

UCH-FC
DOC-@
P852
C.1

ASPECTOS MECANISTICOS DE LA BIOSINTESIS DE
MONOTERPENOS. PARTICIPACION DE LINALILDIFOSFATO
EN LA FORMACION DE HIDROCARBUROS CICLICOS

TESIS PRESENTADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE

En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS



por

01-0224011

GLORIA PORTILLA SANCHEZ

Enero 1990

DIRECTOR DE TESIS : PROFESOR OSVALDO CORI
En su representación : PROFESOR EMILIO CARDEMIL
PROFESOR PATROCINANTE: PROFESOR OSVALDO CORI
En su representación : PROFESOR MARIANO CASTILLO

02896

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile



I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E D O C T O R A D O

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por la Candidata

GLORIA PORTILLA SANCHEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Química, en el examen de defensa de tesis rendido el día 28 de Marzo de 1990.

Patrocinante de tesis : Dr. Osvaldo Cori M.
(en su representación) : Dr. Mariano Castillo V. _____
Director de tesis : Dr. Osvaldo Cori M.
(en su representación) : Dr. Emilio Cardemil U.
Comisión de tesis : Dr. Carlos Andrade P. *Carlos Andrade*
: Dr. Bruce Cassels N. *Bruce Cassels*
: Dr. Octavio Monasterio O. *Octavio Monasterio*

Quiero aquí, a modo de
dedicatoria, consagrar un recuerdo a
mi maestro Osvaldo Cori quien me
inició y estimuló en este oficio, a
mis papás por su gran cariño apoyo y
orientación y a Balbino, M. Gloria,
Diego y Alonso que me han acompañado
con inmensa comprensión y entusiasmo

AGRADECIMIENTOS.

Mis sinceros agradecimientos a M.Cecilia Rojas quien formuló valiosos comentarios y con quien realicé alguno de los experimentos que aquí se describen.

Agradezco también a Emilio Cardemil por su ayuda en la redacción de este manuscrito y a Raúl Morales, Rubén Quintana y Samuel Vera por sus contribuciones en la edición de esta tesis.

Financiaron este trabajo PNUD/ UNESCO (proyecto 1982-1983), FONDECYT (proyectos 1004 /1985 y 30/1987) y el Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile (proyectos B-1127 , B- 2078 , B-2661 y D-2818-8922), a los que agradezco su apoyo.



INDICE DE MATERIAS

	Pág.
Indice de materias	IV
Lista de tablas	VII
Lista de figuras	IX
Abreviaturas	XII
Resumen	XIV
Abstract	XVII
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS.	23
2.1. Reactivos químicos, materiales cromatográficos y enzimas.	24
2.2. Determinación de radiactividad.	25
2.3. Síntesis de sustratos.	26
2.3.1. Obtención de $[1-^3\text{H}] \text{GOH}$ y $[1-^3\text{H}] \text{GP}$.	26
2.3.2. Regeneramiento de $[1-^3\text{H}] \text{GOH}$ e hidrólisis de $[1-^3\text{H}] \text{GP}$.	27
2.3.3. Purificación de $[1-^3\text{H}] \text{LOH}$.	29
2.3.4. Determinación de la radiactividad específica y dilución isotópica.	31
2.3.5. Fosforilación de $[1-^3\text{H}] \text{LOH}$ y de LOH no marcado.	31
2.3.6. Purificación de $[1-^3\text{H}] \text{LP}$ y de $[1-^3\text{H}] \text{LPP}$.	32
2.3.6.1. Eliminación de fosfatos inorgánicos.	34
2.3.6.2. Resolución de $[1-^3\text{H}] \text{LP}$ y de $[1-^3\text{H}] \text{LPP}$ en columna de sílica gel 60.	34
2.3.7. Purificación de LPP no marcado.	36
2.3.8. Identificación y pureza de alcoholes y productos de fosforilación.	37
2.3.8.1. Cromatografía en capa fina.	37
2.3.8.2. Cromatografía gaseosa.	40
2.3.8.3. Cuantificación de fosfato por espectroscopía visible: razón fósforo a alcohol.	43
2.3.8.4. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear.	44
2.4. Determinación de la velocidad de hidrólisis.	48
2.5. Análisis de productos.	50
2.6. Determinación de constantes.	52
2.6.1. Constantes de disociación de RPPH^{2-} y RPH^- y constantes de unión de complejos RPP y RP con los cationes Mg^{2+} y Mn^{2+} .	52
2.6.1.1. Tratamiento de datos.	53
2.6.2. Constante de unión aparente de la especie monometálica.	55
2.6.3. Constantes cinéticas de hidrólisis de la especie libre k_0 , de la especie monometálica k_1 , y de la especie bismetálica k_2 .	56
2.6.4. Concentración de especies mono y bismetálicas en solución.	59

2.7.	Obtención de enzimas.	60
2.7.1.	Ensayo enzimático.	61
2.7.2.	Identificación de hidrocarburos.	61
2.7.3.	Determinación de proteínas.	62
2.7.4.	Determinación de parámetros cinéticos.	62
2.7.5.	Radioinactivación.	63
2.7.6.	Filtración en Sephadex G-100.	64
2.7.7.	Búsqueda de LPP como intermediario.	65
3.	RESULTADOS Y DISCUSION.	67
3.1.1.	Hidrólisis de LPP y LP. Descripción de la reacción.	68
3.1.2.	Constante de ionización. Efecto de la fuerza iónica.	74
3.1.3.	Participación del metal en la hidrólisis.	78
3.1.3.1.	Velocidad de formación de productos.	78
3.1.3.2.	Cuantificación de la unión a metal y de las constantes de reacción.	82
3.1.3.3.	Constante de unión aparente de la especie monometálica, K_{1f} .	98
3.1.3.4.	Estequiometría del complejo de LPP con M^{2+} .	104
3.1.3.5.	Constantes de velocidad de las especies mono y bismetálicas k_1 , k_2 y constante de formación de la especie bismetálica, K_{2f} .	106
3.1.3.6.	Relación entre la velocidad de reacción y las concentraciones de los complejos mono y bismetálicos.	122
3.1.3.7.	Distribución de productos de hidrólisis a diferentes valores de pH.	127
3.1.3.8.	Parámetros de activación.	133
3.1.4.	Reordenamiento de LPP.	137
3.1.5.	Interconversión de carbocationes y reordenamiento de los difosfatos.	140
3.1.6.	Hidrólisis de geranyl y nerilidifosfato en micelas de dodecilsulfato de sodio.	146
3.2.	Biosíntesis de hidrocarburos monoterpénicos.	156
3.2.1.	Utilización de LPP por el sistema enzimático proveniente de <i>C. limonum</i> .	156
3.2.2.	Parámetros cinéticos.	162
3.2.3.	Estudios de inhibición.	172
3.2.4.	Formación de LPP durante la transformación de GPP en hidrocarburos.	175
3.2.5.	Disociación de actividades ciclásicas.	181
3.2.5.1.	Filtración en Sephadex G-100.	182
3.2.5.2.	Radioinactivación de ciclasas.	184
4.	CONCLUSIONES.	190
5.	APENDICES.	196
APENDICE 1	Deducción de las ecuaciones para el cálculo de las constantes K_{1f} o $K_{RPP}^{M^{2+}}$, K_{3f} o $K_{RPPH}^{M^{2+}}$ y	

	K_4 o K_{RPPHM} .	197
APENDICE 2	Deducción de la constante de unión total aparente K_{1f} .	202
APENDICE 3	Deducción de la expresión cinética de la constante de hidrólisis k_{ψ} , en función de la concentración de metal.	204
APENDICE 4	Deducción de las ecuaciones para el cálculo de las concentraciones de las especies mono y bimetálicas.	208
6.	BIBLIOGRAFIA.	211
7.	TRABAJOS PUBLICADOS.	



LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1 Comparación de monoterpeno y sesquiterpeno ciclasas provenientes de diferentes fuentes.	20
TABLA 2 Composición de hidrocarburos del aceite esencial del flavedo de <i>C. limonum</i> y comparación con los productos obtenidos a partir de GPP por acción de las ciclasas.	22
TABLA 3 Productos del reordenamiento de $[1-^3\text{H}]$ GOH en medio ácido.	28
TABLA 4 Migración de alcoholes isoméricos e hidrocarburos en placa de Adsorbosil-S.	39
TABLA 5 Volúmenes de retención relativos de alcoholes isoméricos determinados por GLC.	42
TABLA 6 Criterios de identificación y pureza de $[1-^3\text{H}]$ LP y $[1-^3\text{H}]$ LPP.	46
TABLA 7 GLC de hidrocarburos.	51
TABLA 8 Constantes cinéticas de hidrólisis de esteres de fosfato y difosfato.	72
TABLA 9 Constantes de ionización de RPPH^{2-} y RPH^- .	77
TABLA 10 Constantes de unión de RPPH^{2-} , RPP^{3-} , RPH^- y RP^{2-} a Mn^{2+} y Mg^{2+} .	92
TABLA 11 Constantes de disociación de protón RPPH^{2-} y RPPHM .	93
TABLA 12 Dureza absoluta y energía de orbitales HOMO-LUMO de algunos cationes, moléculas neutras y aniones.	95
TABLA 13 Constante de unión aparente de mono y difosfatos alílicos y de derivados de adenosina a $\text{pH}=7$.	99
TABLA 14 Concentración de ligante libre, especie monometálica y especie bismetálica a $\text{pH}=7$.	102
TABLA 15 Constantes de hidrólisis de esteres de fosfato y difosfato unidos a Mn^{2+} o Mg^{2+} (k_1).	108

TABLA 16	Resultados de la simulación de la ecuación 14 para LPP+Mg ²⁺ .	114
TABLA 17	Constantes cinéticas de la hidrólisis de los ésteres alílicos libres y unidos a Mn ²⁺ o a Mg ²⁺ .	115
TABLA 18	Constantes de formación aparentes de los complejos mono y bismetálicos a pH7,0.	116
TABLA 19	Variación de la reactividad de la especie bismetálica con respecto a la especie libre, kRPPM ₂ /kRPP, y de la constante de formación de la especie bismetálica con respecto a la especie monometálica, K _{2f} /K _{1f} .	118
TABLA 20	Distribución de productos en la hidrólisis de LPP y LP.	129
TABLA 21	Productos de hidrólisis y reordenamiento de LPP a pH 9.	133
TABLA 22	Parámetros de activación para la hidrólisis de LPP, GPP y sus complejos bismetálicos.	136
TABLA 23	Productos de hidrólisis de los complejos con Mn ²⁺ de geranil y nerildifosfato.	154
TABLA 24	Productos de hidrólisis de los complejos con Mg ²⁺ de geranil y nerildifosfato.	155
TABLA 25	Distribución de hidrocarburos formados por las ciclasas de <i>C. limonum</i> con sustratos diferentes.	159
TABLA 26	Parámetros cinéticos de las ciclasas.	163
TABLA 27	Parámetros cinéticos para RPPM ₂ y RPP total en la reacción catalizada por las ciclasas.	167
TABLA 28	Inhibición de la biosíntesis de hidrocarburos.	174
TABLA 29	Actividad específica de las ciclasas sometidas a filtración en Sephadex G-100 y a radioinactivación.	187

LISTA DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Relación biosintética de algunos isoprenoides con el MVA.	3
Figura 2	Estructuras de diferentes monoterpenos y sesquiterpenos.	4
Figura 3	Mecanismo de formación de hidrocarburos cíclicos vía isomerización de GPP a NPP.	10
Figura 4	Mecanismo de formación de hidrocarburos cíclicos vía carbocatión.	13
Figura 5	Hipótesis de formación de hidrocarburos cíclicos vía LPP.	15
Figura 6	Ciclación de GPP y de FPP.	17
Figura 7	Perfil de elución de alcoholes e hidrocarburos en una columna de Adsorbosil-S.	30
Figura 8	Purificación de [1- ³ H] LP y [1- ³ H] LPP por cromatografía en columna de sílica gel 60.	33
Figura 9	Etapas de la síntesis de [1- ³ H] LPP.	35
Figura 10	Esquema de los métodos analíticos usados para identificar LP y LPP.	45
Figura 11	Espectro NMR a) de LOH b) de LPP.	47
Figura 12	Curva de progreso de la reacción de hidrólisis de [1- ³ H] LPP.	69
Figura 13	Velocidad de hidrólisis en función de la concentración de [1- ³ H] LPP.	70
Figura 14	pKa aparente para la ionización de LPPH ²⁻ en función de la fuerza iónica.	75
Figura 15	Efecto de la concentración de Mn ²⁺ y de Mg ²⁺ sobre la constante de reacción de hidrólisis de [1- ³ H] LPP.	79
Figura 16	Efecto de la concentración de Mn ²⁺ sobre la hidrólisis de LP.	81

Figura 17	Constantes de formación de complejos mono y bismetálicos y constantes de velocidad de hidrólisis del ligante libre, $RPPH^{2-}$ y RPP^{3-} , y de los complejos $RPPM$ y $RPPM_2^+$.	85
Figura 18	Constantes de formación de los complejos monometálicos y constantes de velocidad de hidrólisis de ligante libre RPH y RP^{2-} y del complejo RPM .	86
Figura 19	Titulación potenciométrica de $LPP/Mn^{2+}=1/1$.	87
Figura 20	Determinación de las constantes de unión de LPP^{3-} $LPPH^{2-}$ a Mn^{2+} (K_{1f} y K_{3f}).	91
Figura 21	Variación de K_{1f} con el pH.	101
Figura 22	Efecto de la fracción molar de Mn^{2+} sobre la velocidad de formación de alcoholes e hidrocarburos, y sobre las concentraciones de especies monometálica y bismetálica.	105
Figura 23	Gráfico de Hanes y Woolf; determinación de k_2 y K_2 dis del complejo $LPPMn_2$.	111
Figura 24	Gráfico de Eisenthal y Cornish - Bowden; determinación de k_2 y K_2 dis del complejo $LPPMn_2$.	112
Figura 25	Estructuras probables de los complejos bismetálicos $LPPM_2$, $NPPM_2$ y $GPPM_2$.	119
Figura 26	Relación entre la concentración de los complejos mono y bismetálicos de LPP con Mn^{2+} y la velocidad de hidrólisis.	124
Figura 27	Relación entre la concentración de los complejos mono y bismetálicos de LPP con Mg^{2+} y la velocidad de hidrólisis.	125
Figura 28	Efecto de la concentración de Mn^{2+} sobre la hidrólisis de LP .	126
Figura 29	Esquema que ilustra las principales reacciones de sustitución y eliminación de los derivados de linalilo.	132
Figura 30	Gráfico de Arrhenius para la hidrólisis de LPP y $LPPMn + LPPMn_2$.	135
Figura 31	Reordenamiento de LPP a NPP y a GPP .	139

Figura 32	Hidrólisis de GPP en función de la concentración de Mn^{2+} y de Mg^{2+} en H_2O y en SDS.	148
Figura 33	Hidrólisis de NPP en función de la concentración de Mn^{2+} y de Mg^{2+} en H_2O y en SDS.	149
Figura 34	Hidrólisis de GPPMn ₂ , de GPPMg ₂ y de NPPMn ₂ en función de la concentración de SDS.	151
Figura 35	Formación de hidrocarburos a partir de [1- ³ H] GPP, [1- ³ H] NPP y [1- ³ H] LPP empleando ciclasas de <u>C. limonum</u> .	158
Figura 36	Efecto de la concentración de LPP sobre la velocidad de reacción catalizada por la ciclasa y sobre la velocidad de hidrólisis de LPP.	160
Figura 37	Formación de HC a partir de [1- ³ H] LPP empleando ciclasa de <u>C. limonum</u> y por hidrólisis no enzimática.	161
Figura 38	Relación entre la concentración de los complejos LPPMn y LPPMn ₂ y la velocidad de reacción de la ciclasa.	164
Figura 39	Relación entre la concentración de los complejos de LPPMg y LPPMg ₂ y la velocidad de reacción de la ciclasa.	165
Figura 40	A) Velocidad de reacción de la ciclasa de <u>C. limonum</u> en función de la concentración de Mn^{2+} . B) Velocidad de reacción de bornildifosfato sintetasa de <u>S. officinalis</u> , en función de la concentración de Mg^{2+} . C) Velocidad de reacción de ciclasa de <u>S. officinalis</u> que cataliza la biosíntesis de β-pineno, en función de la concentración de Mn^{2+} .	169
Figura 41	Inhibición de la biosíntesis de hidrocarburos al utilizar [1- ³ H] LPP como sustrato.	173
Figura 42	Determinación de las masas relativas de GPP, NPP y LPP ciclasas por filtración en Sephadex G-100.	183
Figura 43	Radioinactivación de GPP, NPP y LPP ciclasas como una función de la dosis de irradiación.	185

ABREVIATURAS

BPP	Bornildifosfato
cmc	Concentración micelar crítica
DEAE	Dietil, aminoetil
DMAPP	Dimetilalildifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FPP	Farnesildifosfato
GLC	Cromatografía en fase gaseosa
GOH	Geraniol
GP	Geranilmonofosfato
GPP	Geranildifosfato
HC	Hidrocarburo
IPP	Isopentenildifosfato
LOH	Linalol
LP	Linalilmonofosfato
LPP	Linalildifosfato
MVA	Acido mevalónico
Mr	Masa relativa
NdPP	Nerolidildifosfato
NOH	Nerol
NP	Nerilmonofosfato
NPP	Nerildifosfato
PPO	2,5-difeniloxazol

POPOP	1,4 [2-(5-feniloxazolil)]- benceno
NMR	Resonancia magnética nuclear
ROH	Alcohol
RP	Monofosfato alílico
RPP	Difosfato alílico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TES	Acido N-Tris(hidroxietyl)-2-aminoetano sulfónico
TLC	Cromatografía en capa fina
°	Grado Celsius
E*	Isómero en el que los sustituyentes de mayor precedencia se encuentran en lados opuestos del plano del doble enlace.
Z*	Isómero en el que los sustituyentes de mayor precedencia se encuentran en el mismo lado del plano del doble en- lace.

* Nos referiremos a los isómeros E y Z, de acuerdo a la propo-
sición de la IUPAC (1970), como a diastereómeros que
difieren en conformación.

RESUMEN

En esta tesis se ha realizado un estudio sobre la reactividad de los ésteres alílicos terciarios linalilmonofosfato (LP), y linalildifosfato (LPP), y la utilización de éstos por un sistema enzimático obtenido de Citrus limonum. El objetivo de este estudio fue evaluar si la biosíntesis de los hidrocarburos cíclicos α -pineno, β -pineno, limoneno y γ -terpineno a partir de geranildifosfato (GPP), pudiera ocurrir vía el intermediario LPP.

Para esto se obtuvieron las constantes de acidez de LPP y LP, de unión a Mg^{2+} y Mn^{2+} , la estequiometría de los complejos reactivos y las constantes cinéticas de hidrólisis de las diversas especies y se compararon estas propiedades con las requeridas por la ciclase para la formación de los hidrocarburos cíclicos.

