sección, se realizan más estudios para determinar el sitio de inhibición, estudiando fragmentos más pequeños de esta parte de la cadena de transporte de electrones con la adición de inhibidores de los que se conoce el sitio específico que inhibe.

Para estudiar el fotosistema II se adiciona a la solución los siguientes inhibidores y aceptores de electrones:

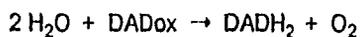
2,5 dibromo 3 metil 6 isopropil-1,4 benzoquinona (DBMIB) 2 μ M

2,3,5,6 tetrametil p-fenildiamina (DAD) 50 μ M

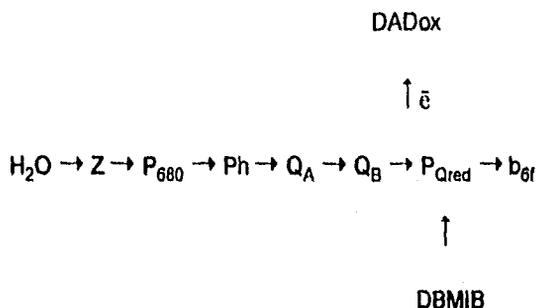
Ferricianuro de potasio 300 μ M

El DBMIB actúa inhibiendo la oxidación de la plastoquinona, el DAD actúa como aceptor de electrones y el ferricianuro de potasio es un oxidante del DAD.

La reacción que se lleva a cabo es:



Así el transporte de electrones se lleva a cabo del agua al DADox, como se muestra a continuación:



2.4. COMPUESTOS QUE SE CARACTERIZARÓN BIOQUÍMICAMENTE

Los compuestos que se caracterizan bioquímicamente en este trabajo son el ácido fenilborónico, 3,4 isopropilidenquinida, 3,4 fenilboronatoquinida, borato spiro del ácido quínico, inositol, ácido gálico, ácido bórico y ácido shikímico; los tres últimos compuestos se adquirieron de Aldrich. El resto de ellos fueron proporcionados por el CINVESTAV en donde se realizó la síntesis y caracterización química.⁽⁵⁹⁾

Para la realización de los experimentos se utilizaron soluciones de los compuestos en agua destilada y desionizada, en el caso de 3,4 fenilboronatoquinida y 3,4 isopropilidenquinida se adiciona 10 μL / mL de N-dimetilformamida para lograr la solubilización de la muestra. Para determinar el efecto que provoca la adición de este disolvente en los cloroplastos, se hace un control al cual se le agrega N-dimetilformamida para obtener la concentración que usualmente se utiliza en los ensayos.

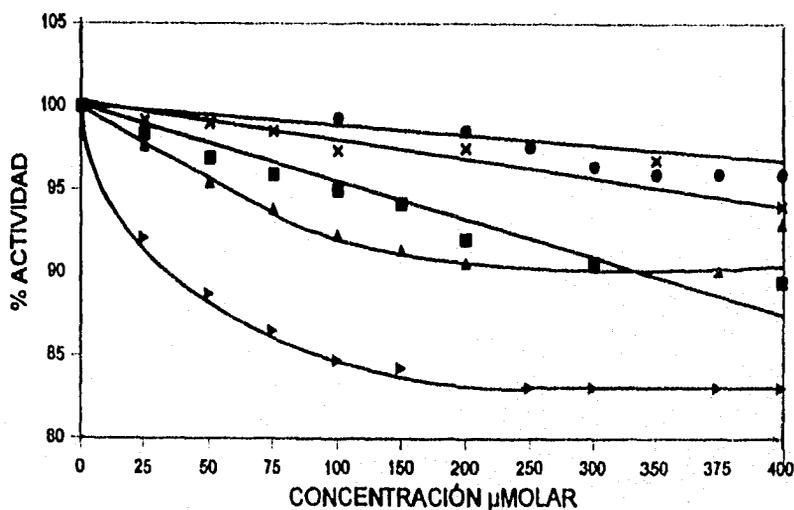
CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al ensayar los diferentes compuestos en cloroplastos aislados de hojas de chícharos para determinar el efecto que tienen en las actividades fotosintéticas en la fase luminosa se encontraron los siguientes resultados.

3.1. COMPUESTOS CON POCA ACTIVIDAD HERBICIDA

Debido a que la mayoría de los compuestos caracterizados en este trabajo son derivados del ácido bórico fue necesario determinar si este ácido afectaba las diferentes actividades que realizan los cloroplastos y se encontró, como muestra la gráfica 3.1.



Gráfica 3. 1. Captación de protones (▴), síntesis de ATP(■) y transporte de electrones basal (▲), fosforilante (●) y desacoplado (X) en función de la concentración de ácido bórico. Medidas en cloroplastos de hojas de chícharos.

La tabla 3.1 muestra los resultados del comportamiento del ácido bórico sobre las diferentes actividades bioquímicas que realizan los cloroplastos.

Actividad bioquímica	Concentración	Inhibición
Captación de protones	400 μM	17,6 %
Síntesis de ATP	400 μM	10,7 %
Transporte de electrones basal	400 μM	9,9 %
Transporte de electrones fosforilante	400 μM	7,8 %
Transporte de electrones desacoplado	400 μM	3,2 %

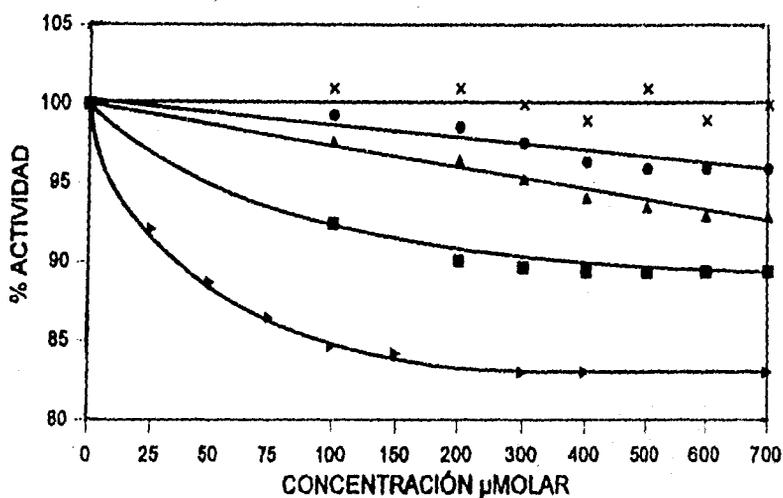
Tabla 3.1. Efecto del ácido bórico.