Se encuentra por una parte que LPP forma complejos mono y bismetálicos con Mg^{2+} y Mn^{2+} siendo los complejos de LPP^{3-} 50 a 100 veces más estables que los que forma $LPPH^{2-}$, y por otra que Mg^{2+} y Mn^{2+} se unen en el complejo monometálico 10^3 y 10^4 veces más fuertemente que en la especie bismetálica. LP, en cambio, solamente forma un complejo monometálico y con Mn^{2+} , siendo en este caso el complejo con LP^{2-} más estable que el complejo con LPH^{-} .

La constante de velocidad de hidrólisis de LPP a pH 7,0 y

30° es $1,2 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$, aumentando este valor por la presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} . Se demuestra que el incremento en la velocidad de hidrólisis se correlaciona con el aumento de la concentración del complejo bismetálico. Por su parte, LP hidroliza a una velocidad menor que LPP, y frente al agregado del Mn^{2+} aumenta la velocidad en forma proporcional al aumento de concentración del complejo monometálico.

En condiciones de pH básico, en las cuales prácticamente no hay hidrólisis, se logra obtener reordenamiento de LPP a sus isómeros primarios más estables GPP y nerildifosfato (NPP). Esto indica que la reacción en el sentido opuesto puede ocurrir si bien en esta tesis tal reordenamiento no se encuentra.

Se estudió el comportamiento del GPP y del NPP en micelas de dodecilsulfato de sodio con el objeto de acercarse mejor a la reacción catalizada por la ciclasa. Se puede establecer que estas micelas concentran al complejo bismetálico aumentando su velocidad de descomposición y para el caso del NPPMn_2 aumenta 5 veces la cantidad de hidrocarburos constituyendo en estos aspectos la reacción micelar un modelo más apropiado que la reacción en H_2O .

En relación a la biosíntesis de hidrocarburos cíclicos se demuestra que la preparación de *C. limonum* utiliza $[1-^3\text{H}]$ LPP y forma α -pineno, β -pineno, limoneno y γ -terpineno; sin embargo hay algunas preparaciones que carecen de esta

actividad. Se presentan resultados que indican que [1-³H] LPP no sería un intermediario libre durante la utilización de [1-³H] GPP. En esta preparación se detectan tres monoterpeneo ciclasas que difieren en sus masas moleculares al ser filtradas por Sephadex G-100. Dos de ellas utilizan los sustratos primarios GPP y NPP y tienen las Mr de 75.000 y 56.000, respectivamente. La tercera, de Mr 45.000, es absolutamente específica por LPP. El procedimiento de radioinactivación de esta preparación da una única Mr de 56.000, que correspondería al tamaño de la unidad catalítica mínima de las tres actividades, pudiendo la GPP ciclasa contener una subunidad de Mr 20.000, que no se detecta.

ABSTRACT

A study is presented on the reactivity of the tertiary allylic esters linalylmonophosphate (LP) and linalyldiphosphate (LPP), and on their utilization by an enzymic system from Citrus limonum. The objective of this study was to evaluate if LPP may be considered an intermediate in the biosynthesis of the cyclic hydrocarbons α -pinene, β -pinene, limonene and γ -terpinene from geranyldiphosphate (GPP).

The acidity and the Mg^{2+} and Mn^{2+} binding constants for LP and LPP were obtained, along with the respective stoichiometries of the reactive complexes and the hydrolysis kinetic constants for the different species. These parameters were compared with those obtained for the enzymic formation of cyclic hydrocarbons.

We have found that LPP forms the mono- and bimetallic Mg^{2+} and Mn^{2+} complexes, where the LPP^{3-} complexes are 50 to 100 times more stable than those of $LPPH^{2-}$. Mg^{2+} and Mn^{2+} bind to the monometallic complex 10^3 and 10^4 times more strongly than to the bimetallic species, respectively. On the other hand, LP forms only the monometallic complexes, the complex with LP^{2-} being in this case more stable than that with LPH^- .

At pH 7.0 and 30° , the hydrolysis rate constant of LPP is

$1.2 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$, and this value is increased by the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} . It is demonstrated that this effect correlates with the increase in the concentration of the bismetallic complex. LP hydrolyses at a lower rate than LPP, but as a function of the monometallic Mn^{2+} complex.

At basic pH, where there is almost no hydrolysis, LPP rearranges to its more stable primary isomers GPP and neryldiphosphate (NPP). This indicates that the reverse reaction can obviously occur, although we were unable to detect it.

As a way to get closer to the enzymic reaction catalysed by the cyclase, the behaviour of GPP and NPP in micelles was studied. Our findings indicate that micelles concentrate the bismetallic complex, increase its decomposition rate, and for NPPMn_2 allow the formation of 5 times more hydrocarbons. Thus, the micellar reaction may be a more appropriate model than the reaction in water.

With respect to the biosynthesis of cyclic hydrocarbons, it is demonstrated that the *C. limonum* preparation utilizes $[1-^3\text{H}]$ LPP and forms α -pinene, β -pinene, limonene and δ -terpinene, even when there are preparations that do not show these activities. Evidence is presented indicating that $[1-^3\text{H}]$ LPP is not a free intermediate in the utilization of $[1-^3\text{H}]$ GPP.

In our preparation, we detect three monoterpene cyclases,

which can be resolved upon filtration in Sephadex G-100. Two of them utilize as substrates GPP or NPP, and have MW of 75,000 and 56,000, respectively. The third cyclase is absolutely specific for LPP, and has a MW of 45,000. However, when this *C. limonum* preparation was analyzed by the radioinactivation procedure, a common MW of 56,000 was detected for all three cyclases, which should correspond to the size of the minimum MW for the catalytic subunit of the enzymes. The GPP cyclase may contain in addition a second MW 20,000 subunit, which would not be detected by the radioinactivation method.

INTRODUCCION

Los tejidos vegetales sintetizan alrededor de 12.000 compuestos derivados del isopreno o 2-metil butadieno, C_5H_8 . Se forman por sucesivas condensaciones de unidades de 2 átomos de carbono, de acetil coenzima A, para dar MVA, de 6 átomos de carbono, precursor específico de todos los isoprenoides conocidos (Cori, 1976). Algunos ejemplos de isoprenoides los constituyen los monoterpenos, sesquiterpenos, esteroides, carotenoides, caucho, giberelinas, etc., y su relación biogenética con el MVA se esquematiza en la figura 1.

En la ruta isoprenoide, el MVA se transforma en una unidad de 5 carbonos, IPP, que se isomeriza dando origen al primer compuesto alílico de la ruta, el DMAPP.

De la condensación entre DMAPP y una o dos unidades de IPP surgen los mono y sesquiterpenos (10 y 15 carbonos, respectivamente). Una fracción importante de ellos forma parte de los aceites esenciales y son responsables en buena medida del aroma de muchas plantas superiores. En la figura 2 se presentan algunos de los monoterpenos y sesquiterpenos aislados de coníferas, citrus, mentas, y de alrededor de 50 familias de plantas con flores (Banthorpe y Charlwood, 1980). Se encuentra una gran diversidad de grupos funcionales entre los que predominan los hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, etc., los que pueden ser acíclicos (ocimeno, mirceno, geraniol, linalol y farnesol), monocíclicos (limoneno, γ -terpineno, γ -bisaboleno o bicíclicos (pinenos, borneol,

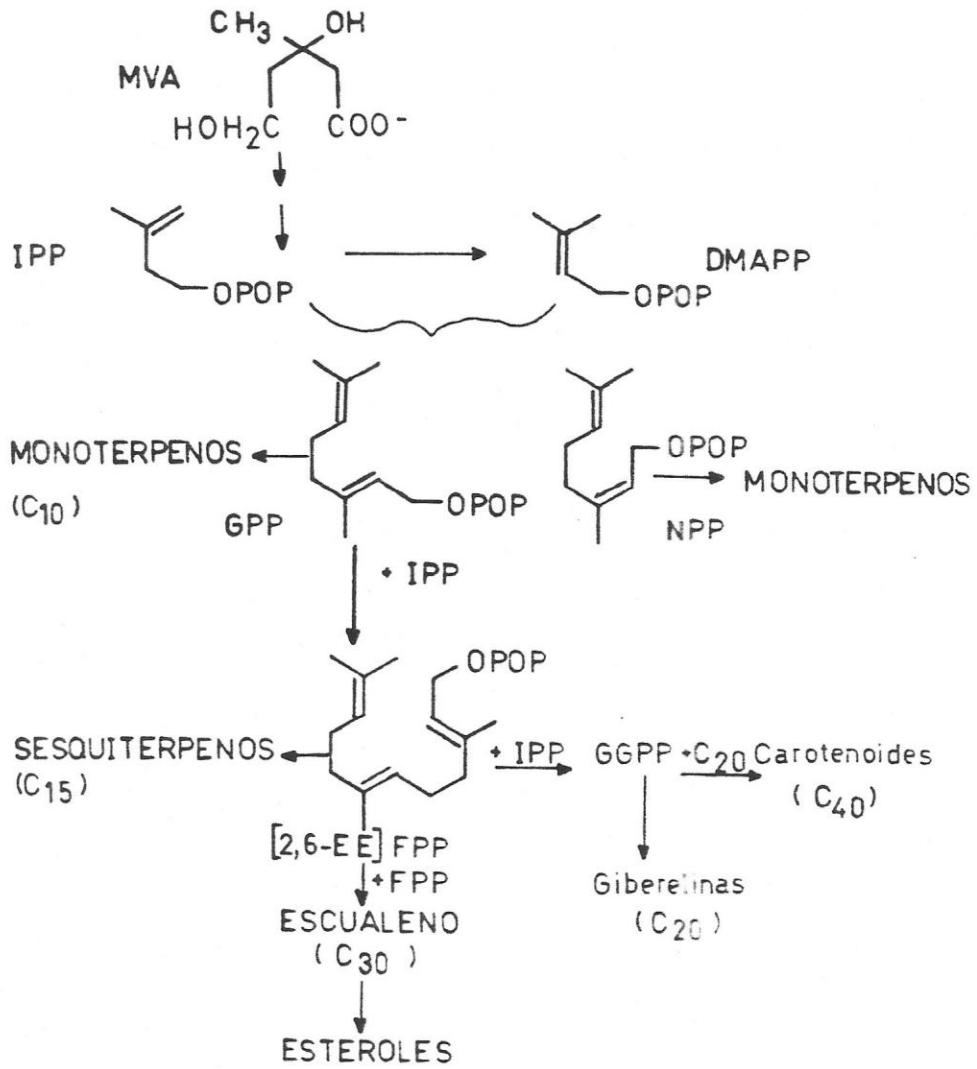


Figura 1 Relación biosintética de algunos isoprenoides con el M.V.A.

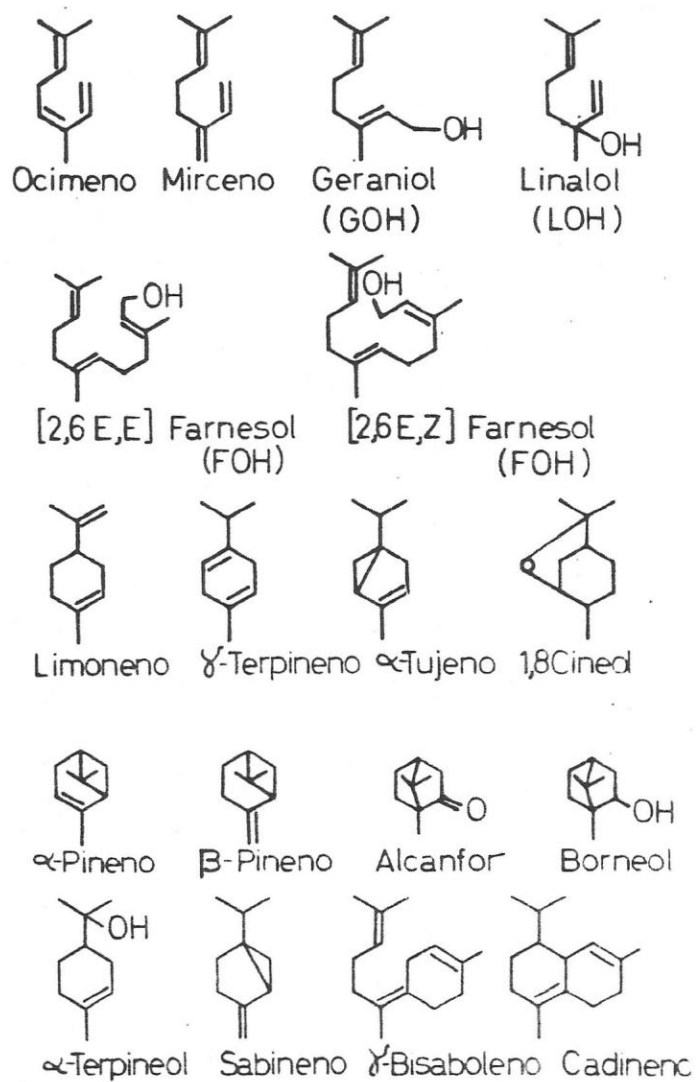


Figura 2 Estructuras de diferentes monoterpenos y sesquiterpenos.

sabineno, cadineno). La naturaleza de los componentes en el aceite esencial está determinada fundamentalmente por la actividad de dos tipos de enzimas: las preniltransferasas y las ciclasas. Las preniltransferasas son responsables de los diversos modos de condensación entre IPP y DMAPP y del alargamiento de la cadena. Catalizan la condensación de un difosfato alílico con IPP y los productos son los siguientes homólogos superiores del sustrato alílico de 5, 10, 15 o más átomos de carbono, y pirofosfato inorgánico (Cori, 1983).

En general, las preniltransferasas de origen animal tienen una especificidad bastante restringida; solamente catalizan la formación de productos de un largo de hasta 15 carbonos y de conformación E. En tejidos vegetales generalmente se llega a productos de 15 y 20 carbonos; se considera más bien excepcional que existan algunos sistemas enzimáticos que conduzcan a cadenas más largas como son la gutapercha, chicle y caucho, este último con un promedio de residuos isoprénicos de 7.000 por molécula (Beytía y Porter 1976). A diferencia de los tejidos animales, en plantas se ha observado la formación de prenildifosfatos tanto de conformación E como Z, entre estos últimos NPP, C₁₀ (Beytía y col., 1969) y (2,6-Z,E) FPP, C₁₅ (Chayet y col., 1973).

Si bien, tanto en plantas como animales el sustrato alílico sobre el cual se condensa IPP tiene la conformación E, algunas preniltransferasas de origen vegetal además pueden

usar como sustratos los difosfatos alílicos de conformación Z: la enzima de Gossypium hirsutum forma los cuatro diastereoisómeros del FPP a partir de NPP y GPP como sustratos (Adams y Heinstein, 1973). La condensación de las 2 unidades de 5 carbonos se lleva a cabo a través de un ataque nucleofílico del metileno del IPP sobre el catión generado por salida del grupo difosfato del sustrato alílico (Poulter y Rilling, 1978). El catión resultante de esta condensación elimina un protón vecino, formándose un doble enlace E o Z en los productos. La eliminación de un determinado protón y la formación de producto de conformación E o Z, depende exclusivamente de la estereoespecificidad de la preniltransferasa (Cori, 1983).

Las ciclasas, por otra parte, catalizan la formación de productos cíclicos a partir de los precursores fosforilados de cadena abierta de 10 o 15 carbonos GPP, NPP, [2,6-E,E] FPP y [2,6-Z,E] FPP, sintetizados por las preniltransferasas. De estos precursores de conformación E o Z se origina una amplia gama de derivados cíclicos o acíclicos los que subsecuentemente pueden continuar transformándose (Cane, 1981).

Si bien GPP es el sustrato más ampliamente empleado en la ruta de isoprenoides que conduce a productos de cadena abierta de 10 o a homólogos de 15 carbonos, una de las razones por el interés en el estudio de la biosíntesis de monoterpenos

cíclicos radica precisamente en que GPP sea precursor de numerosos compuestos cíclicos.

En la última década se demostró que GPP se cicla a alrededor de 20 productos diferentes, al emplear preparaciones enzimáticas obtenidas de Citrus, Thymus, Mentha, Salvia, y Foeniculum entre otras (George-Nascimento y Cori, 1971; Poulouise y Croteau, 1978; Suga y col., 1980; Croteau y Karp, 1979; Croteau y col., 1980). Los hidrocarburos como limoneno, α y β -pineno, γ -terpineno y α -tujeno, el éter 1,8-cineol, la cetona alcanfor y los alcoholes borneol y α -terpineol, son productos que se pueden considerar representativos de las reacciones catalizadas por las monoterpeno ciclasas.

Si se inspeccionan modelos moleculares del GPP, se puede apreciar que debido a la geometría del doble enlace $C_2=C_3$, este sustrato no debería formar compuestos cíclicos. Basados en esta premisa, Valenzuela y col. (1966), propusieron que NPP debía ser el precursor directo de los monoterpenos cíclicos. Esta proposición también se basaba en el hecho de que nerol, o sus derivados fosforilados, en medio ácido se reordena para dar principalmente el alcohol terciario cíclico α -terpineol; en cambio geraniol, o sus respectivos derivados, da origen fundamentalmente al alcohol de cadena abierta linalol (Zeitschel, 1906; Valenzuela y Cori, 1967; Cramer y Rittersdorf, 1967). Esto indica que el carbocación intermediario, formado a partir de cada sustrato, no se

interconvierte rápidamente por rotación alrededor del enlace C₂-C₃. Parecía así probable que ésta fuera la situación en las reacciones enzimáticas. En línea con estas predicciones estaban los primeros experimentos realizados con [¹⁴C]-NPP y [¹⁴C]-GPP en los que se emplearon extractos enzimáticos libres de células obtenidos a partir de plántulas de Pinus radiata (Cori, 1969); se formaron los hidrocarburos α-pineno y β-pineno solamente con NPP como sustrato. Resultados similares encontraron Croteau y col. (1973) al utilizar extractos provenientes de Mentha piperita y Mentha spicata, los que catalizaron la formación del alcohol cíclico α-TOH.

Sin embargo, esta situación no se pudo extender a otras especies productoras de monoterpenos. El problema resultó más complejo ya que al incubar un extracto enzimático de flavedo de Citrus sinensis se formó α-pineno sólo a partir de [2-¹⁴C]-NPP, en tanto que el limoneno, hidrocarburo monocíclico se formó tanto a partir de NPP como de GPP (George-Nascimento y Cori, 1971). Además, un extracto parcialmente purificado de Citrus limonum utilizó ambos sustratos y dió origen a α-pineno, β-pineno, sabineno y limoneno como productos (Chayet y col., 1977), y otro de Thymus vulgaris formó γ-terpineno, α-tujeno y α-TOH. (Poulose y Croteau, 1978).

En la última década en que se experimentó con extractos parcialmente purificados, se pudo establecer que la preferencia por NPP o por GPP es relativa y depende en gran

medida de la presencia y especificidad de diversas fosfatasas, entre ellas, difosfohidrolasas y fosfomonoesterasas, que acompañan a las ciclasas. Así por ejemplo, las fosfatasas presentes en un extracto crudo de limón hidrolizan NPP o GPP al alcohol respectivo a velocidades entre 1,5 y 45 veces mayores que la actividad de la ciclasa, dependiendo esto último de la partida de limones (Chayet y col., 1977).

Por otra parte, si bien las fosfatasas obtenidas de un extracto de flavedo de Citrus sinensis son más bien inespecíficas por estos sustratos (Pérez y col., 1980), las enzimas de Salvia officinalis presentan una clara preferencia por GPP (Croteau y Karp, 1979). Por lo tanto es muy probable que aquellos extractos crudos que no hayan utilizado un determinado sustrato puedan haber contenido muy poco del difosfato debido a la interferencia producida por estas fosfatasas. Consistente con este punto, todas las preparaciones parcialmente purificadas de ciclasas informadas en la literatura transforman GPP en magnitud comparable o en algunos casos mejor que NPP, a productos cíclicos (Chayet y col., 1977; Croteau y col., 1980)

Dada la imposibilidad estérica que impone el doble enlace $C_2=C_3$ del GPP para la ciclación, se postuló que GPP se isomerizaría a NPP, el que sería el precursor inmediato de los compuestos cíclicos (Francis y col., 1970; Shine y Loomis, 1974) (fig. 3). Esta interconversión fue cuidadosamente

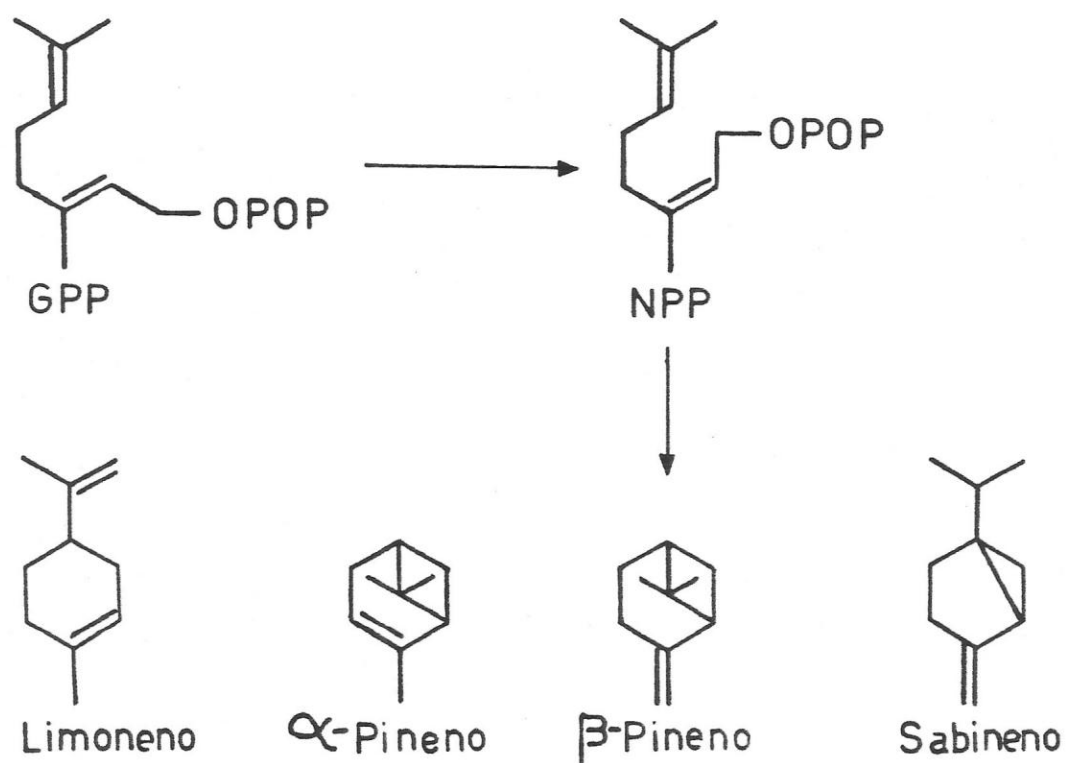


Figura 3 Mecanismo de formación de hidrocarburos cíclicos vía isomerización de GPP a NPP.

descartada de los sistemas de Citrus limonum (Chayet y col., 1977); de Citrus sinensis (Cori y col., 1980); de Thymus vulgaris (Poulose y Croteau, 1978); de Salvia officinalis (Croteau y Karp, 1979) y de Foeniculum vulgare (Croteau y col., 1980). Para esto se incubó a 30°, por períodos de aproximadamente 1-2 h, el sustrato GPP con un extracto enzimático crudo o parcialmente purificado de las especies recién nombradas. Se extrajeron los alcoholes e hidrocarburos resultantes con hexano, y los sustratos fosforilados remanentes se hidrolizaron con apirasa y fosfomonoesterasa de Escherichia coli. El alcohol resultante de esta hidrólisis resultó ser 100% GOH.

Al respecto, y a diferencia de los resultados anteriores, Banthorpe y col. (1979 y 1983), demostraron la interconversión de NOH y GOH en extractos de Rosa damascena y de Pelargonium graveolens. Esta interconversión ocurre vía un proceso redox que requiere la desfosforilación de los sustratos; luego, los alcoholes resultantes se oxidan a los correspondientes aldehídos; estos últimos se pueden equilibrar rápidamente formando geranial y neral los que se pueden reducir a los alcoholes respectivos.

En la medida que la hipótesis de isomerización $GPP \rightleftharpoons NPP$ fue concluyentemente eliminada, se propusieron otras alternativas que pudieran explicar la utilización de ambos sustratos por parte de la ciclasa.

Cori y col. (1974) propusieron un mecanismo vía la formación de un carbocatión alílico. Los investigadores plantearon que con la salida del difosfato del GPP se formaría una catión con carga deslocalizada entre los $C_1-C_2-C_3$ y que en este catión podría ocurrir un cambio de conformación que permitiría el acercamiento que condujera al ataque de C_6 sobre C_1 (figura 4). Es de destacar que esta proposición de mecanismo iónico para las reacciones de la ruta de biosíntesis de terpenos tiene un amplio apoyo al considerar las propiedades químicas de los derivados alílicos y la reacción catalizada por la preniltransferasa. Respecto a esta última, Poulter y Rilling (1978) definieron el carácter catiónico de la reacción y establecieron un mecanismo de ionización-condensación en que el difosfato alílico primero se ioniza y forma un par iónico rígido previo a la condensación con el doble enlace de IPP.

Sin embargo, tomando en cuenta que los cálculos para la barrera de energía a la rotación alrededor de cationes alílicos indican valores relativamente altos [entre 12-14 kcal/mol (Deno y col., 1970; Bollinger y col., 1970; Allinger y col., 1975)], esta hipótesis se consideró poco probable (Cori y col., 1980; Croteau, 1987). Este punto será analizado más adelante en esta tesis.

Paralelamente a la proposición recién descrita, surgió otro planteamiento que fue evaluado experimentalmente recién

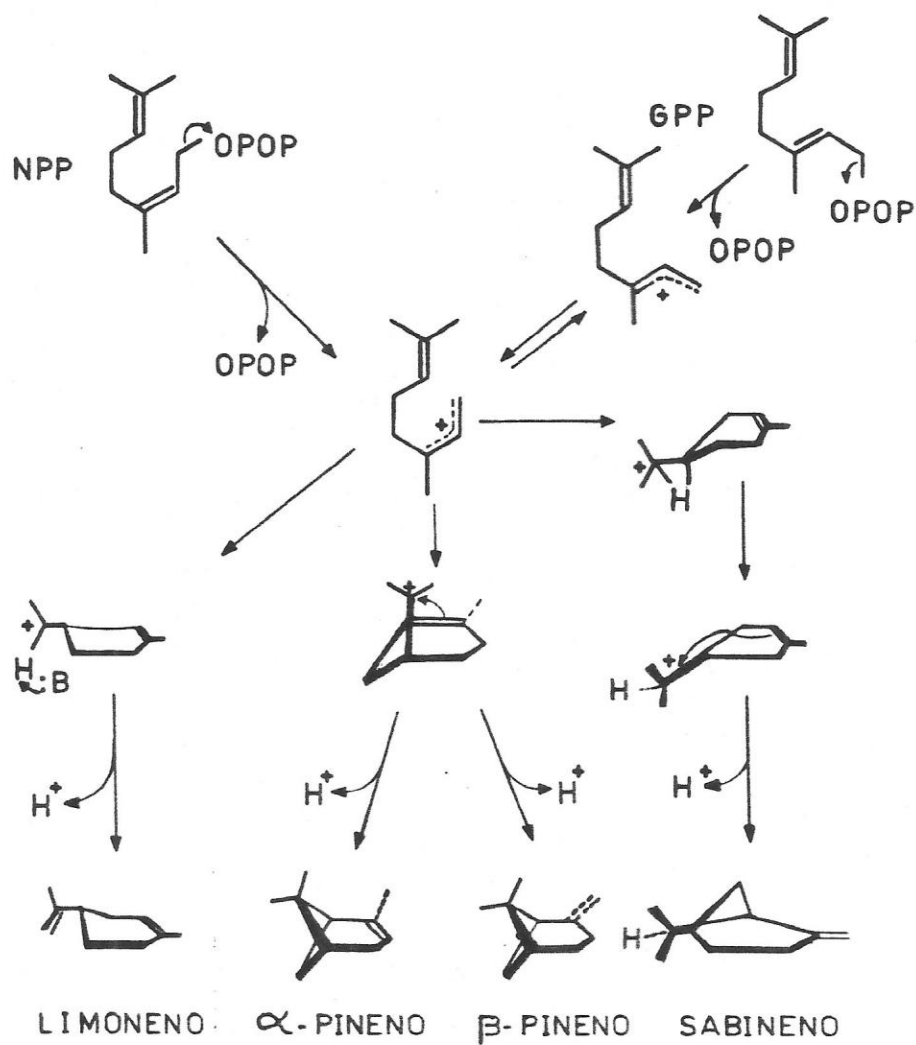


Figura 4 Mecanismo de formación de hidrocarburos cíclicos vía carbocación.



en esta última década: la ciclación de GPP vía la formación del intermediario fosforilado terciario, LPP (Potty y Bruemer, 1970; George-Nascimento y Cori, 1971).

Esta hipótesis es estereoquímicamente atractiva debido a que es factible que el grupo difosfato migre desde C₁ al C₃ en forma perpendicular al doble enlace (figura 5). Se formaría el intermediario terciario LPP el que en el sitio activo de la enzima adquiriría la conformación apropiada de modo de permitir el ataque olefínico de C₆ sobre C₁.

Base para esta proposición se encuentra por una parte en la presencia de LOH en cáscaras de diversos Citrus (Attaway y col., 1967) y por otra, en el hecho de que este alcohol se encontró como producto en experimentos de incorporación de precursores radiactivos: al entregar [2-¹⁴C]MVA, [4-¹⁴C]IPP o [1-³H]GPP a extractos enzimáticos de Citrus (Potty y Bruemer, 1970; George-Nascimento y Cori, 1971) o Mentha (Suga y col., 1980), conjuntamente con la formación de hidrocarburos o alcoholes monoterpénicos, se detecta LOH. Se propuso que este alcohol provendría de la hidrólisis catalizada por fosfatasas del intermediario postulado LPP. A la luz de la información sobre la reactividad de los difosfatos alílicos que se tiene actualmente, el LOH obtenido en estos experimentos se puede considerar también como proveniente de la hidrólisis no enzimática de GPP, y que es un punto que se revisará en esta tesis. Adicionalmente, los trabajos pioneros de Cramer y

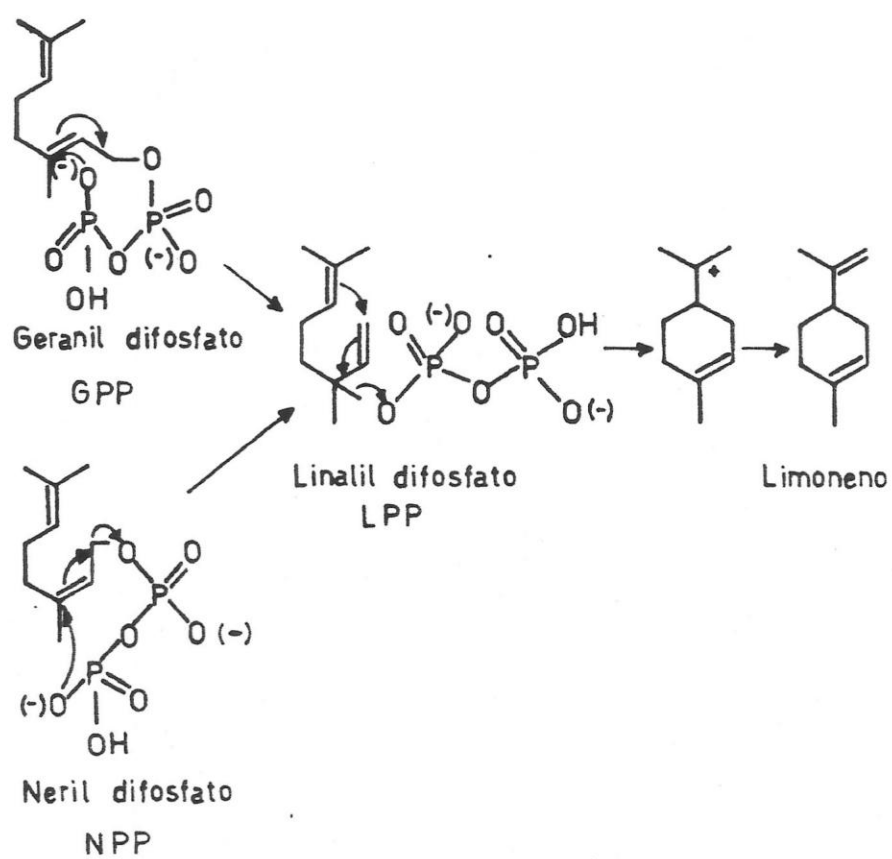


Figura 5 Hipótesis de formación de hidrocarburos cíclicos vía LPP.

Rittersdorf (1967) sobre la hidrólisis en medio ácido de fosfatos y difosfatos alílicos apoyaban esta hipótesis ya que los derivados de geranilo forman predominantemente linalol y este último o sus fosfatos, forma alcoholes e hidrocarburos cíclicos.

La isomerización y posterior ciclación postulada podría involucrar varias enzimas. Una isomerasa podría catalizar la isomerización de GPP a LPP y las ciclasas catalizarían la ionización del difosfato alílico, y con algunas variaciones, todas ellas ciclarían el carbocatión resultante. Además, por desprotonación o captura de un nucleófilo externo, tal como agua, se daría cuenta de todos los esqueletos cíclicos conocidos. La proposición considera también que este proceso isomerización-ciclación pudiera ser catalizado por una sola enzima.

Es importante mencionar que el problema de la conformación E o Z de los precursores aparece también en la biosíntesis de sesquiterpenos. Como muestra la figura 6, la similitud entre las estructuras de los sustratos GPP y FPP y sus respectivos modos de ciclación resulta evidente. Para el caso de FPP hay por lo menos cuatro tipos de ciclaciones que involucran la condensación inicial del doble enlace central o distal con el C₁. Esto ha llevado a que la investigación realizada se haya abordado de un modo análogo a la de la biosíntesis de monoterpenos y las conclusiones obtenidas han

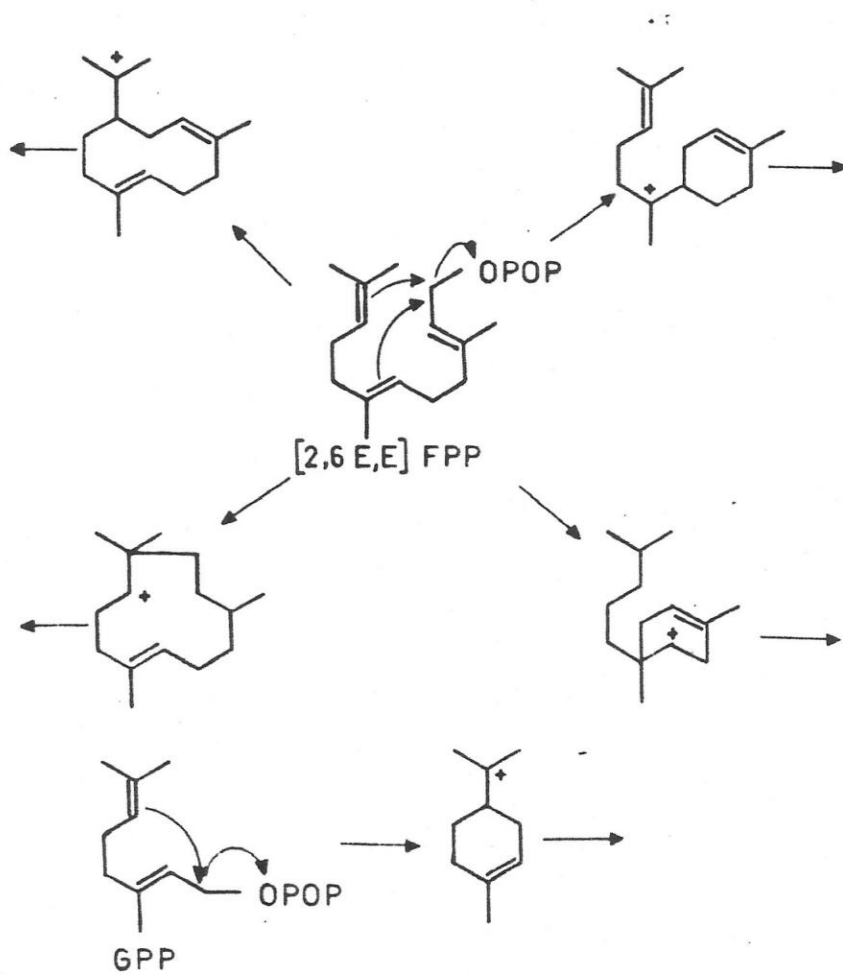


Figura 6

Ciclación de GPP y de FPP.

permitido obtener un panorama más general sobre el comportamiento de los difosfatos alílicos.

Así por ejemplo, el mecanismo de isomerización redox de los farnesoles se demostró en Citrus sinensis (Chayet y col., 1973) y en Andrographis paniculata (Overton y Roberts, 1974 a y b) y permite explicar la presencia de aldehídos en los aceites esenciales.

Por otra parte, también se demostró que (2,6-E,E.)FPP es sustrato de la formación de los sesquiterpenos ciclicos (Evans y col., 1976; Arigoni, 1975) y se postuló a su isómero terciario nerolidil difosfato, como intermediario de estas reacciones. Al igual que linalol, el alcohol respectivo de 15 carbonos, nerolidol se encuentra en numerosas plantas superiores (Simonsen y col., 1961). Aún cuando su origen y el del éster difosforilado ha sido un enigma, Cane e Iyengar (1978) demostraron la conversión de este último a ciclonerolidol, estableciendo así la primera evidencia de que un sustrato fosforilado terciario participe en una ruta de isoprenoides.