Los transportes de electrones fosforilante, desacoplado y la síntesis de ATP muestran comportamiento lineal, aunque el aumento de la inhibición es pequeño. No se consideró conveniente realizar ensayos a concentraciones mayores.

Si tomamos como referencia que el Barbano, es un herbicida ampliamente comercializado, desacopla completamente la fotofosforilación a 50 μM ⁽⁵³⁾ y que el DCMU que es un inhibidor de la reacción de Hill que inhibe a nivel de Q_B y que presenta un I_{50} (concentración a la cual se produce un 50 % de inhibición) podemos sugerir que el ácido bórico no presenta propiedades herbicidas.

3.2. COMPUESTOS QUE SE COMPORTAN COMO INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE LA ENERGÍA.

La gráfica 3.2 muestra el efecto del ácido shikímico como función de la concentración en la captación de protones, la síntesis de ATP y los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado medidas en cloroplastos aislados de hojas de chícharos, a un pH de 8 (tricina).



Gráfica 3.2. Efecto del ácido shikímico en la captación de protones (▶), síntesis de ATP(■) y transporte de electrones basal (▲), fosforilante (●) y desacoplado (X) en cloroplastos de hojas de chícharos.

De la gráfica 3. 2 podemos observar que el transporte de electrones desacoplado prácticamente no es afectado por la presencia de este ácido, mientras que las otras actividades presentan los siguientes resultados como podemos ver en la tabla 3.2.

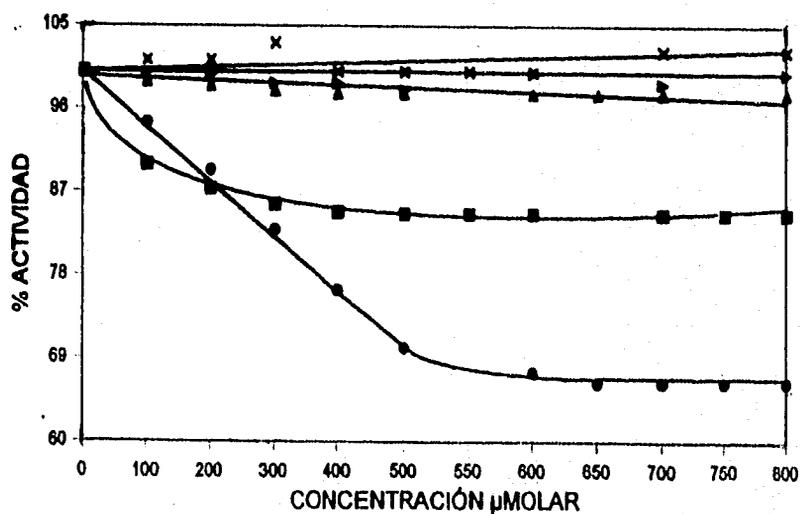
Actividad bioquímica	Concentración	Inhibición
Captación de protones	700 μM	17,3 %
Síntesis de ATP	700 μM	10 %
Transporte de electrones basal	700 μM	7,3 %
Transporte de electrones fosforilado	700 μM	3,2 %

Tabla 3.2. Inhibición que provoca el ácido shikímico.

Estos resultados indican que el ácido shikímico no actúa como inhibidor de la reacción de Hill, tampoco como desacoplante, por lo que se deduce que actúa como inhibidor de la transferencia de energía, probablemente interaccionando con el complejo H^+ -ATPasa o $\text{CF}_1\text{-CF}_0$.

De la gráfica 3.3 podemos observar que la presencia del ácido fenilborónico no afecta la actividad de la captación de protones ni el transporte de electrones basal aunque el transporte de electrones desacoplado presenta una ligera estimulación en su actividad.

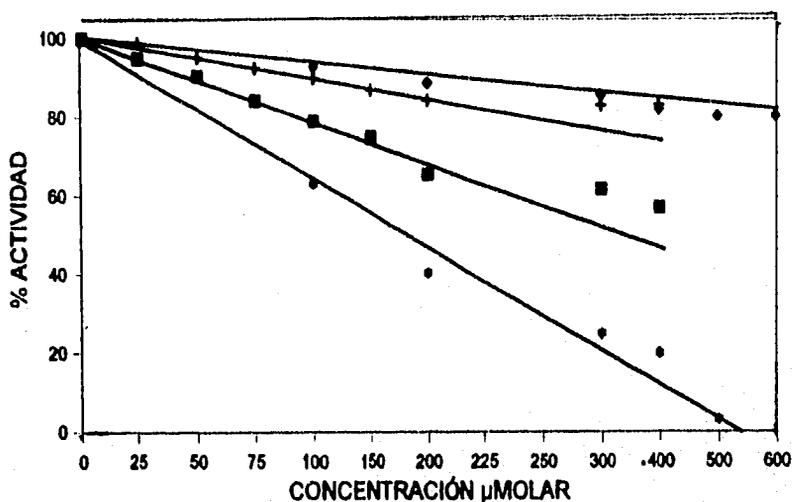
La síntesis de ATP y el transporte de electrones fosforilante presentan a una concentración de 800 μM , una inhibición de 15,4 % y 33,6 % respectivamente. Con estos resultados podemos proponer que el ácido fenilborónico se comporta como un inhibidor de la transferencia de energía, probablemente interaccionando con el complejo H^+ -ATPasa o $\text{CF}_1\text{-CF}_0$. Los compuestos que se comportan como inhibidores de la transferencia de energía se considera que inhiben en un paso terminal de la fosforilación probablemente inhibiendo con el complejo H^+ -ATPasa o $\text{CF}_1\text{-CF}_0$.⁽⁴⁸⁾



Gráfica 3.3 Efecto del ácido fenilborónico en la captación de protones (P), síntesis de ATP(■) y transporte de electrones basal (▲), fosforilante (●) y desacoplado (X) en cloroplastos aislados de hojas de chícharo.

3.3. COMPUESTOS CON PROPIEDADES DESACOPLANTES

La gráfica 3.4 muestra el efecto en la captación de protones que tienen el borato spiro del ácido quínico, el inositol, el ácido gálico y el 3,4 fenilboronatoquinida medidas en cloroplastos de hojas de chícharo.



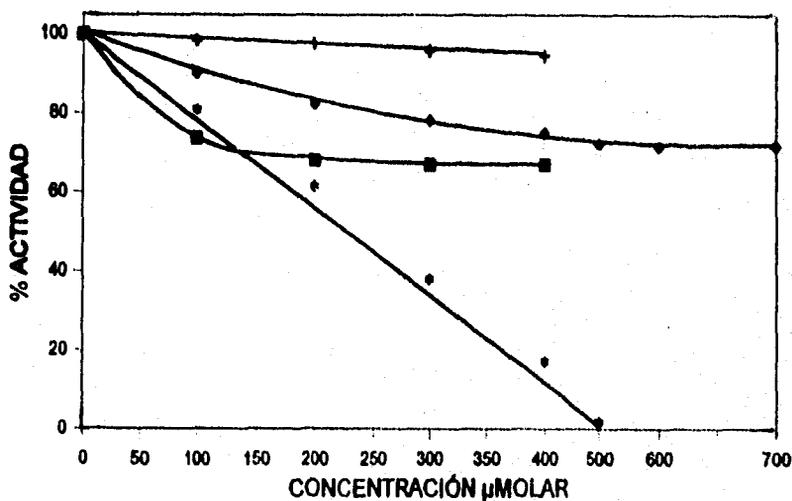
Gráfica 3.4. Captación de protones en presencia de inositol (■), 3,4 fenilboronatoquinida (♣), ácido gálico (♦) y borato spiro del ácido quínico (★), medidas en cloroplastos de hojas de chícharo.

La tabla 3.3 muestra la concentración y la inhibición que produce cada compuesto. El borato spiro del ácido quínico es el inhibidor más potente de esta actividad, inhibe 95 % a una concentración de 500 μM .

Compuesto	Concentración	Inhibición
Borato Spiro del ácido quínico	500 μM	94,5 %
Inositol	400 μM	42,9 %
Ácido gálico	700 μM	19,7 %
3,4 fenilboronatoquinida	400 μM	16,9 %

Tabla 3.3. Inhibición en la captación de protones.

La gráfica 3.5 muestra como afectan los compuestos antes mencionados la síntesis de ATP en cloroplastos de hojas de chicharo.



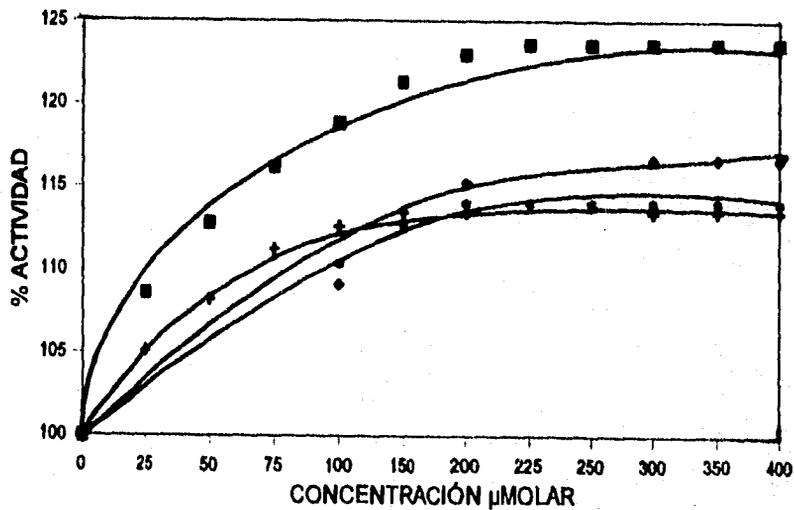
Gráfica 3.5. Síntesis de ATP en presencia de inositol (●), 3,4 fenilboronatoquinida (■), ácido gálico (◆) y borato spiro del ácido quínico (★).

El borato spiro del ácido quínico es el inhibidor más potente, presentando una inhibición de 100 % a una concentración de 500 μM , como podemos ver en la tabla 3.4.

Compuesto	Concentración	Inhibición
Borato Spiro del ácido quínico	500 μM	100 %
Inositol	400 μM	32,9 %
Ácido gálico	700 μM	30,7 %
3,4 fenilboronatoquinida	400 μM	5,4 %

Tabla 3.4. Inhibición en la síntesis de ATP.

La gráfica 3.6. muestra el efecto que tienen 3,4 fenilboronatoquinida, ácido gálico, inositol y borato spiro del ácido quínico en el transporte de electrones basal.



Gráfica 3.6. Transporte de electrones basal en presencia de inositol (■), 3,4 fenilboronatoquinida (⊕), ácido gálico (◆) y borato spiro del ácido quínico (★).

En la tabla 3.5 se muestran los porcentajes de activación del transporte de electrones basal con estos compuestos.