Al momento de iniciarse esta tesis se había logrado ya la purificación parcial de algunas de las monoterpeno ciclasas, pero se hacían experimentos de incorporación de precursores con extractos enzimáticos crudos en el caso de las sesquiterpeno ciclasas.

Al primer grupo de enzimas se les había retirado coloran-

tes (Chayet y col., 1977), fenoles, taninos y oxidasas (Banthorpe y col., 1977) que las inactivan, y parte de las fosfatasas que hidrolizan los sustratos (Croteau y Karp, 1979).

En el caso de la ciclasa de C. limonum se logra de este modo conservar la enzima en forma de polvo liofilizado después de una precipitación fraccionada con polietilenglicol 4000 por lo menos 4 años. Se puede disponer así de una fuente de enzima durante cualquier época del año, ya que el fruto presenta variaciones estacionales. La purificación adicional empleando el intercambiador DEAE-Sephadex (Cori y col., 1980) permite retirar más fosfatasas y colorantes contaminantes, con lo que se logra tener una preparación que tiene mayor actividad aunque es estable sólo un año.

En la tabla 1 se comparan diversas actividades enzimáticas de formación de monoterpenos y sesquiterpenos cíclicos. Además de los datos que se presentan en la tabla, cabe hacer notar que la actividad máxima de todas las monoterpeno ciclasas se obtienen a valores de pH entre 6 y 7 y que tanto éstas como las sesquiterpeno ciclasas presentan requerimientos absolutos por Mg^{2+} o Mn^{2+} .

La preparación enzimática cataliza la formación de los hidrocarburos α -pineno, β -pineno, limoneno, γ -terpineno y sabineno. La composición relativa de ellos fluctúa con la partida de limones, y aunque en ocasiones no se encuentran los dos últimos hidrocarburos, prácticamente todas las

TABLA 1

Comparación de monoterpeno y sesquiterpeno ciclasas
provenientes de diferentes fuentes

ORIGEN	SUSTRATO	PRODUCTO PRINCIPAL	ACT. ESPECIF. $\times 10^3$ ($\mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	$V_{\text{max}}/K_m \times 10^3$ ($\text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)
<i>C. sinensis</i> ^{a)}	NPP GPP	α -pineno, limoneno	200	-
<i>C. limonum</i> ^{b)}	NPP GPP	α y β pineno limoneno	6.700 10.000	6.000 3.300
<i>I. vulgaris</i> ^{c)}	NPP GPP	γ -terpineno	60 50	6,5 3,6
<i>F. vulgare</i> ^{d)}	NPP GPP	fenchol	0,5	-
<i>S. officinalis</i> ^{e_a, e_b)}	NPP GPP	1,8-cineol ^{e_a)}	90 8	9 -
	NPP GPP	bornil PP ^{e_b)}	111 119	6,4 130
<i>M. macrocarpus</i> ^{f)}	Copalil PP	kaureno	0,5	-
<i>S. fujikuroi</i> ^{g)}	FPP Nerolidil PP	ciclonerodiol	16 80	-
<i>I. roseum</i> ^{h)}	FPP	tricodieno	0,8	-

a) George-Nascimento y Cori, 1971

b) Chayet, y col., 1977

c) Poulouse y Croteau, 1978

d) Croteau y col., 1980

e_a) Croteau y Karp, 1977

e_b) Croteau y Karp, 1979b

f) Coates y Cavender, 1980

g) Cane y col., 1981

h) Cane y col., 1981

preparaciones tienen mayor contenido de β -pineno.

La tabla 2 muestra la proporción de hidrocarburos obtenidos utilizando una fracción enzimática proveniente de DEAE-Sephadex, y la de un aceite esencial obtenido del fruto. Si bien llama la atención que la composición relativa de ellos difiera, en especial en cuanto al contenido de limoneno y de α y β -pineno, es probable que la segunda columna refleje la composición de enzimas que se extraen y son relativamente estables bajo las condiciones de purificación, en tanto que la primera sea el producto de la acumulación en el flavedo.

De la discusión anterior, se puede apreciar que el esclarecimiento del mecanismo requiere resolver varias interrogantes, algunas de las cuales pueden ser analizadas empleando un sistema enzimático apropiado y otras se pueden estudiar en ausencia de enzimas.

Por ello en esta tesis nos hemos propuesto como objetivo la síntesis del probable intermediario LPP, el estudio de su comportamiento frente a la hidrólisis no enzimática, y el de su posible utilización por un extracto parcialmente purificado de C. limonum.

De la comparación de la reactividad de este compuesto en ausencia y presencia de enzima, debiera ser posible llegar a conocer algunos de los factores que aprovecha la enzima para catalizar la reacción.

TABLA 2

Composición de hidrocarburos del aceite esencial del flavedo de C. limonum y comparación con los productos obtenidos a partir de GPP por acción de las ciclasas.

HIDROCARBUROS	ACEITE ESENCIAL ^{a)} %	PRODUCTOS ^{b)} CICLASA %
Limoneno	72-80	15
α -pineno	2	12
β -pineno	7-13	51
γ -terpineno	10	8

a) Kefford y Chandler, 1970

b) Sánchez, 1979

MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos químicos, materiales cromatográficos y enzimas.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las firmas comerciales mencionadas en cada caso.

- Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis. E.E.U.U.:
Linalol, tricloroacetoneitrilo, trietilamina.
- Amersham Int. Laboratories. Buckinghamshire. Inglaterra:
 NaB^3H_4 .
- Associated Electrical Industrial Ltd. Inglaterra:
Apiezon L.
- Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal., E.E.U.U.:
Chelex 100.
- Dragoco, Holzminden, Alemania: Nerol, geraniol, terpineol, mircenol, limoneno, E y Z-ocimeno, terpineno.
- Merck A. G. Darmstadt, Alemania: Acetonitrilo, amoniaco, dioxano, n-propanol, éter de petróleo (40°-60°), éter etílico, acetona, LiCl, KCl, MgCl_2 , Na_2SO_4 , MnSO_4 , sílica gel H, molibdato de amonio.

- Riedel De Haën A. G. Seelze Hannover. Alemania: ácido silícico, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.
- Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, E.E.U.U: Tes, PPO, POPOP, SDS, 2-mercaptoetanol, DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-100, fosfatasa alcalina de E. coli, fosfatasa alcalina de intestino de ternera, hexoquinasa, seroalbúmina.
- Varian Aerograph, Walnut Creek, Cal., E.E.U.U.: Chromosorb W., etilenglicol adipato.
- Preparación de fosfato de bis(trietil amonio) y dioxano difosfato: La sal de fosfato de bis (trietilamonio) se preparó a partir de dioxano difosfato en acetonitrilo y trietilamina (Edmond y col., 1971), los que se mezclan a -25° . Los cristales de la sal de amonio se forman cuantitativamente en 24 hr a -18° . Dado que son muy higroscópicos se eliminó el solvente y restos de trietilamina filtrando al vacío y aplicando un plástico adhesivo sobre el embudo para evitar el contacto con el aire. La sal se guardó en un desecador al vacío con KOH como desecante hasta su utilización.

El dioxano difosfato se sintetizó mezclando ácido fosfórico y dióxano según el método descrito por Baer (1944).

2.2 Determinación de Radiactividad.

La radiactividad se determinó por contaje de centelleo para fase líquida. Se utilizó un contador Delta 300 calibrado

con estándares de [^3H] tolueno para muestras hexánicas y [^3H] H_2O para muestras acuosas. La eficiencia del conteo fue de 55% y 37% respectivamente.

La composición del líquido de centelleo fue:

- a) Para muestras hexánicas: 0,05 g POPOP y 4 g PFO por 1 l de tolueno. Se emplearon 3 ml de este líquido por muestra. El volumen máximo de muestra es 1 ml.
- b) Para muestras acuosas: 0,125 g POPOP 4 g PFO y 0,5 l de triton X-100 en 1 l de tolueno. Se emplearon 3 ml de este líquido por muestra. El volumen máximo de muestra es 0,3 ml.

2.3 Síntesis de sustratos.

La síntesis de [$1-^3\text{H}$] LP y de [$1-^3\text{H}$] LPP se realizó a partir de [$1-^3\text{H}$] GOH o de [$1-^3\text{H}$] GP. Los sustratos primarios [$1-^3\text{H}$] GPP y [$1-^3\text{H}$] NPP se sintetizaron y purificaron de acuerdo a metodología descrita (Holuigue, 1980).

2.3.1 Obtención de [$1-^3\text{H}$] GOH y de [$1-^3\text{H}$] GP.

Se empleó GOH purificado por destilación fraccionada en columna anular de banda rotatoria a 5-10 torr. El GOH puro analizado por GLC y por RMN, se oxidó con MnO_2 (Attenburrow y col., 1952). El aldehído resultante se redujo con NaB^3H_4 (Holuigue, 1980) obteniéndose como único producto GOH

tritiado.

Se obtuvo $[1-^3\text{H}]$ GP al fosforilar $[1-^3\text{H}]$ GOH por el método de Cramer modificado por Popjack y col. (1962), formándose como productos mono, di y trifosfatos de geranilo, y fosfatos inorgánicos. Los fosfatos de geranilo se separaron por cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sephadex A-25 (Rojas y col., 1983). La elución de la columna se efectuó con un gradiente lineal de bicarbonato de trietilamonio entre 50 y 600 mM, a pH 7,5. Los fosfatos de geranilo eluidos de la columna de intercambio se liofilizaron, con lo cual se eliminó cuantitativamente la sal de trietilamonio; luego se disolvieron en agua y se conservaron a 4°. El $[1-^3\text{H}]$ GPP se reservó para realizar experimentos de solvólisis y de biosíntesis.

2.3.2 Reordenamiento de $[1-^3\text{H}]$ GOH e hidrólisis de $[1-^3\text{H}]$ GP.

Para reordenar $[1-^3\text{H}]$ GOH, se empleó el procedimiento descrito por Valenzuela y Cori (1967), que consiste en hacer reaccionar $[1-^3\text{H}]$ GOH con HCl 0,1 N a 37° en acetona como solvente. Se produce una mezcla de alcoholes e hidrocarburos cuya composición depende del tiempo de reacción. Para nuestros fines se consideró adecuado trabajar hasta las 62 h de reacción. Tal como muestra la tabla 3, mayor tiempo de

TABLA 3

Productos del reordenamiento de [1-³H] GOH en medio ácido

	% Reacción 62 h	% Reacción 113 h
[1- ³ H] LOH	60	60
[1- ³ H] TOH	11	27
[1- ³ H] GOH	26	10
[1- ³ H] NOH	< 1	1
[³ H] HC	2	3

reacción no conduce a la obtención de mayor contenido de [1-³H] LOH sino que se empieza a acumular TOH.

La reacción se detuvo con KOH 0,1 N, se evaporó la acetona y se agregó n-hexano. El [1-³H] LOH así obtenido se separó de los restantes productos y del [1-³H] GOH que no reaccionó por medio de una cromatografía en columna de Adsorbosil-S.

La hidrólisis de [1-³H] GP se hizo en HCl 0,1 N, manteniéndose a 37° durante 10 min. Se detuvo la reacción con NaOH 0,1 N, y bajando la temperatura a 4°. Los alcoholes e

NPP no se elaboró un procedimiento de purificación adicional.

Se puede establecer con estos datos que a pH = 7, pH en que se realizó la hidrólisis del LPP, hay presente 64% del trianión LPP^{3-} y 36% del dianión $LPPH^{2-}$, ambos contribuyendo en la constante de reacción.

3.1.3 Participación del metal en la hidrólisis.

3.1.3.1 Velocidad de formación de productos.

El experimento se realizó a concentración constante del LPP y variando la concentración del metal. Se midieron velocidades iniciales, graficándolas en función de la concentración del metal (fig. 15). Las diferencias encontradas en la composición de productos se describirán más adelante (sección 3.1.3.7). En la figura se puede ver que al modificar la concentración del metal entre 0 y 4×10^{-3} M la velocidad de reacción o no se altera, con Mn^{2+} , o disminuye en un factor de 3, con Mg^{2+} , en tanto que a concentraciones superiores a 4×10^{-3} M, en ambos casos la velocidad aumenta significativamente pero sin llegar a un valor límite.

La forma de las curvas sugiere que el agregado de metal hasta 4×10^{-3} M lleva a la formación de una especie cuya reactividad es menor a la de una segunda especie que se forma



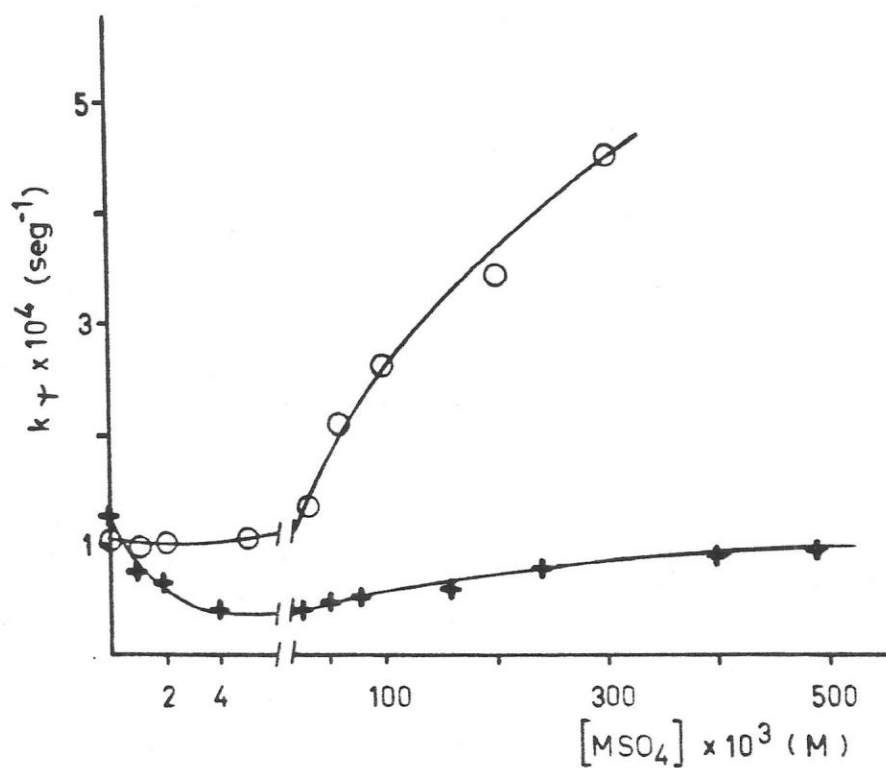


Figura 15 Efecto de la concentración de Mn^{2+} (O-O) y de Mg^{2+} (+ - +) sobre la constante de reacción de hidrólisis de $[\text{1-}^3\text{H}] \text{LPP}$.

$[\text{LPP}] = 14.4 \times 10^{-6} \text{ M}$; amortiguador TEB-HCl 0.1 M.
 pH = 7. $t^* = 30'$, tiempo de reacción = 5 min.

a concentraciones superiores. El comportamiento observado en la primera parte de la curva se puede atribuir a la formación de la especie ligante/metal = 1/1, cuya presencia se confirma por los datos de titulación (sección 3.1.3.2). La formación de una segunda especie con más de un ión metálico por mol de ligante, sería la responsable del aumento en la velocidad; el trazado de la segunda parte de estas curvas indica que esta especie no se formaría completamente en las condiciones de reacción.

La expresión cinética para la hidrólisis del LPP en presencia de M^{2+} se puede escribir, de este modo, en la forma general:

$$v = k_{\psi} [LPP_x - M_y]$$

x, y = estequiometría de complejos reactivos.

k_{ψ} = constante de velocidad de formación de productos a partir de los complejos reactivos.

Para el caso del LP, se observó un efecto sobre la velocidad de hidrólisis solamente frente al agregado de Mn^{2+} . La curva obtenida, (figura 16), muestra una saturación a concentración de 10^{-2} M lo que revela que se encuentra formada cuantitativamente la especie de mayor reactividad; concentraciones mayores del Mn^{2+} no produjeron un efecto cinético adicional al descrito, lo que indicaría que, a diferencia de lo que ocurre con LPP, en este caso

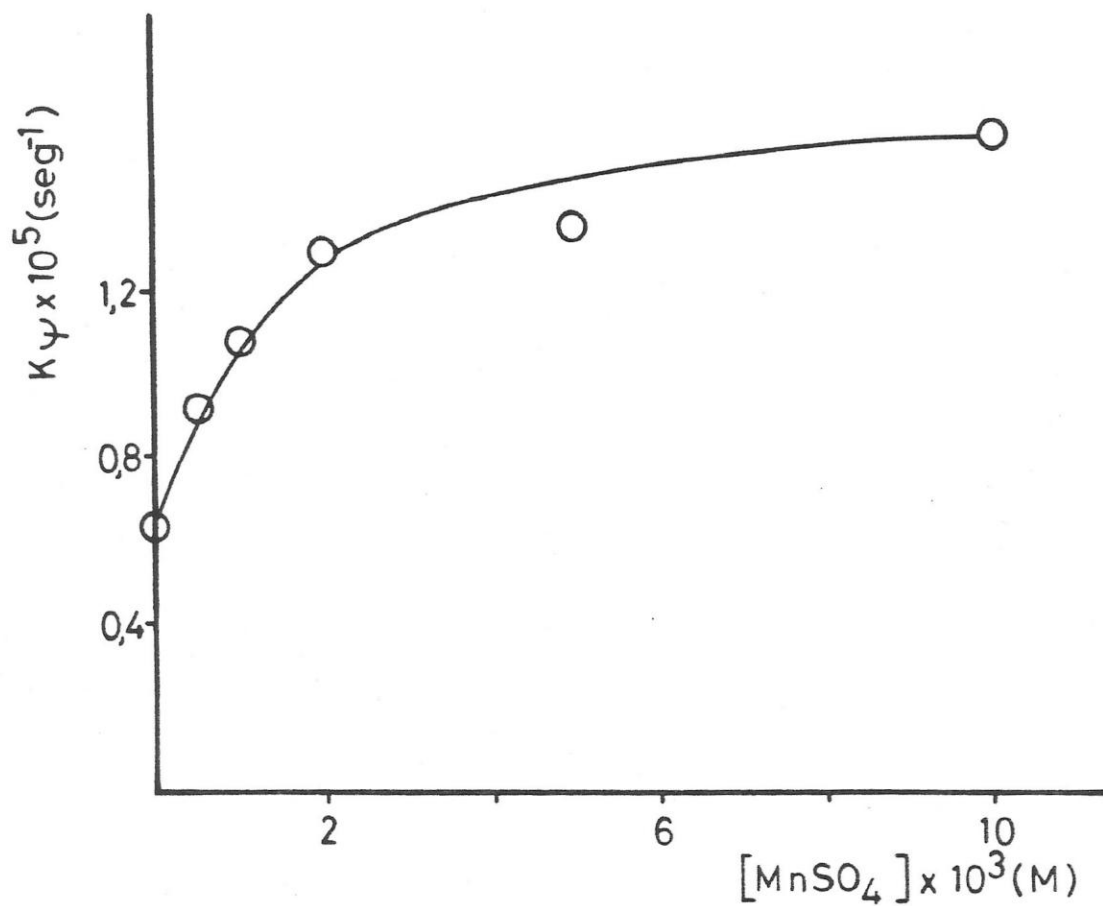


Figura 16 Efecto de la concentración de Mn^{2+} sobre la hidrólisis de $[\text{1-}^3\text{H}] \text{LP}$.