Compuesto	Concentración	Actividad
Borato Spiro del ácido quínico	400 μ M	114,6 %
Inositol	400 μ M	127,1 %
Ácido gálico	700 μ M	116,7 %
3,4 fenilboronatoquinida	400 μ M	109,3 %

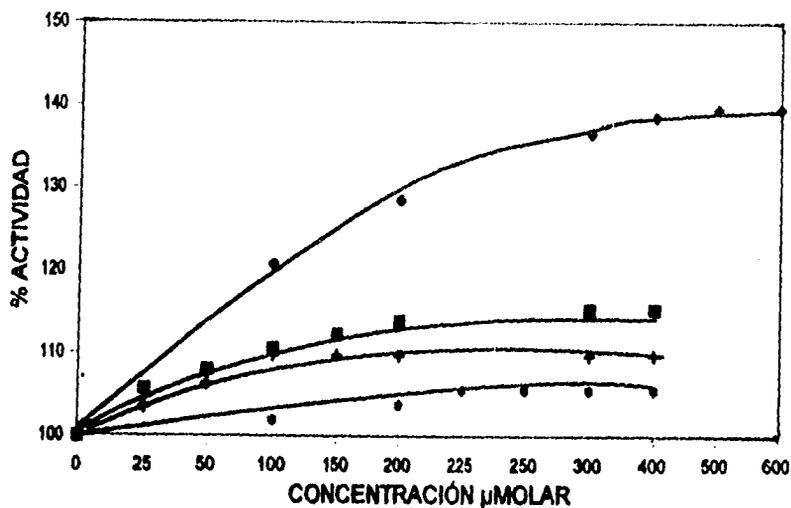
Tabla 3.5 Transporte de electrones basal.

El efecto sobre el transporte de electrones fosforilante de los compuestos antes mencionados se muestran en la tabla 3.6 en ella podemos ver que los compuestos aumentan el transporte de electrones fosforilante.

Compuesto	Concentración	Actividad
Borato Spiro del ácido quínico	400 μ M	105,2 %
Inositol	400 μ M	115,3 %
Ácido gálico	700 μ M	139,6 %
3,4 fenilboronatoquinida	400 μ M	107,1 %

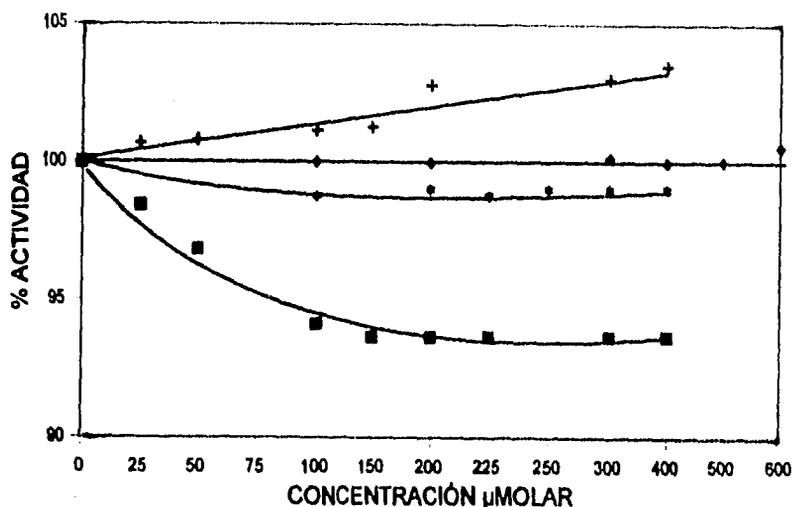
Tabla 3.6. Transporte de electrones fosforilante.

La gráfica 3.7. muestra como el 3,4 fenilboronatoquinida, ácido gálico, inositol y borato spiro del ácido quínico afectan el transporte de electrones fosforilante.



Gráfica 3.7. Transporte de electrones fosforilante en presencia de inositol (■), 3,4 fenilboronatoquinida (◆), ácido gálico (◆) y borato spiro del ácido quínico (▲), medidas en cloroplastos de hojas de chícharo.

La gráfica 3.8. muestra el efecto que tienen el 3,4 fenilboronatoquinida, ácido gálico, inositol y borato spiro del ácido quínico sobre el transporte de electrones desacoplado y podemos decir que este transporte de electrones no es inhibido por estos compuestos, aunque, solo el inositol es un inhibidor débil del transporte de electrones desacoplado ya que inhibe este transporte 6,4 % a una concentración de 400 μM.



Gráfica 3.8. Transporte de electrones desacoplado en función de la concentración de inositol (■), 3,4 fenilboronatoquinida (⊕), ácido gálico (◆) y borato spiro del ácido quínico (★), medidas en cloroplastos de hojas de chícharos.

De acuerdo a estos resultados podemos decir que los compuestos 3,4 fenilboronatoquinida, ácido gálico, inositol y borato spiro del ácido quínico tienen un comportamiento similar, es decir, todos se comportan como desacoplantes de la fotofosforilación al acelerar los transportes de electrones basal y fosforilante, no afectan el transporte de electrones desacoplado, en cloroplastos así como abatir el potencial electroquímico de protones en forma paralela al abatimiento de la síntesis de ATP.

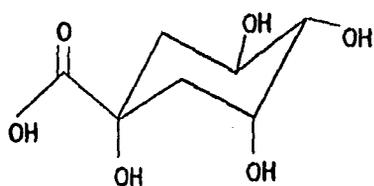
El aumento que hay en las actividades del transporte de electrones basal y fosforilante se debe a que los compuestos que se comportan como desacoplantes incrementan la permeabilidad de los tilacoides a protones y desacoplan la fosforilación

del flujo de electrones. Estos compuestos no inhiben la fosforilación pero sí disipan el gradiente electroquímico necesario para que la reacción se lleve a cabo, por lo que la síntesis de ATP se ve interrumpida.⁽⁴⁵⁾

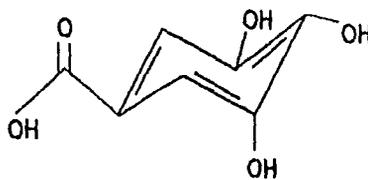
De acuerdo a la hipótesis quimiosmótica los desacoplantes son ácidos o bases débiles y lipofílicos que catalizan la destrucción del gradiente electroquímico de protones al actuar como protonóforos transfiriendo protones a través de la membrana de una fase acuosa a otra, es decir, la sustancia dada sus propiedades ácido-base debe protonarse sobre una fase acuosa, acarrear protones a través de la fase hidrofóbica de la membrana y desprotonarse disociándose sobre la otra fase acuosa liberando allí los protones.⁽⁶¹⁾

Los desacoplantes protonóforos deben tener propiedades ácido-base con un pKa entre 5 y 7,5 y deben de coexistir las especies ácido protonada y su base conjugada, generalmente tienen un anillo aromático, también deben tener grupos hidrofóbicos voluminosos que permitan el movimiento de un lado a otro de la membrana.

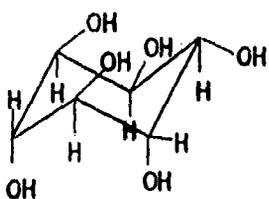
En la figura 3.1 se muestra la estructura química de 3,4 fenilboronatoquinida que tiene un anillo aromático, ácido gálico, inositol y borato spiro del ácido quínico que tienen grupos OH, probablemente con propiedades ácido-base, por lo que estos compuestos pueden actuar como desacoplantes y los resultados obtenidos muestran que estos compuestos presentan propiedades desacoplantes.



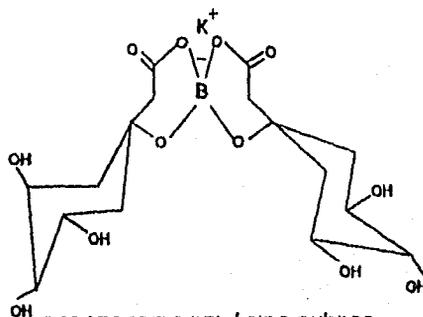
ÁCIDO QUÍNICO



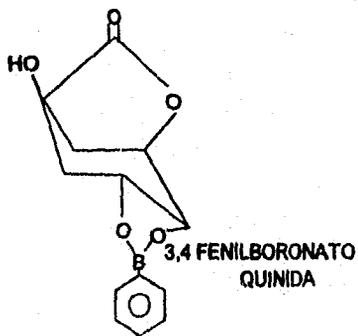
ÁCIDO GÁLICO



INOSITOL



BORATO SPIRO DEL ÁCIDO QUÍNICO



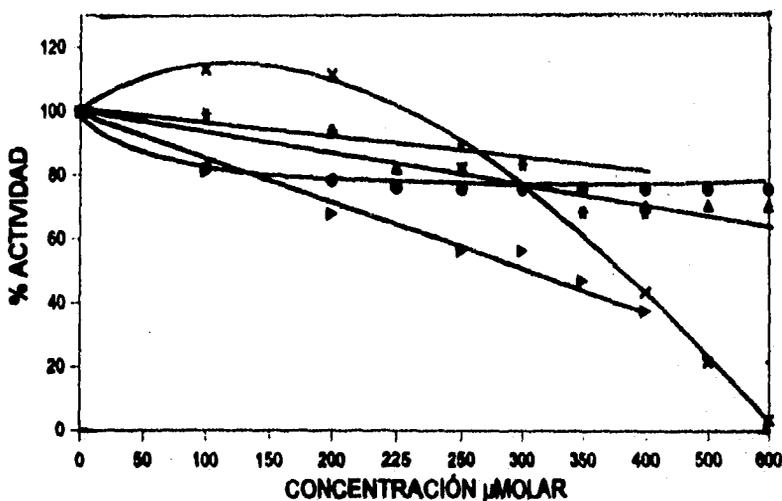
3,4 FENILBORONATO QUÍNIDA

Figura 3.1. Estructura química de los compuestos que se comportan como desacoplantes.

Los resultados anteriores son importantes debido al hecho de que el ácido quínico se comporta como un desacoplante suave⁽¹⁰⁻⁶²⁾ inhibiendo 10 % la captación de protones, 25 % la síntesis de ATP, el transporte de electrones basal y fosforilante presentan una activación de 75 % y 80 % respectivamente a 18 μM , y los compuestos como el ácido gálico e inositol presentan una estructura química similar al ácido quínico (como muestra la figura la figura 3.1.) y estos compuestos son ligeramente más potentes que el ácido quínico, el 3,4 fenilboronatoquinida es un desacoplante más suave que el ácido quínico y el borato spiro del ácido quínico es un desacoplante mucho más potente que el ácido quínico, el 3,4 fenilboronatoquinida, ácido gálico e Inositol, sin embargo, no es más potente que el compuesto $[\text{Co}(\text{quin})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})](\text{H}_2\text{O})^{(62)}$, el cual también es un derivado del ácido quínico que inhibe 100 % la captación de protones a una concentración de 260 μM y 91 % la síntesis de ATP a una concentración de 300 μM .

3.4. COMPUESTOS QUE SE COMPORTAN COMO INHIBIDORES DE LA REACCION DE HILL.

La gráfica 3.9. muestra el efecto del borato del ácido quínico sobre la captación de protones, síntesis de ATP, transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado.



Gráfica 3.9. Efecto del borato del ácido quínico sobre la captación de protones (▴), síntesis de ATP(■) y transporte de electrones basal (▲), fosforilante (●) y desacoplado (X). Medidas en cloroplastos de hojas de chícharos.

La tabla 3.7 muestra los resultados del efecto del borato del ácido quínico en las actividades fotosintéticas que realizan los cloroplastos aislados de hojas de chícharos.