$[\text{LP}] = 38 \times 10^{-6} \text{ M}$; amortiguador TES-HCl 0,1 M, pH = 7,0, $t^\circ = 40^\circ$; tiempo de reacción 4,5 h.

cinéticamente se detecta una sólo especie que es más reactiva que el LP libre.

Con el Mg^{2+} no se observó un efecto cinético sobre la hidrólisis del LP al aumentar la concentración de este metal hasta 0,1 M, lo que puede significar que el LP no liga Mg^{2+} , o bien que el complejo $LPMg^{2+}$ tiene igual reactividad que el LP libre.

3.1.3.2 Cuantificación de la unión del metal y de las constantes de reacción.

Las observaciones descritas en cuanto a que la velocidad de hidrólisis se acelera al agregar Mg^{2+} o Mn^{2+} al medio de reacción hicieron necesaria la determinación cuantitativa de las constantes de unión ligante-metal y de las constantes cinéticas para poder relacionar la concentración de las especies presentes con las velocidades. Asimismo, dado que en los experimentos de biosíntesis de hidrocarburos cíclicos las ciclasas presentan requerimiento absoluto de estos cationes, también los resultados podrían informar sobre si hay o no relación entre la concentración de determinada especie presente y las velocidades de reacciones enzimáticas y, en consecuencia, permitiría proponer un mecanismo común que permita explicar el cierre de anillo a partir de los difosfatos alílicos.

Las constantes de ionización y de asociación con cationes han sido exhaustivamente estudiadas para el caso de los

nucleótidos de adenina y de otras bases (Sigel y Amsler, 1976; O'Sullivan y Smithers, 1979). En cambio, para los difosfatos y monofosfatos alílicos prácticamente no existen datos. Las razones para esta ausencia de información son varias: ninguno de ellos existe comercialmente; son inestables incluso a pH sólo ligeramente ácido (pH = 6,5) y la presencia de cationes bivalentes acelera notablemente la hidrólisis, lo que hace la obtención de estos parámetros bastante dificultosa.

Si bien los experimentos de hidrólisis y de biosíntesis se hacen a pH = 7, se estimó conveniente determinar la concentración de ligante libre que se encuentra como trianión y como dianión en un rango de pH entre 4,5 y 9. Tomando en cuenta los equilibrios que se representan en el esquema de la figura 17, se puede determinar la unión del metal a cada una de las formas de ligante.

Este esquema considera la formación del complejo monometálico $RPPM^-$ a través de la unión de metal al difosfato desprotonado RPP^{3-} , K_{1f} , y al difosfato protonado $RPPH^{2-}$, K_{3f} ; con este último se formaría un complejo metálico ácido que disociaría el protón, K_4' . Finalmente, frente al agregado de cantidades adicionales de metal, se formaría un complejo bismetálico, K_{2f}' . Cualquiera de las especies presentes en el medio de reacción se puede hidrolizar con su constante cinética característica, k_0 , k_1 o k_2 . Los apéndices 1 y 2 contienen las deducciones de los procedimientos de obtención

de K_{1f} , K_{3f} , K_4' y K_{1f}' a pH = 7, basadas en el esquema presentado y que involucró una medición potenciométrica, en tanto que el apéndice 3 incluye el procedimiento de obtención de K_{2f}' que involucró una metódica cinética.

Es de destacar que los métodos y cálculos son igualmente válidos para el monofosfato en el que se espera que un mol de metal se una por mol de ligante, de acuerdo al esquema de la figura 18.

Para determinar las constantes de unión a metal, se utilizó un procedimiento similar al descrito por Taqui Khan y Martell (1962), el cual fue adaptado y corregido para su aplicación a los compuestos en estudio. Su deducción se encuentra en el apéndice 1.

El método, descrito en la sección 2.5, se basa en un cambio en la curva de titulación del ligante en presencia de metal con respecto a una curva del ligante libre, al formarse complejos con el metal.

La figura 19 muestra un experimento típico en que se tituló LPP en presencia y ausencia de Mn^{2+} . Puede verse que la titulación se efectuó en el rango de pH 4,4-9. De este modo se realizaron también las titulaciones de los compuestos GPP, NPP y LP en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} . Se optó por no trabajar a valores de pH inferiores a 4,4 dado que la velocidad de hidrólisis, en especial de LPP y LP, aumenta notablemente. Con la ayuda de las constantes de ionización de

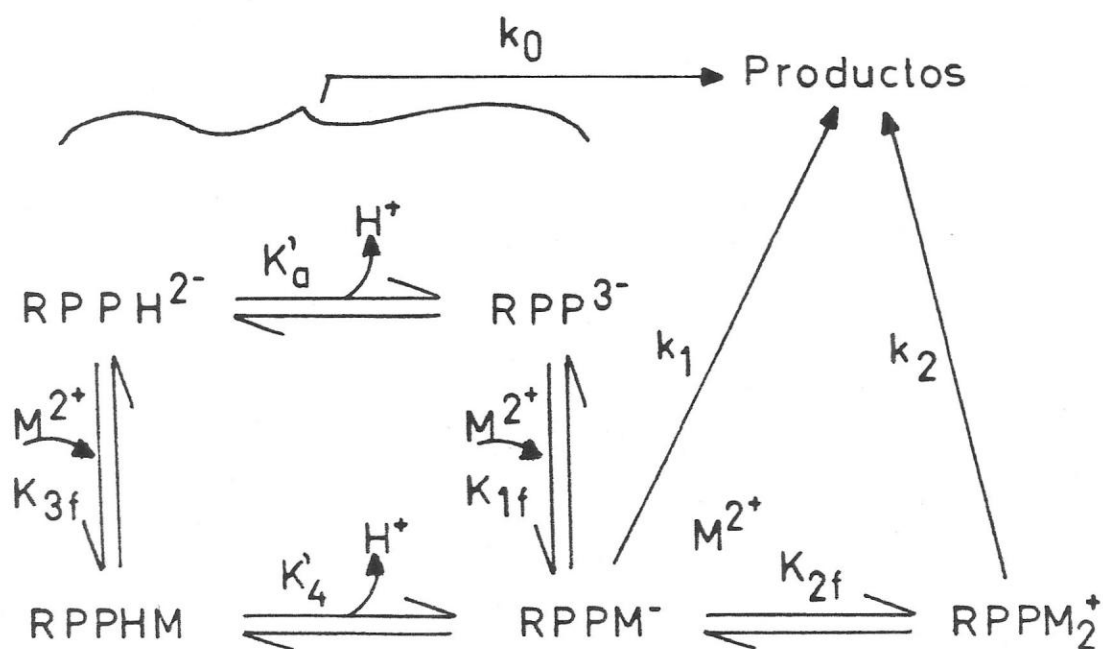


Figura 17 Constantes de formación de complejos mono y bis-metálicos y constantes de velocidad de hidrólisis del ligante libre, $RPPH^{2-}$ y RPP^{3-} , y de los complejos $RPPM^-$ y $RPPM_2^+$.

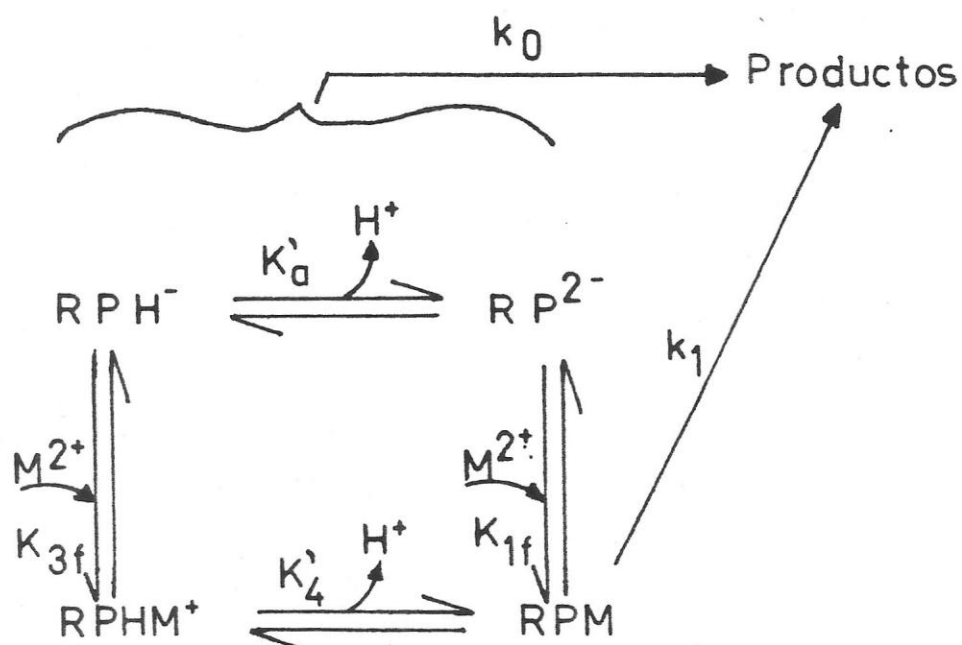


Figura 18 Constantes de formación de los complejos mono-metálicos y constantes de velocidad de hidrólisis de ligante libre RPH^- y RP^{2-} y del complejo RPM .

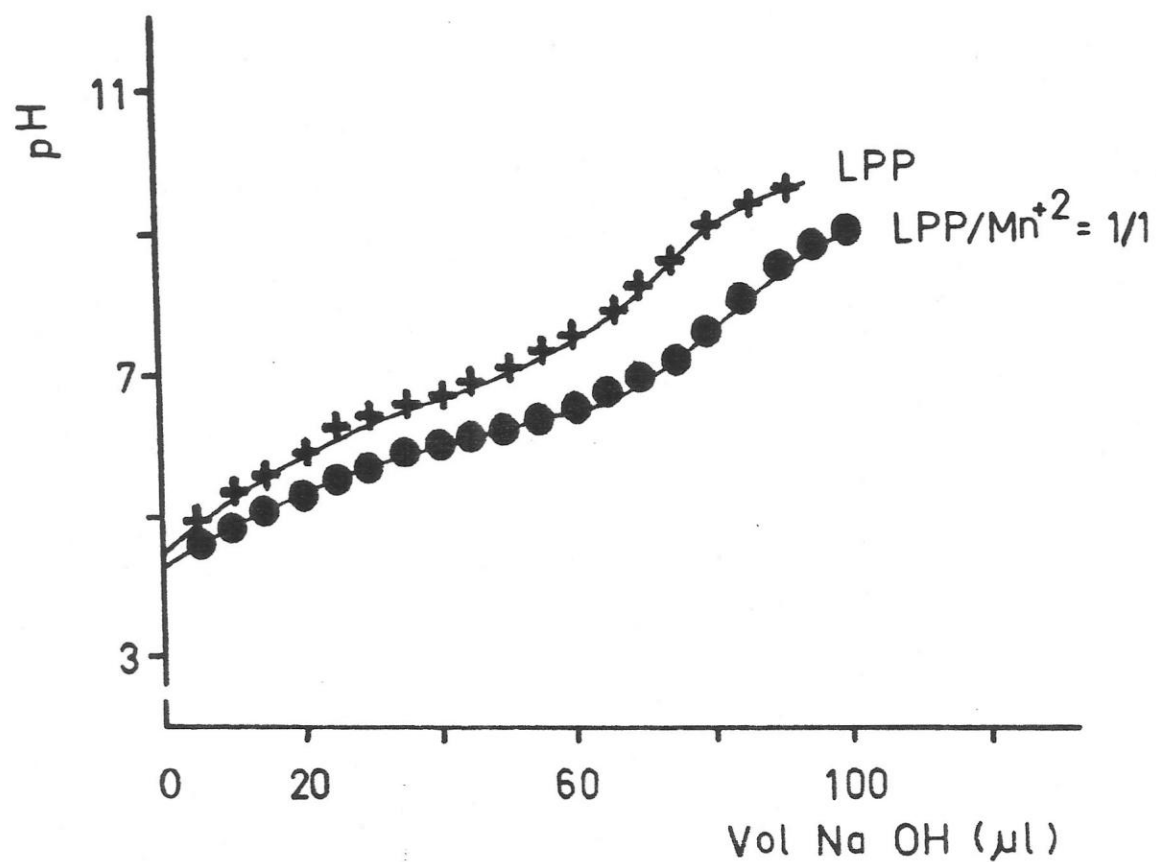


Figura 19 Titulación potenciométrica de LPP/Mn²⁺ = 1/1.

[LPP] = 1×10^{-3} M ; [Mn²⁺] = 1×10^{-3} M ; [NaOH] = 0,162 N ; t° = 25° ; I = 0,1 M.

los compuestos previamente obtenidos, en que $pK_a' \text{ LPP} = 6,75$ y, considerando que la disociación de $\text{RPPH}_2^- \longrightarrow \text{RPPH}^{2-} + \text{H}^+$ debe ocurrir a un pH muy semejante al de ADP (Phillips, 1966) o de IP (Tidd, 1971) que es de 2 y 2,5 respectivamente, se calculó que para el caso de LPP a $\text{pH} = 4,45$ se debe encontrar 99,5% en la forma de LPPH^{2-} y solamente 0,5% en la forma de LPP^{3-} . Así, se estaría titulando a valores de pH 4,45 y superiores la contribución a la unión del metal de las formas protonada y desprotonada de LPP.

Por otra parte, es de destacar que a valores de pH superiores a 7 se notaron fluctuaciones en las mediciones, probablemente debidas a la formación de hidroxocomplejos de Mg^{2+} o Mn^{2+} , por lo que los cálculos de determinación de las constantes se limitaron al rango de pH 4,7 - 6,7 en que se encuentran presentes las dos especies en estudio.

Además, con el fin de evitar la participación de un posible complejo bismetálico en equilibrio con el resto de las especies, el experimento se hizo en una relación equimolar y con concentraciones de RPP y metal relativamente bajas, de 1mM. Manteniendo esta relación, también se puede considerar insignificante la participación de una eventual especie $(\text{RPP})_2\text{M}$ proveniente de un equilibrio $\text{RPPM} + \text{RPP} \rightleftharpoons (\text{RPP})_2\text{M}$, ya que no habría RPP libre más que para formar RPPM.

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.6.1.1, se obtuvo en primer lugar la concentración de metal libre para

diferentes puntos de la curva de titulación. En las curvas de la fig. 20 se ve, como era de esperar, que en la medida que aumentan el pH y la constante de unión K_{1f} , que representa el equilibrio $LPP^{3-} + M^{2+} \xrightleftharpoons{K_{1f}} LPPM^{-}$, la concentración del metal libre disminuye.

Los valores de concentración de metal obtenidos de este modo se incorporaron en la ecuación 8, lo que permitió realizar la gráfica secundaria que se muestra en la inserción; en el punto de intersección de las curvas se hallan:

$$K_{1f} = 30.200 \text{ M}^{-1} \quad \text{y} \quad K_{3f} = 270 \text{ M}^{-1}$$

Finalmente, se pudo obtener la constante de ionización del complejo $LPPHMn$, K_4' , empleando la ecuación 9.

$$K_4' = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Las 21 constantes restantes se determinaron por el mismo procedimiento y los resultados se resumen en las tablas 10 y 11.

Aunque no se investigó si las sales agregadas tenían o no un efecto específico, se encontró que al hacer el experimento ajustando a $I = 0,8 \text{ M}$ que prácticamente se superponen las curvas de titulación en ausencia y en presencia de metal; ésto indicaría que la alta concentración de electrolitos estaría impidiendo la formación de los complejos monometálicos.

Por otra parte, es probable que en la determinación de la constante de unión de LP-Mg haya un importante margen de error, ya que el desplazamiento de la curva de LP-Mg respecto a la de LP libre resultó muy pequeño. No se logró mayor desplazamiento aún al agregar una concentración de Mg^{2+} 4 veces mayor. El valor que se informa en la tabla es el más bajo obtenido para todos los complejos en estudio e indica que prácticamente no hay unión. Esto se pudo corroborar al intentar medir la formación del complejo por el método espectrofotométrico con 8-hidroxiquinolina (Burton, 1959) en que no se observó unión. Este hecho permite por tanto, concluir que la observación previa de que Mg^{2+} no afecta la velocidad de hidrólisis de LP (fig. 16), se debería, entonces, a que en las condiciones de reacción LP se mantiene preponderantemente en su forma libre.

Según la tabla 10, los valores de K_{3f} para los difosfatos son de orden de magnitud semejantes (entre 50 y 270 M^{-1}) y mucho más bajos que los de los complejos del trianión RPP^{3-} , resultado que concuerda con lo descrito para los complejos metálicos de derivados fosforilados de adenosina (Taqui Khan y Martell, 1962), y que se debería a la mayor densidad de carga en el trianión respecto al dianión. Este mismo hecho explica, además, la diferencia que se encuentra entre las constantes de unión del difosfato y monofosfato: si se compara K_{1f} para LPP y LP con Mn^{2+} , se observa que la estabilidad del complejo

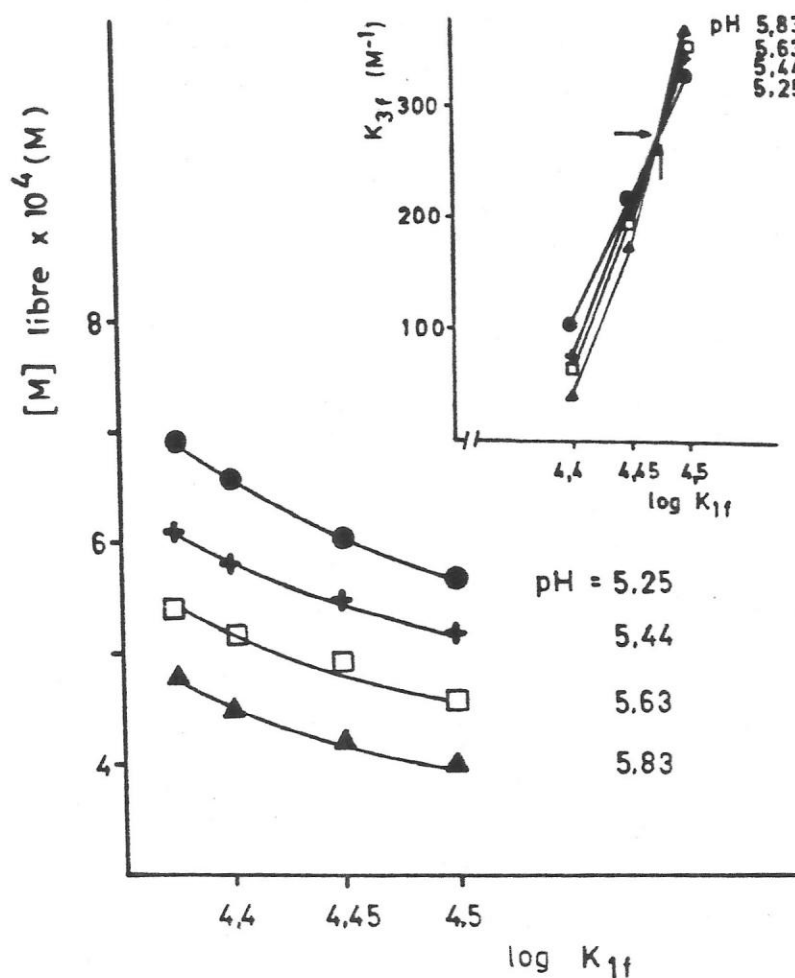


Figura 20 Determinación de las constantes de unión de LPP^{3-} y LPPH^{2-} a Mn^{2+} (K_{1f} y K_{3f}).