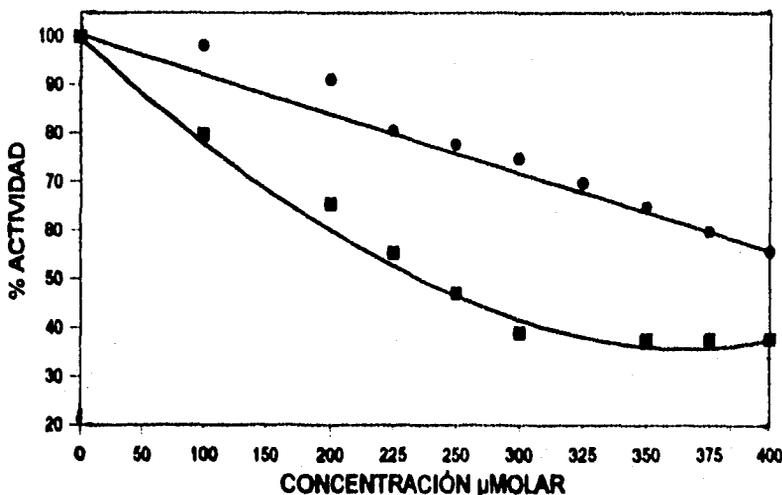
Actividad bioquímica	Concentración	Inhibición
Captación de protones	400 μM	62,5 %
Síntesis de ATP	400 μM	31,6 %
Transporte de electrones basal	400 μM	29,4 %
Transporte de electrones fosforilante	400 μM	24,3 %
Transporte de electrones desacoplante	400 μM	96,9 %

Tabla 3.7. Efecto del borato del ácido quínico.

Con estos resultados podemos proponer que el borato del ácido quínico se comporta como un inhibidor de la reacción de Hill, es decir que inactiva a uno o más componentes de de la cadena oxido-reducción. Es importante hacer notar que el transporte de electrones desacoplante a concentraciones de 100 y 200 μM incrementan esta actividad lo que podría sugerir que interacciona con una (o más) enzima redox activandola.

Debido a esto fue necesario realizar más estudios para determinar el sitio específico de acción en la cadena redox, primero fue necesario determinar si el borato del ácido quínico inhibe el fotosistema I o el fotosistema II. Los experimentos se realizan siguiendo el método para el transporte de electrones la diferencia radica en los donadores, aceptores e inhibidores del flujo de electrones que se adicionan al medio de reacción y eso depende de la reacción parcial a medir.

El transporte de electrones desacoplado del PS I se midió utilizando DCMU⁽⁴³⁾ 10 μM como inhibidor de Q_B impidiendo el flujo de electrones que proviene del PS II, el sistema DAD/ascorbato (el ascorbato se agrega para mantener reducido el DAD) como donador de electrones a nivel de la plastoquinona, el flujo de electrones es del complejo

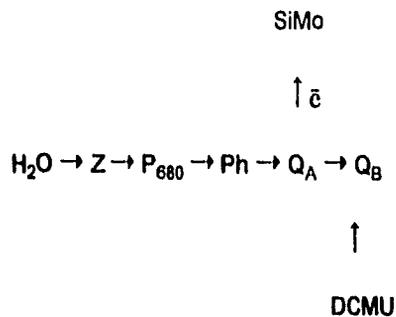


Gráfica 3.10. Efecto del borato del ácido quínico sobre el fotosistema I (■) y el fotosistema II (●).

La gráfica 3.10 muestra como el borato del ácido quínico afecta el transporte de electrones desacoplado del PS I y el PS II produciendo una inhibición de 62,2% y 44,1% respectivamente, a una concentración de 400 μM. De acuerdo a estos resultados podemos decir que el borato del ácido quínico inhibe alguna enzima entre b_{6f} y el metilviógeno, por otro lado el PS II es inhibido también, es decir una enzima es inhibida entre el complejo de fotólisis del agua y Q_B .

Posteriormente se midió un fragmento más pequeño de la cadena redox del fotosistema II, en que el donador de electrones es agua y el aceptor de electrones es silicomolibdato ($SiMo$) 200 μM⁽⁶⁾ y para impedir el paso de electrones a Q_B se utilizó DCMU 10 μM como inhibidor, entonces el transporte de electrones se realiza del agua a

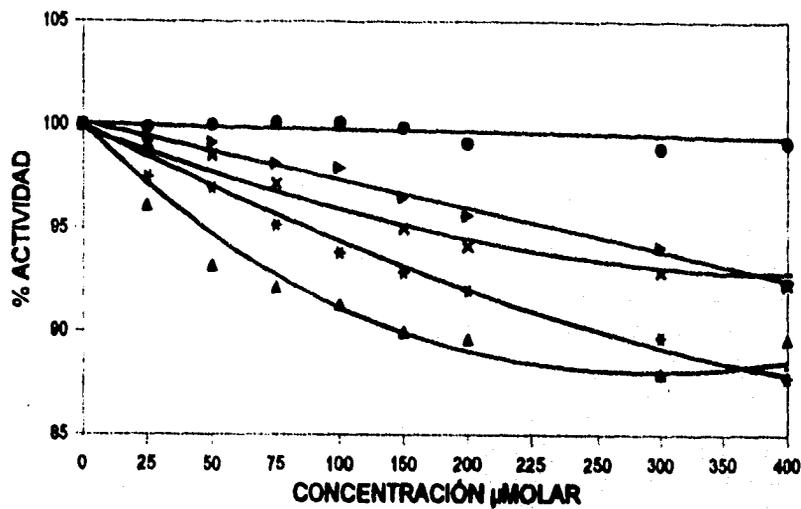
Q_A como se muestra en el esquema siguiente:



Se encontró que el borato del ácido quínico no tiene efecto sobre este fragmento de la cadena fotosintética por lo tanto podemos suponer que la inhibición es entre Q_B y P_Q ya que al medir el fragmento de la cadena fotosintética de H_2O a Q_A no hay inhibición, pero si la hay cuando el flujo de electrones es del H_2O a Q_B y además el fotosistema I también presenta inhibición, probablemente a nivel de P_Q ya que P_{Qox} al aceptar electrones del donador produce P_{Qred} que tiene un comportamiento similar a Q_{Bred} .