En el gráfico principal se representa la variación de la $[\text{M}]_{\text{libre}}$ en función de $\log K_{1f}$ a pH 5.25 (O - O); pH 5.44 (+ - +); pH 5.63 (□ - □) y pH 5.83 (▲ - ▲).

En la inserción, determinación gráfica de los valores de K_{1f} y K_{3f} .

TABLA 10

Constantes de unión de $RPPH^{2-}$, RPP^{3-} , RPH^{-}
y RP^{2-} a Mn^{2+} y Mg^{2+}

RPP/M o RP^{2+}	$K_{1f} (M^{-1})$	$K_{3f} (M^{-1})$
LPP/Mn^{2+}	30.200	270
LPP/Mg^{2+}	11.700	215
LP/Mn^{2+}	1.100	110
LP/Mg^{2+}	275	80
GPP/Mn^{2+}	24.500	175
GPP/Mg^{2+}	2.800	50
NPP/Mn^{2+}	52.500	90
NPP/Mg^{2+}	5.700	110

K_{1f} representa unión $RPP^{3-} + M^{2+} \rightleftharpoons RPPM^{-}$

K_{3f} representa unión $RPPH^{2-} + M^{2+} \rightleftharpoons RPPHM$

Las fluctuaciones no sobrepasan el 7%
excepto para LP/Mg^{2+} .

TABLA 11

Constantes de disociación de protón $RPPH^{2-}$ y $RPPHM$

RPP o RP	pK_a'	M = Mn ²⁺ pK_4'	M = Mg ²⁺ pK_4'
LPP	6,75	4,7	5,0
LP	6,75	5,7	6,2
GPP	6,55	4,4	5,8
NPP	6,35	3,6	4,6

K_4' representa la disociación $RPPHM \rightleftharpoons RPPM^- + H^+$

LPPMn⁻ es 27 veces mayor que la de LPMn.

Finalmente, otra importante conclusión que se puede obtener de esta tabla, es que las constantes de formación de los complejos con Mn²⁺ son mayores que las que se obtienen con Mg²⁺, independientemente de si se trata del ligante RPP³⁻ o de RPPH²⁻.

Este es un comportamiento general para moléculas que contienen fosfato, difosfato o trifosfato, como por ejemplo adenosin mono, di y trifosfato, hexosafosfato o fosforil creatina (O'Sullivan y Smithers, 1979). Si se considera la dureza absoluta de Mg²⁺ y Mn²⁺ se puede, en principio, predecir el tipo de enlaces que debieran establecer. Pearson (1987 y 1988) ha cuantificado la dureza de diversas moléculas y la ha relacionado con la teoría de orbitales moleculares en estos términos: "Las moléculas duras tienen una gran diferencia en la energía de los orbitales HOMO-LUMO y las moléculas blandas tienen una diferencia pequeña". Como consecuencia de esto, las primeras establecen enlaces debidos a cargas electrostáticas, en tanto que las segundas, que son más polarizables, forman enlaces en que predomina la covalencia.

En forma abreviada se presenta en la tabla 12 la dureza absoluta y las energías de los orbitales HOMO-LUMO de algunos cationes, de moléculas neutras y de aniones.

En la tabla se encuentra el valor de la dureza de H₂O,

TABLA 12

Dureza absoluta y energía de orbitales HOMO-LUMO de algunos cationes, moléculas neutras y aniones.

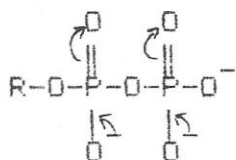
	n (eV)	I (eV)	A (eV)
Li ⁺	35	76	5
Na ⁺	21	47	5
K ⁺	14	32	4
Mg ²⁺	33	80	15
Mn ²⁺	9	34	16
Co ²⁺	8,2	33,5	17
Cu ²⁺	8,3	37	20
H ₂ O	9,5	12,6	-6,4
H ₂ S	6,2	10,5	-2,1
HF	11	16	-6,0
HCl	8	12,7	-3,3
HI	5,3	10,5	0,0
OH ⁻	5,7	13,2	1,8
SH ⁻	4,1	10,4	2,3

n = dureza absoluta; I = -E HOMO; A = -E LUMO (Pearson, 1988).

$n = 9.5$ ev, porque aparte de que se puede emplear como una molécula de referencia, es el solvente con el que Mn^{2+} se encuentra inicialmente coordinado y al formar el complejo lo sustituye el oxígeno del difosfato. La constante de velocidad para esta reacción de sustitución es $k_{\psi} = 5 \times 10^6 \text{ seg}^{-1}$ (Purcell y Kotz, 1979).

De los valores tabulados se desprende que Mn^{2+} es un catión mas blando que Mg^{2+} y que la diferencia HOMO-LUMO de ellos es 18 y 65 ev, respectivamente, indicando ésto que Mn^{2+} presenta mayor polarizabilidad que Mg^{2+} y, por lo tanto, formará enlaces con cierto grado de covalencia, a diferencia de Mg^{2+} que preferentemente participará en interacciones de tipo iónico.

Por otra parte, aunque no se dispone de información sobre la dureza de moléculas complejas, se puede como aproximación, estimar que la dureza local de los átomos dadores en:



debería ser inferior a la de H_2O u OH^- si se considera que la insaturación ablanda o aumenta la polarizabilidad de los átomos y que este anión deslocalizado tendría gran tamaño efectivo. Esto permitiría visualizar un cierto grado de

covalencia entre Mn^{2+} y $R-P_2O_7^{3-}$. A diferencia de Mg^{2+} , el Mn^{2+} posee orbitales d semillenos de simetría apropiada para interacciones con orbitales p llenos del oxígeno del ligando; como en H_2O u OH^- , el oxígeno en este caso se comporta como dador π y sus electrones se deslocalizarán sobre los orbitales 3d del Mn^{2+} .

Para Mg^{2+} , la situación es diferente: sus orbitales de valencia son muy estables ($2s^2 2p^6$) y no dispone de orbitales 3d asequibles (la diferencia energética entre orbitales HOMO-LUMO es 65 ev) que pudieran participar contribuyendo con algún grado de covalencia, de tal modo que la interacción con el difosfato se puede estimar que sería esencialmente debida a las cargas de ambos iones.

Con respecto a las constantes de disociación de protón de los complejos monometálicos RPPHM que, expresadas como pK_4' , se han informado en la tabla 11, se puede ver que el metal aumenta la acidez del último protón, ya sea se trate del éster fosfato o difosfato, y que introduce una marcada diferencia en los valores de pK_4' de los complejos con Mn^{2+} respecto a los de Mg^{2+} , siendo los primeros en todos los casos más bajos que los segundos. Esto sería una consecuencia de la unión de los metales a $RPPH^{2-}$. Sin embargo, tomando en cuenta K_{3f} y pK_4' se puede concluir que estos complejos protonados no tienen importancia significativa en el rango de pH neutro a pesar del hecho de que en el rango ácido su concentración puede ser

apreciable; este hecho se pone especialmente de manifiesto al obtener la constante de unión total aparente de la especie monometálica, K_{1f}' , como se describe a continuación.

3.1.3.3 Constante de unión aparente de la especie monometálica, K_{1f}' .

Para poder establecer las concentraciones de las diferentes especies presentes en los experimentos de hidrólisis y en los de biosíntesis, se determinó la constante de unión total aparente a $\text{pH} = 7$, K_{1f}' . Para ésto, en forma general se consideró el equilibrio $M + \text{RPP} \rightleftharpoons \text{RPPM}$, en que RPP corresponde a las especies RPP^{3-} y RPPH^{2-} . La deducción de la ecuación se describe en el apéndice 2.

En la tabla 13 se resumen los valores obtenidos por titulación en este trabajo y algunos valores informados en la literatura que fueron obtenidos por el método de competencia con 8-hidroxiquinolina (Burton, 1959). Además, en la tabla se incluyen las constantes respectivas para ATP, ADP y AMP, moléculas para las cuales hay una amplia información; en presencia de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} o Ni^{2+} estos derivados establecen una marcada interacción entre la porción adenina y el metal además de la interacción entre el fosfato y el metal; en presencia de Mn^{2+} esta interacción es débil, en tanto que

TABLA 13

Constante de unión aparente de mono y difosfatos
alílicos y de derivados de adenosina a pH = 7

	K_{1f}^{\prime} (M^{-1})	
	Mn^{2+}	Mg^{2+}
LPP	19.400	7.600
LP	740	205
GPP	18.200 (25.000) ^{a)}	2.100 (7.700) ^{a)}
NPP	42.900	4.700 (2.500) ^{a)}
ATP	60.200 ^{b)}	16.600 ^{b)}
ADP	14.500 ^{c)}	1.500 ^{c)}
AMP	200 ^{d)}	70 ^{d)}

a) Obtenido por competencia con 8-hidroxiquinolina (Chayet y col., 1984).

b) y c) Obtenidos por titulación potenciométrica (Tagui Khan y Martell, 1962 a y b).

d) Recopilado por O'Sullivan y Smithers (1979).

Ca^{2+} o Mg^{2+} solamente interactúan con el grupo fosfato (Sigel 1987). Por tanto, se estima apropiada la comparación que aquí se hace.

Se desprende de la tabla que las constantes de unión total aparente tienen valores sólo ligeramente inferiores a las respectivas constantes de unión del trianión RPP^{3-} o dianión RP^{2-} descritas en la tabla 10. Para el caso de LPP, que se puede considerar como ejemplo representativo de los compuestos restantes, esto se debe a que a pH 7 solamente un 36% existe en la forma de dianión, LPPH^{2-} , el que une débilmente al metal, de modo que la contribución de esta especie es baja.

Por otra parte, al comparar los valores obtenidos en esta tesis con los obtenidos por complejación con 8-hidroxi-quinolina, se observa que no hay una diferencia significativa.

El método que hemos empleado tiene la ventaja por sobre este último, de que con la sólo utilización de la ecuación 10 se puede conocer la K_{1f} total aparente en un rango amplio de pH (fig. 21), a diferencia del método de Burton, en que la determinación de la constante se efectúa a un pH prefijado y, aún más importante para nuestra investigación, es el hecho de que la determinación por pH no tiene restricciones en cuanto al catión a estudiar, en cambio con 8-hidroxiquinolina el rango útil de trabajo se encuentra entre pH 7,7 y 9,1, rango en el cual Mn^{2+} tiende a precipitar formando hidróxidos

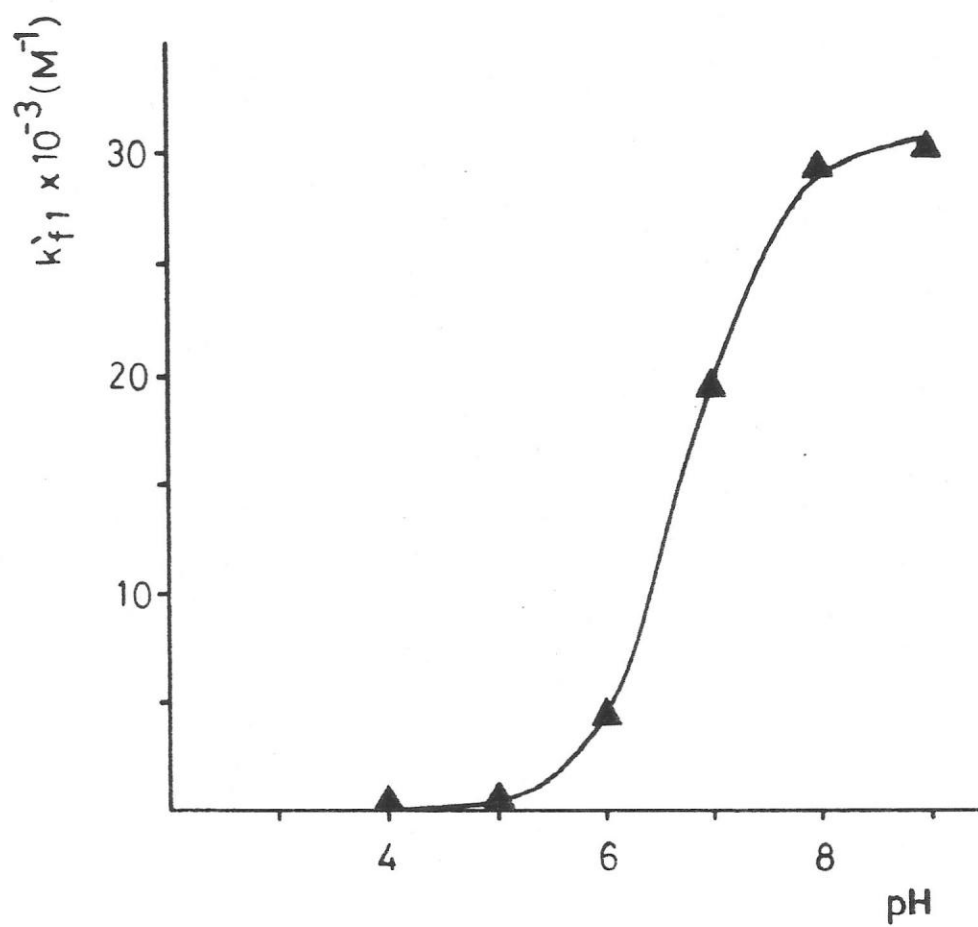


Figura 21 Variación de K_{f1} con el pH.

TABLA 14

Concentración de ligante libre, especie monometálica
y especie bismetálica a pH = 7.

RPP	M	S (μM)	SM ₁ (μM)	SM ₂ (μM)
LPP	Mn	203	796,4	0,65
LPP	Mg	303	697	0,04
GPP	Mn	183	813	36,8
GPP	Mg	482	503	14,6
NPP	Mn	142	858,3	0,13
NPP	Mg	368	631,7	1,17

[RPP] = [M] = 1 mM.

complejos y óxidos insolubles (Butler, 1964).

Para comprobar la validez de las deducciones hechas para el cálculo de las constantes de formación de las especies monometálicas (Apéndice 1 y 2) y por tanto de los resultados obtenidos, se calculó la concentración de ligante libre, especie mono y bismetálica presentes durante las titulaciones a $\text{pH} = 7$. Para ésto se emplearon las ecuaciones 17 y 18 del apéndice 4 y los valores de K_{1f}' y K_{2f}' ; la obtención de este último se presenta en la siguiente sección.

La tabla 14 muestra que en todos los casos estudiados, el ligante se encuentra predominantemente en la forma de especie monometálica y que prácticamente no hay presente complejo bismetálico. El único caso en que se encuentra representando un 3,7% del ligante total es en la titulación de GPP - Mn; en este caso se estimó conveniente no disminuir la concentración de metal ya que si bien se lograba bajar la concentración del complejo, también se producía un aumento de la concentración del ligante libre. Además, éstos son valores máximos calculados y que en la práctica fueron menores ya que los valores de pH empleados en la determinación de K_{1f} y K_{3f} estuvieron en el rango 4,7 - 6,7. Finalmente, la tabla 13 muestra que las magnitudes de K_{1f}' para los nucleótidos ADP y AMP con Mn^{2+} o Mg^{2+} no varían sustancialmente respecto a los ésteres fosfóricos estudiados. Se desprende así como conclusión de validez general que en aquellos compuestos en

los que la interacción del metal se establece por la porción fosfato, los valores de las constantes se encuentran en un orden de magnitud similar y que principalmente están determinadas por el número de grupos fosfatos presentes en el éster.

3.1.3.4 Estequiometría del complejo de LPP con M^{2+} .

Para obtener la estequiometría del complejo de mayor reactividad, se empleó el método de las variaciones continuas de Job (1933). Con este fin se graficaron las velocidades iniciales de hidrólisis en función de la fracción molar de metal, expresada como $[M^{2+}]/[M^{2+}] + [LPP]$, manteniendo el denominador constante. Las especies reactivas $M^{2+}/LPP = 1/2$; $1/1$ o $2/1$ se deberían evidenciar por sus velocidades máximas a valores de fracción molar 0,33; 0,5 o 0,67, respectivamente. La fig. 22 muestra el resultado obtenido con Mn^{2+} , en que la velocidad máxima se observa a un valor de fracción molar de 0,5, es decir, cuando $[Mn^{2+}] = [LPP]$. Al utilizar Mg^{2+} se obtuvo un resultado similar a éste.

Con los valores de constantes de formación de los complejos mono y bismetálicos que se informan en la siguiente sección, se calcularon las concentraciones de LPP libre, LPP-Mn y LPP-Mn₂ en cada punto del experimento. Se pudo así restar a la velocidad observada la contribución de LPP libre y se pudo establecer que en el punto de fracción molar 0,67 hay

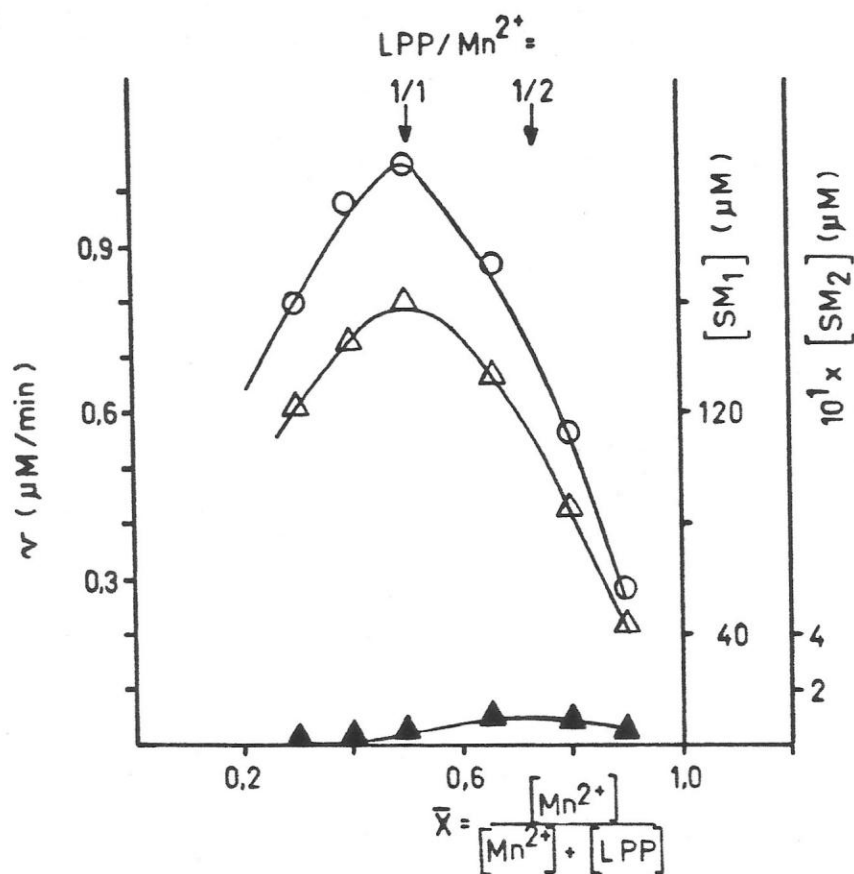


Figura 22 Efecto de la fracción molar de Mn^{2+} sobre la velocidad de formación de alcoholes e hidrocarburos (O - O) y sobre las concentraciones de especies monometálica ($\Delta - \Delta$) y bimetálica ($\blacktriangle - \blacktriangle$).

$[LPP] + [Mn^{2+}] = 0.5 \times 10^{-3}$ M ; amortiguador TES-HCl 0,2 M pH 7,0 ; temp = 30° ; tiempo = 5 min.

En cada punto se restó la contribución de la reacción de LPP libre.

presente $0,106 \mu\text{M}$ del complejo bismetálico, lo que representa solamente $0,06\%$ del total de las especies en solución; en este punto la concentración de LPPMn es $134 \mu\text{M}$.

A diferencia de lo observado para el caso de GPP (Vial y col., 1980) en que el complejo bismetálico se forma en alta concentración en el medio y es la especie más reactiva, en este caso las concentraciones relativas de LPPMn y LPPMn₂ representaron una seria limitación para detectar la presencia del segundo complejo.

En conclusión, el método empleado demuestra la presencia de la especie monometálica, fundamentalmente porque ésta se encuentra en mayor concentración respecto a la especie bismetálica.

3.1.3.5 Constantes de velocidad de las especies mono y bismetálicas k_1 , k_2 y constante de formación de la especie bismetálica, K_{2f} .

Los experimentos y resultados recientemente descritos han puesto de manifiesto la existencia de los complejos monometálicos y el valor de sus constantes de formación.

Al analizar con esta información las fig. 15 y 16, que muestran el efecto cinético en la hidrólisis de LPP y LP frente al agregado de Mn^{2+} o Mg^{2+} , se puede establecer que en

la primera zona de la figura 15, entre 0 y 4×10^{-3} M de M^{2+} , se estarían formando dichos complejos; por sobre 4×10^{-3} M la velocidad aumenta sin llegar a un valor límite, lo que indica que cinéticamente se detecta la formación de una segunda especie, que correspondería al complejo $LPPM_2$. La especie $RPPM_2$ se puso en evidencia al hacer el gráfico de Job con GPP y Mn^{2+} ; dado que su constante de formación es suficientemente alta, $K_{2f} = 666 M^{-1}$ (Vial y col., 1981), predomina por sobre $RPPM^-$ a altas concentraciones del metal.

Así, de la primera parte del gráfico se puede obtener la constante cinética k_{1LPPM^-} , en tanto que de la segunda parte se obtiene k_{2LPPM^+} ; los resultados obtenidos para k_2 se informan más adelante.

Para el caso de LP, en cambio, solamente se detecta el complejo $LPMn$ y su k_1 respectiva se obtuvo de la saturación de la curva de la figura 16. No se detectó la formación de un complejo bismetálico, cuya formación desde el punto de vista estructural es improbable. Por otra parte, tal como se comentara en la sección 3.1.3.2, la unión de LP a Mg^{2+} es muy débil, de ahí que en el rango de concentración de Mg^{2+} en que se estudió la hidrólisis no se observa un cambio en la velocidad como consecuencia del agregado de este metal, y por tanto no se determinó k_1 .

La tabla 15 muestra los valores de k_1 obtenidos en este trabajo junto con los que se encuentran disponibles para los

TABLA 15

Constantes de hidrólisis de esteres de fosfato y difosfato unidos a Mn^{2+} o Mg^{2+} (k_1).

RPPM ₁ ⁻ o RPM ₁	k_1 (seg ⁻¹)
LPPMn	$1,1 \times 10^{-4}$
LPPMg	$4,3 \times 10^{-5}$
LPMn	$1,7 \times 10^{-5}$
LPMg	-
GPPMn ^{a)}	$3,4 \times 10^{-7}$
GPPMg ^{b)}	$5,5 \times 10^{-7}$
NPPMn ^{b)}	$1,2 \times 10^{-5}$
NPPMg ^{b)}	$1,9 \times 10^{-6}$

Las constantes cinéticas para LPPMn y LPPMg se obtuvieron a 30° a partir de los datos de la fig. 15. El resto de las constantes se determinaron a 40°. La fig. 16 muestra las condiciones en que se obtuvo k_1 LPMn.

a) Obtenido de Vial y col. (1981).

b) Obtenido de Chayet y col. (1984).

isómeros primarios GPP y NPP. Al comparar estos valores con los de la tabla 8 para los compuestos libres, se puede concluir que la reactividad de los complejos $RPPMn^-$ es igual a la de la especie libre. Prácticamente lo mismo ocurre para $GPPMg$ y $NPPMg$, en tanto que para $LPPMg$ se observa una disminución. Se tiene, de este modo, que en general la neutralización parcial de la carga del trianión no contribuye en forma significativa a favorecer la salida del grupo difosfato.

A diferencia de los complejos anteriores, el complejo $LPMn$ es 2,7 veces más reactivo que LP libre; en este caso las cargas negativas de los oxígenos quedan completamente neutralizadas, y el grupo saliente $MnHPO_4$ tiene carga neta 0. (Este argumento se basa en que, aunque el pK_a' de $H_2PO_4^-$ = 7,21 (Handbook of Chem. and Phys., 1968), hemos demostrado que la presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} aumenta notablemente la acidez del protón en el complejo $RPPM$, situación que debería ser semejante para el complejo inorgánico).

Volviendo al ester difosfato, en que se detecta el complejo $LPPM_2$, la expresión de velocidad para la hidrólisis de LPP corresponde a:

$$13) \quad v_{obs} = k_0[LPP] + k_1[LPPM^-] + k_2[LPPM_2^+]$$

en que al agregar M^{2+} se desprecia la contribución de LPP

libre en la v_{obs} dados los valores tan altos de K_{1f}' .

La determinación de k_2 para $LPPMn_2^+$ se realizó empleando la ecuación 14 en sus formas linearizadas (ecuaciones de Hanes y Woolf (1932) y Eisenthal y Cornish-Bowden (1974), apéndice 3), en tanto que para $LPPMg_2^+$ debió realizarse por simulación de esta misma ecuación con computador ya que la reacción de hidrólisis no tiende a la saturación.

Del gráfico de Hanes y Woolf (fig. 23) se puede obtener, además de k_2 , el valor de K_2' de disociación que corresponde al equilibrio $LPPMn_2^+ \rightleftharpoons LPPMn^- + Mn^{2+}$. Así se logran los siguientes valores:

$$k_2 = 6,8 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$$

$$K_2' \text{ dis} = 0,3 \text{ M} \implies K_2f' = 3,3 \text{ M}^{-1}$$

De acuerdo al método gráfico de Eisenthal y Cornish-Bowden (fig. 24) se obtienen valores de k_2 y $K_2' \text{ dis}$ muy similares a los determinados por el gráfico de Hanes y Woolf, y se prefirió optar por estos valores ya que con este método se ponderan todos los datos por igual.

$$k_2 = 7,3 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$$

$$K_2' \text{ dis} = 0,25 \text{ M} \implies K_2f' = 4 \text{ M}^{-1}$$

14)

$$k_y - k_1 = \frac{(k_2 - k_1) [M^{2+}]}{K_2' \text{dis} + [M^{2+}]}$$

Ecuación de
Hanes y
Woolf

$$\frac{[M^{2+}]}{k_y - k_1} = \frac{K_2' \text{dis}}{(k_2 - k_1)} + \frac{[M^{2+}]}{(k_2 - k_1)}$$

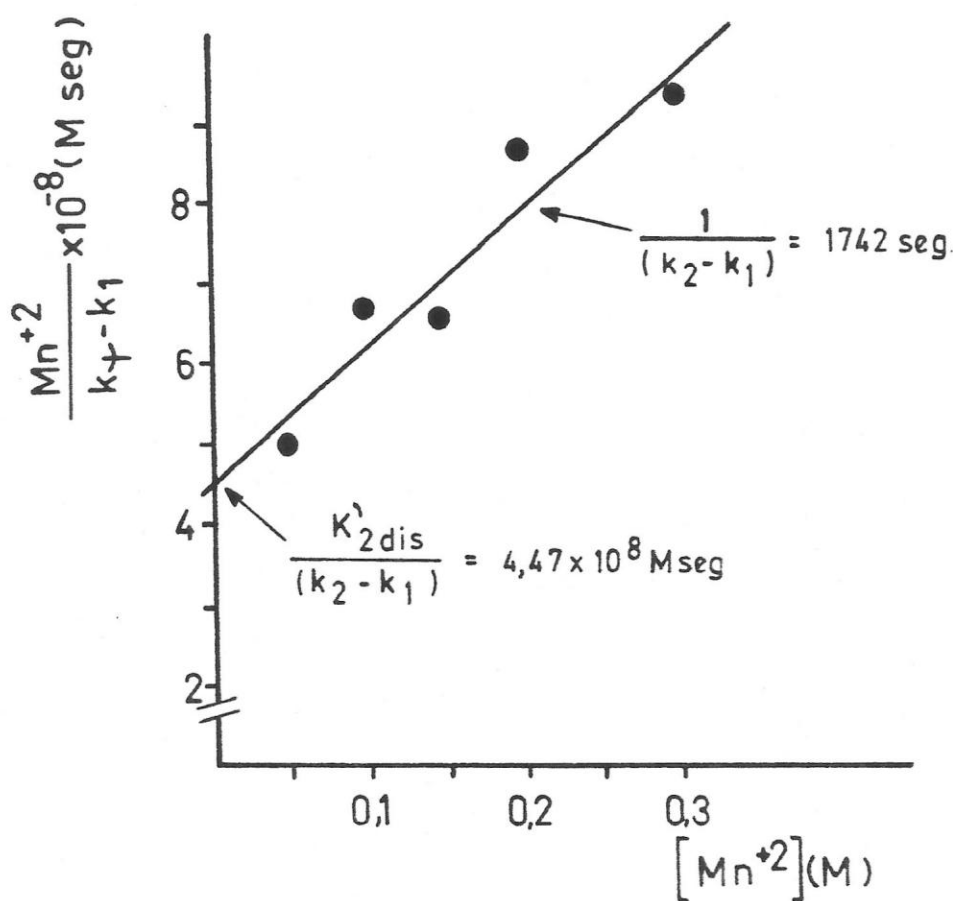


Figura 23 Gráfico de Hanes y Woolf; determinación de k_2 y $K_2' \text{dis}$ del complejo $LPPMn_2^+$.

Los datos experimentales se obtuvieron de la fig. 15.

Ecuación de
Eisenthal y
Cornish-Bowden

$$\frac{k_2 - k_1}{k_{\psi} - k_1} - \frac{K_2' \text{dis}}{[M^{2+}]} = 1$$

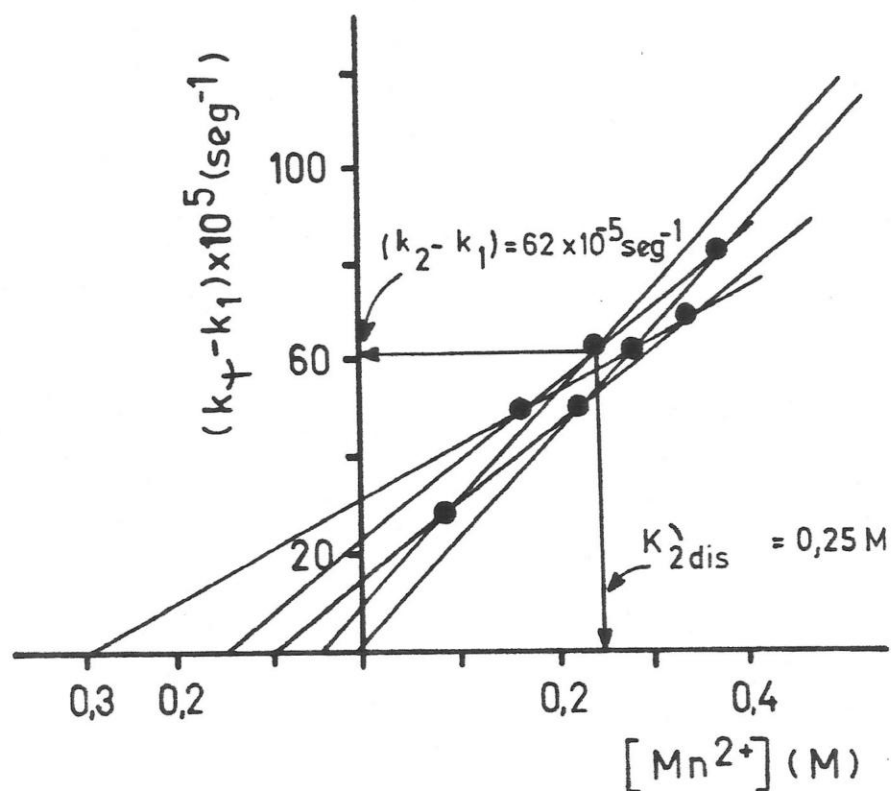


Figura 24 Gráfico de Eisenthal y Cornish-Bowden; determinación de k_2 y $K_2' \text{dis}$ del complejo LPPMn₂.

Los datos experimentales se obtuvieron de la fig. 15. La mediana de los puntos corresponde a la coordenada del punto $(k_2 - k_1)$, $K_2' \text{dis}$.

Para la determinación de $K_2'_{dis}$ LPPMg $^{2+}$ en que se aplicó la ecuación 14, los resultados de la simulación con computador se muestran en la tabla 16. La suma de los mínimos cuadrados ($2,8029 \times 10^{-6}$) se encuentra para los valores:

$$k_1 = 4,3 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$$

$$k_2 = 77 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$$

$$K_2'_{dis} = 6,0 \text{ M} \implies K_2f' = 0,167 \text{ M}^{-1}$$

De estos valores se puede ver que el valor de $K_2'_{dis}$ indica que la saturación debiera alcanzarse con concentraciones de metal cercanas a 6 M, lo que concuerda con la escasa pendiente del gráfico. Como se puede ver en la tabla, este parámetro es el que experimenta la mayor variación y dado que en otros experimentos se obtuvo el valor de $K_2'_{dis} = 5,0 \text{ M}$, y debido a la dificultad de trabajar a altas concentraciones, en definitiva se considera un rango de $K_2'_{dis}$ entre 5 y 6 M.

Por otra parte, el valor de k_1 es idéntico al encontrado por inspección directa de la curva de la fig. 15, lo que permite asegurar la validez del método de simulación.

La tabla 17 resume las constantes de velocidad para la hidrólisis de los compuestos libres y sus complejos, k_0 , k_1 y k_2 ; y la tabla 18 resume las constantes de formación aparentes a pH 7,0 K_{1f}' y K_{2f}' .

TABLA 16

Resultados de la simulación de la ecuación 14
para LPP + Mg²⁺

$k_1 \times 10^5$ (seg ⁻¹)	$k_2 \times 10^5$ (seg ⁻¹)	K_2' dis (M)	Desviación* $\times 10^6$
4,1	76	5,6	3,0713
4,2	76	5,8	2,8540
4,3	77	6,0	2,8029
4,4	76	6,2	2,9272
4,5	78	6,6	3,2085

* La desviación corresponde a la suma de los mínimos cuadrados.

TABLA 17

Constantes cinéticas de la hidrólisis de los esteres alílicos
libres y unidos a Mn^{2+} o Mg^{2+}

RPP o RP	$k_0 \times 10^5$ (seg ⁻¹)	$k_1 \times 10^5$ (seg ⁻¹)	$k_2 \times 10^5$ (seg ⁻¹)
LPP	12		
LPPMn		11	73
LPPMg		4,3	77
LP	0,63		
LPMn			
GPP ^{a)}	0,034		
GPPMn ^{a)}		0,034	1,5
GPPMg ^{b)}		0,055	0,26
NPP ^{b)}	0,1		
NPPMn ^{b)}		1,2	21
NPPMg ^{b)}		0,19	1,0

Las constantes cinéticas para LPP se obtuvieron a 30°; para LP, GPP y NPP a 40°.

a) Vial y col. (1981)

b) Chayet y col. (1984).

TABLA 18

Constantes de formación aparentes de los complejos mono
y bismetálicos, $K_{1f'}$ y $K_{2f'}$, a pH 7,0.

RPP o RP	$K_{1f'}$ (M^{-1})	$K_{2f'}$ (M^{-1})
LPPMn	19.400	4
LPPMg	7.600	0,2
LPMn	740	-
LPMg	205	-
GPPMn	18.200	667 ^{a)}
GPPMg	2.100	62,5 ^{a)}
NPPMn	42.900	1,1 ^{a)}
NPPMg	4.700	5 ^{a)}

$K_{1f'}$ determinada por titulación.

$K_{2f'}$ determinada cinéticamente.

a) Chayet y col. (1984).

En general se puede concluir que los complejos bismetálicos son los más reactivos, tanto para LPP con Mn^{2+} o Mg^{2+} como para GPP o NPP, aún cuando para LPP esta diferencia no es tan marcada como para GPP (tabla 19), y que los valores de K_{2f}' para LPP y NPP son aproximadamente 4 órdenes de magnitud menores que las constantes de formación de las especies monometálicas. La excepción la constituye GPP para el que K_{2f}' es tan sólo dos órdenes de magnitud menor que K_{1f}' .