Este resultado también indica que el borato del ácido quínico actúa como los herbicidas que inhiben la fotosíntesis a nivel de Q_B .

La grafica 3.11 muestra el efecto que provoca la presencia de 3,4 isopropilidenquinida en las diferentes actividades que realizan los cloroplastos aislados en un medio adecuado.



Gráfica 3.11 Comportamiento de la captación de protones (P), síntesis de ATP (■) y transporte de electrones basal (▲), fosforilante (●) y desacoplado (X) en función de la concentración de 3,4 isopropilidenquinida, medidas en cloroplastos aislados de hoja de chicharo.

De la gráfica 3.11 podemos obtener los siguientes datos que muestra la tabla 3.8.

Actividad bioquímica	Concentración	Inhibición
Captación de protones	400 μ M	7,7 %
Síntesis de ATP	400 μ M	12,2 %
Transporte de electrones basal	400 μ M	10,4 %
Transporte de electrones desacoplante	400 μ M	7,7 %

Tabla 3.8. Efecto del 3,4 isopropilidenquinida.

El transporte de electrones fosforilante no se ve afectado por la presencia de este compuesto. El comportamiento del 3,4 isopropilidenquinida es semejante el de un inhibidor de la reacción de Hill, pero si comparamos los resultados de este compuesto con los resultados del borato del ácido quínico podemos decir que la inhibición es muy pequeña por lo que ya no se realizarán más experimentos sobre las reacciones parciales para determinar el blanco específico de inhibición.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados podemos concluir que ni el ácido bórico no presenta propiedades herbicidas, mientras que los demás compuestos se pueden ser clasificados como:

El ácido fenilborónico y el ácido shikímico se comportan como un inhibidores de la transferencia de energía, probablemente interactuando directamente con la enzima que cataliza la síntesis de ATP, por lo que sería necesario hacer los estudios pertinentes para medir la actividad de la ATPasa en presencia del compuesto para evaluar esta posibilidad

El 3,4 isopropilidenquinida y el borato del ácido quínico se comportan como inhibidores de la reacción de Hill. Este último es más potente que el 3,4 isopropilidenquinida. El borato del ácido quínico presenta mayor efecto en el fotosistema I, inhibe la enzima Q_B o P_0 .

El ácido gálico, 3,4 fenilboronatoquinida, inositol y borato spiro del ácido quínico se comportan como desacoplantes de la fotofosforilación. El borato spiro del ácido quínico es el más potente de estos compuestos. El ácido quínico es menos potente que estos compuestos.

Para que estos estudios realizados sean más significativos sería necesario determinar el pKa y el coeficiente de partición de los compuestos. Establecer como es afectada la potencia desacoplante en relación a sus propiedades fisicoquímicas: ácido-base e hidrofobicidad. Evaluar si estos compuestos actúan como desacoplantes protonóforos de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica, ya que en la literatura⁽⁶²⁾ se han encontrado compuestos desacoplantes con propiedades ácido-base que no se comportan como protónforos en el desacoplamiento, un grupo de ellos son los tiocianatos que

reaccionan en forma covalente con los grupos -SH y NH_2 en proteínas, parece ser que la interacción es esencial para el desacoplamiento.

Los procesos fotosintéticos que realizan los cloroplastos aislados son sensibles al borato spiro del ácido quínico y borato del ácido quínico lo cual sugiere que estos compuestos podrían ser utilizados como herbicidas, sin embargo, hay que realizar más estudios para caracterizar estos compuestos como herbicidas, estos estudios incluyen selectividad en su acción herbicida y su estabilidad en diferentes condiciones de suelo y humedad.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- B. Lotina-Hennsen, et al, *Z. Naturforsch*, **46c**, 777, (1991).
- 2.- A. H. Mehler, *Arch. of Biochem. and Biophys.* , **33**, 65-77 (1951).
- 3.- H. H. Strain, B. T. Coppe y W. A. Svec, *Methods Enzymol.*, **23**, 425, (1965).
- 4.- C. B. Peña-Valdivia, L. Rodríguez-Flores, M. Tuena de Gómez-Poyou y B. Lotina-Hennsen, *Biophysical Chem.*, **41**, 169 (1991).
- 5.- R. A. Dilley, *Methods Enzymol.*, **24 Part B**, 68-74, (1966)
- 6.- R. T. Giaquinta y R. A. Dilley, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 288 (1975).
- 7.- B. Lotina-Hennsen, M. Albores-Velazco, L. García-Chávez, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **33**, 109-117 (1989).
- 8.- N. H. Giles, R. F. Geever, D. K. Asch, J. Avalos y M. E. Case, *The Journal of Heredity*, **82** (1) (1991).
- 9.- P. B. Reichard, T.P. Clausen y J.P. Bryant, *Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture*. Washington D. C. ACS Symposium Series **380**; H. G. Cutler, Ed. (1988) p 130. a. R. O. Nable, *Plant and Soil*, **112**, 45 (1988).
- 10.- N. Barba-Behrens, F. Salazar, B. Lotina-Hennsen, A. Tovar, G. Muller, S. Castillo, M. Llano, R. Contreras y A. Flores-Parra, *J. Inorg. Biochem.*, **43** (2-3), 112, (1991).
- 11.- N. Barba-Behrens, M. E. Carrasco-Fuentes, S.E. Castillo-Blum, J. L. Mendoza, F. Salazar, A. Tovar, B. Lotina-Hennsen, R. Contreras y A. Flores-Parra, *Biophysical Chemistry*, **47**, 67-75 (1993).
- 12.- E. Haslam. *Cromprehensive Organic Chemistry*. Vol. 5 Editorial Board, Pergammon

Press, 1979.

- 13.- C. Chemsiri, H. Watanabe, S. Attajarusit, J. Tuntiwarawit and S. Kaewroj., *Biol Fertil Soils* **20**, 125-129 (1995)
- 14.- Spielvogel, F. B. *Boron in Cancer Therapy*. IV coloquio de la Academia Mexicana de Quimica Inorgánica. A. C. (La química inorgánica en el tratamiento de cancer). Facultad de Quimica UNAM 5 Diciembre 1994.
- 15.-Wallace S. A., Mathur J. N. y Allen B. J. *Phys. Med. Biol.* **39**, 897-906 (1994).
- 16.-R. G. Jensen "Biochemistry of Chloroplast" in *The Biochemistry of plants.*, **1**, (274-313) (1980).
- 17.- L. A. Staehelin, *Enciclopedia of plant Physiology*, **19**, 1-84 (1986).
- 18.- S. P. Robinson, D. A. Walker, *Biochemistry of Plants*, **8**, 193 (1981).
- 19.- K. Sauer, *Bioenergetics of photosynthesis*, 116-181 (1975).
- 20.- P. C. Hinkle y R. E. McCarty., *Sci. Amer.* **238**, 104-123 (1978).
- 21.- P. Mathis y G. Paillotin, *The Biochemistry of Plants.*, **8**, 97-161 (1981).
- 22.- A. L. Lehninger, *Bioquímica*, 609 (1978).
- 23.- Govindjee y R. Govindjee., *Sci. Am.* **233**, 68-82 (1974).
- 24.- G. T. Babcock, B. A. Barry, R. J. Debus, C. W. Hoganson, M. Atamian, L. McIntosh, I. Silhole y C. F. Yocum, *American Chemical Society* **27**, 280-288 (1991).
- 25.- R. A. Dilley y L. P. Vernon, *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **111**, 365-375 (1965).
- 26.- J. Ames, *Enciclopedia of plant Physiology*, **8**, 238-245 (1977).
- 27.- M. Shin, *Methods Enzymol.* **23**, 447, (1971)
- 28.- T. Watanabe, M. Kobayashi, A. Hongu, M. Nakasato, T. Himaya y N. Murata, *FEBS*

- 3060, 191, 252-256 (1985).
- 29.- M. Avron, *The Biochemistry of Plants.*, 8, 163-191 (1981).
- 30.- L. N. M. Duysens y J. Ames, *Biochim. Biophys. Acta*, 234, 381 (1962).
- 31.- S. Katoh, *Methods Enzymol.*, 23, 515, (1971).
- 32.- A. T. Jagendorf, *Encyclopedia of Plant Physiology*, 5, 307-337 (1977).
- 33.- E. Slater y D. K. Myers, *J. Biochem.* 67, 558 (1957).
- 34.- G. B. Pinchot y M. Hormanski, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 48, 1970 (1962).
- 35.- P. D. Boyer in *Oxidases and Related Redox Systems* (T. E. King, H. S. Mason and M. Morrison, Eds.), vol 2, 994-1008 New York.
- 36.- M. Schönfeld y H. Schickler, *FEBS* 1244, 167, 231-234 (1984).
- 37.- P. Mitchell, *Nature* 191, 144-148 (1961).
- 38.- D. Remis, A. A. Bulychev y G. A. Kurella, *Biochimica et Biophysica Acta* 852, 68-73 (1986).
- 39.- J. W. Davenport y R. E. McCarty, *Biochimica et Biophysica Acta* 766, 363-374 (1984).
- 40.- M. Schwartz, *Nature* 219, 915-919 (1968).
- 41.- D.E. Moreland y J. L. Hilton (L. J. Audus, *Herbicides*) 1, 493-523 (1976).
- 42.- S. Isawa y N. E. Good, *Methods Enzymol.*, 24 B, 355-377 (1972).
- 43.- S. Isawa, *Encyclopedia of Plant Physiology*, 5, 266-282 (1977).
- 44.- D. E. Moreland, *Ann Rev Plant Physiol.*, 31, 597-638 (1980).
- 45.- N. E. Good, *Encyclopedia of Plant Physiology*, 5, 429-436 (1977).
- 46.- S. J. D. Karlish, N. Shavit y M. Avron, *Europ. J. Biochem.*, 9, 291-298 (1969)
- 47.- B. Lotina-Hennsen, J. L. Roque-Resendiz, M. Jimenez y M. Aguilar, *Z. Naturforsch.*

- 46c, 1265-1268, (1991).
- 48.- R. E. McCarty, *Enciclopedia of Plant Physiology*, **5**, 437-447 (1977).
- 49.- R. E. McCarty y C. M. Nalin, *Enciclopedia of Plant Physiology*, **19**, 576-583 (1986).
- 50.- J. M. Gould, *FEBS Lett.*, **66**, 312-316 (1976).
- 51.- G. Zweigh, N. Shavit y M. Avron, *Biochimica et Biophysica Acta* **109**, 332-346 (1965).
- 52.- B. Lotina-Hennsen y M. Cruz Aceptores y Donadores artificiales de electrones en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis.
- 53.- S. Mona, *Pesticid. Biochim. and Physiol.*, **27**, 261-266 (1987).
- 54.- D. I. Arnon, *Plant Physiology*, **24**, 1-15 (1949).
- 55.- T. Bizouarn, Y. Kouchkovsky y F. Haraux, *Biochemistry*, **30**, 6847- 6853 (1991).
- 56.- M. Nishimura, T. Ito y B. Chance, *Biochimica et Biophysica Acta* **59**, 177-182 (1962).
- 57.- D. C. Fork, *Methods Enzymol.*, **24**, 113-122 (1971).
- 58.- D. R. Ort y S. Isawa, *Plant Physiol.*, **53**, 370-376 (1974).
- 59.- M. A. Bello-Ramírez y A. Flores-Parra, *Tetrahedron* aceptada 1992.
- 60.-J. S. C. Wessels and R. Vanderveen. *Biochim. Bloohys. Acta* **19**, 548 (1956)
- 61.- P. Mitchell, *Biol. Rev.*, **41**, 445-502 (1966)
- 62.-Miko, M., and Chance. B. *Biochim. Biophys. Acta* **396**, 165-174 (1975).