Al analizar con modelos moleculares las estructuras de estos complejos, y considerando que la unión de Mg^{2+} o Mn^{2+} se establece con un oxígeno de cada fosfato en forma similar a la de ADP (Sigel, 1987), se observa una importante diferencia entre ellos. Para el complejo $LPPM_2$ se puede apreciar que se produce impedimento estérico entre el metal con sus H_2O de coordinación y el grupo metilo en C_3 , conformación (1) (figura 25) o bien entre el metal y los carbonos 1 y 2 o los carbonos 6 y 7 conformación es (2) y (3). De esto resulta que el número de conformaciones libres de impedimento disminuye respecto al compuesto libre. Se visualiza que factores estéricos de la misma índole estarían presentes en el complejo $NPPM_2$, aunque en este caso la interacción ocurriría entre el metal con sus H_2O de coordinación y los carbonos 6 y 7. Este hecho podría ser la causa de que $K_{2f}'NPPM_2$ y $K_{2f}'LPPM_2$ se encuentren en un rango de valor semejante y que es menor que

TABLA 19

Variación de la reactividad de la especie bismetálica con respecto a la especie libre, k_{RPPM} / k_{RPP} , y de la constante de formación de la especie bismetálica con respecto a la especie monometálica, K_{2f}' / K_{1f}' .

RPP + M ²⁺	k_{RPPM} / k_{RPP} 2	K_{2f}' / K_{1f}'
LPP Mn ²⁺	6,1	$2,1 \times 10^{-4}$
LPP Mg ²⁺	6,4	$2,6 \times 10^{-5}$
GPP Mn ²⁺	44	$3,6 \times 10^{-2}$
GPP Mg ²⁺	8	$3,0 \times 10^{-2}$
NPP Mn ²⁺	233	$2,6 \times 10^{-5}$
NPP Mg ²⁺	11	$1,1 \times 10^{-3}$

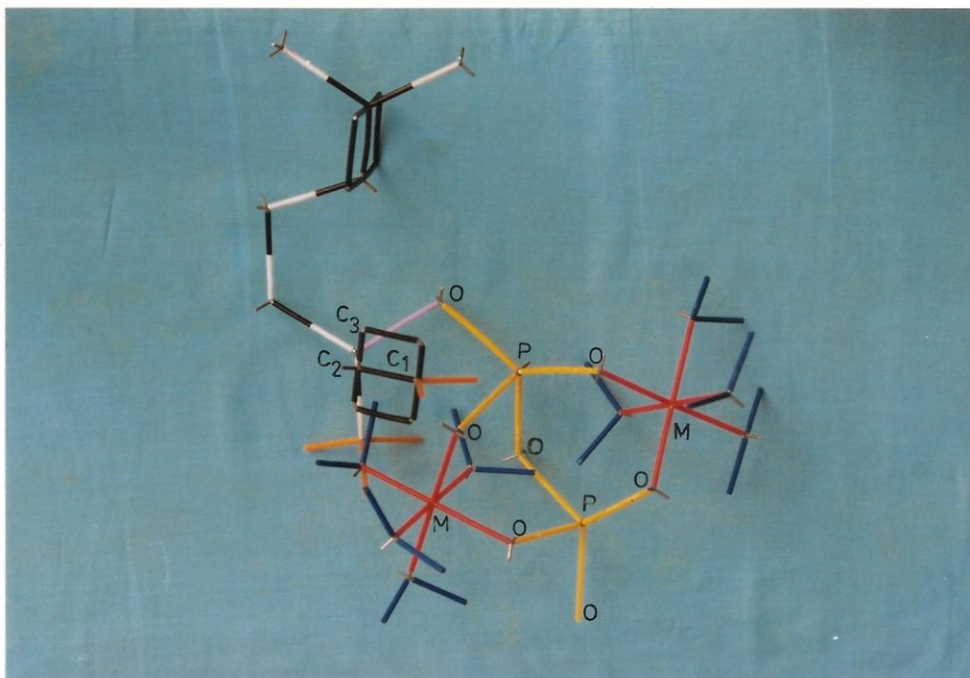
Datos obtenidos de las tablas 17 y 18.

Figura 25 Estructuras probables de los complejos bismetálicos
LPPM₂, NPPM₂ y GPPM₂.

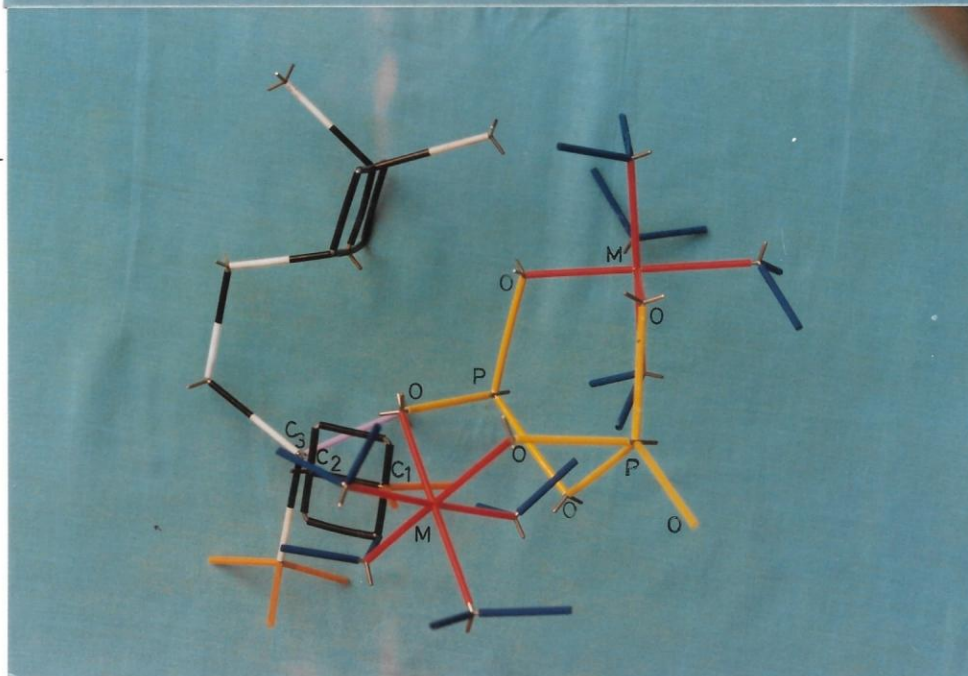
Se muestran conformaciones en que habría impedimento entre el metal y la cadena alquímica para los dos primeros compuestos.

El color azul representa los enlaces del H₂O, el rojo los del metal, el amarillo los del fósforo, el naranja los del hidrógeno, y el negro los de C-C y C=C.

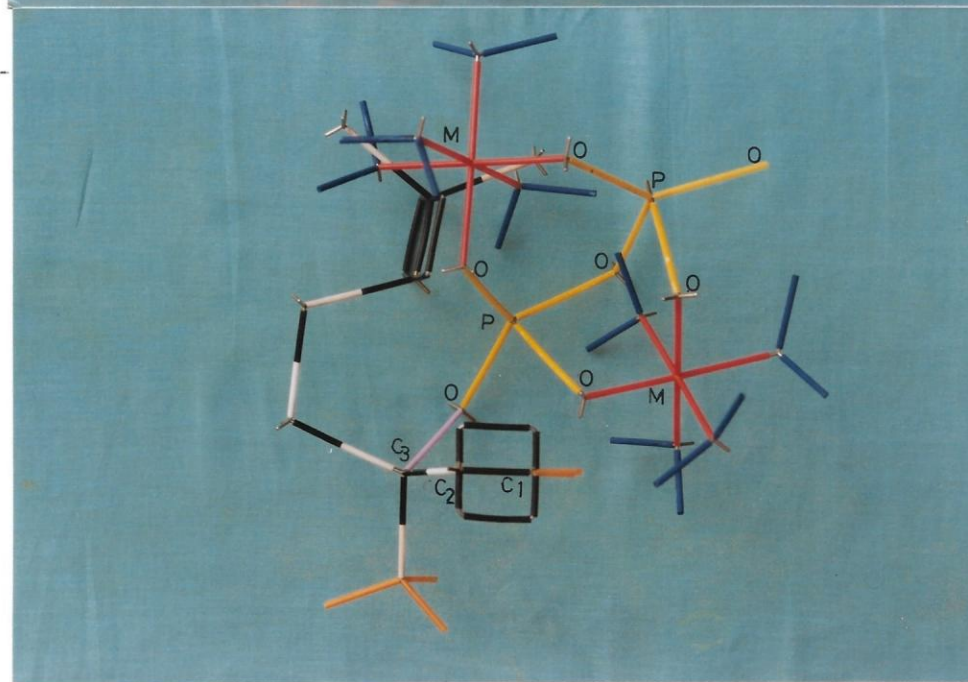
LPP
CONFORMA-
CION 1)



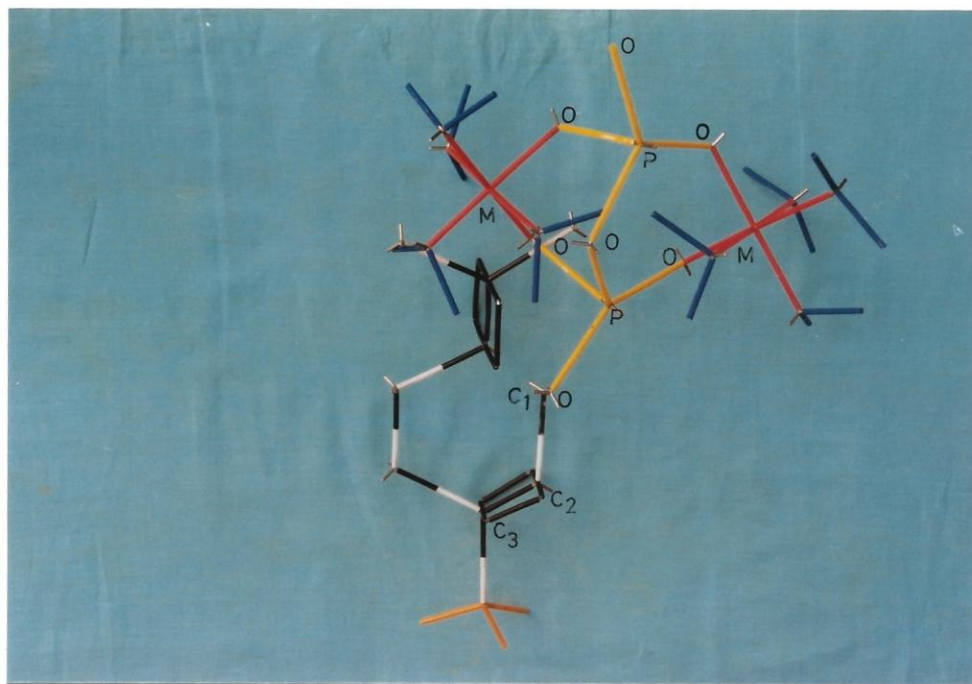
CONFORMA-
CION 2)



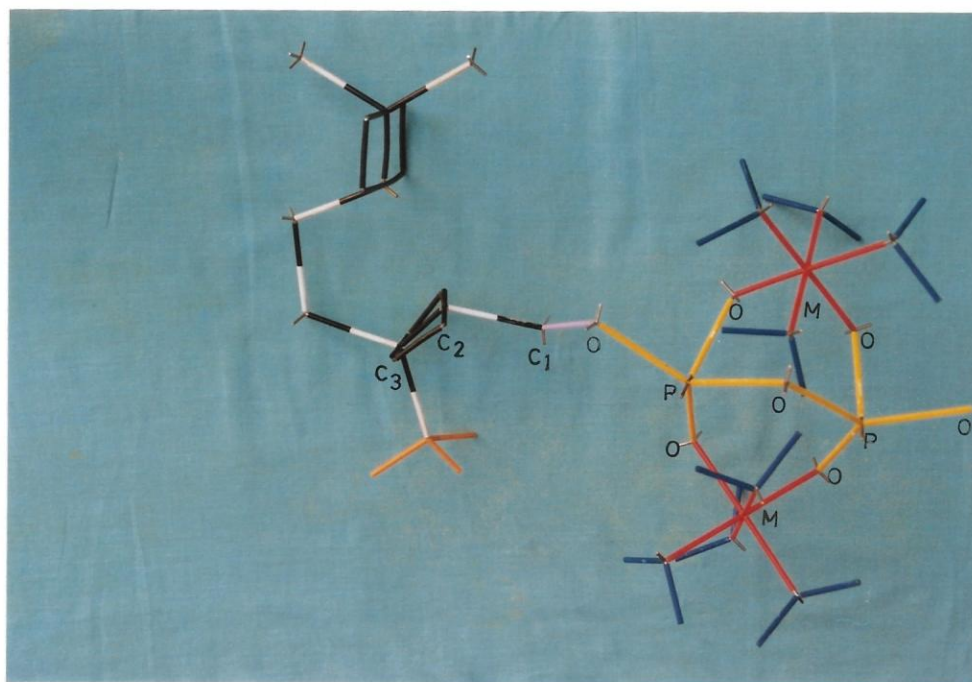
CONFORMA-
CION 3)



NPP



GPP



$K_{2f}'GPPM_2$, lo que indica que la formación de estos complejos bismetálicos resulta bastante más difícil que la de $GPPM_2$.

Para el complejo $GPPM_2$ se observa que la incorporación del metal no lleva a impedimento con la cadena alquílica; esto posibilitaría el agregado de un segundo metal. Al respecto, a modo de comparación, cabe mencionar que $K_{2f}'GPPMg_2$ es prácticamente igual que $K_{2f}'ATPMg_2 = 40 M^{-1}$ (Noat y col., 1970). (No fue posible encontrar el valor de $K_{2f}'ADPMg_2$ que sería la constante más apropiada para comparar).

En suma, los resultados descritos completan el cuadro para la hidrólisis de los ésteres alílicos fosforilados. En esta reacción la naturaleza del grupo saliente tiene importancia cinética, tanto en cuanto a si se trata de fosfato o difosfato como a si estos se encuentran como complejos metálicos.

3.1.3.6 Relación entre la velocidad de reacción y las concentraciones de los complejos mono y bismetálicos.

Utilizando los datos de constantes de formación de los complejos metálicos (tabla 18) y las ecuaciones 17 y 18 (apéndice 4), se determinaron las concentraciones de $LPPM^-$ y $LPPM_2^+$ presentes en el medio de reacción durante los experimentos de hidrólisis detallados anteriormente. En las

figuras 26 y 27 se encuentran graficadas las variaciones de las concentraciones de estas especies frente al aumento de concentración de Mn^{2+} o Mg^{2+} , respectivamente.

En ambos casos, se observa que a concentraciones de metal entre 0 y 5 mM hay un aumento de la concentración del complejo monometálico, hasta la saturación de esta especie (curvas b, figuras 26 y 27); en este rango de concentración no hay modificación de la velocidad de hidrólisis de LPP en presencia de Mn^{2+} , en tanto que se observa una disminución de la velocidad en presencia de Mg^{2+} . En ambos casos, a 3 mM metal todo el compuesto está como $LPP-M_1$ y por ende la velocidad observada sólo se debe a esta especie. El agregado de cantidades adicionales de metal lleva a la formación del complejo bismetálico, que debido a su baja K_{2f}' se halla en pequeña concentración (curvas c). Sin embargo, es cinéticamente detectable por el aumento de velocidad que se correlaciona con el aumento en la concentración de esta especie.

Del mismo modo anterior, con el valor de K_{1f}' para $LPMn$ se determinaron las concentraciones de las especies LP y $LPMn$ en el medio de reacción durante los experimentos de hidrólisis de este compuesto (figura 28). Se puede ver que en la medida que la concentración de LP libre decrece, la concentración de $LPMn$ aumenta, llegando a un valor límite. Se aprecia, también, que la concentración calculada de este complejo va

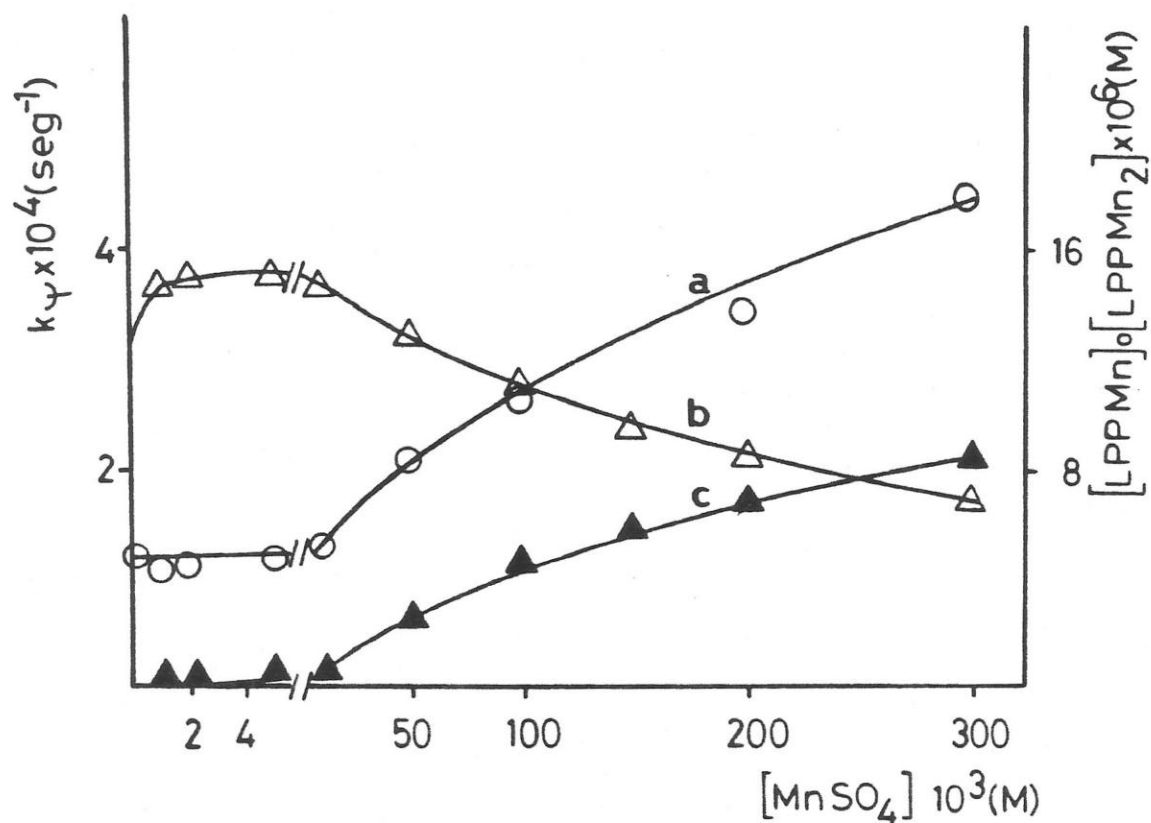


Figura 26 Relación entre la concentración de los complejos mono y bismetálicos de LPP con Mn^{2+} y la velocidad de hidrólisis.

$[LPP] = 15 \times 10^{-6}$ M; a) k_p (O - O), b) $[LPPMn]$ ($\Delta - \Delta$) y c) $[LPPMn_2]$ ($\blacktriangle - \blacktriangle$).

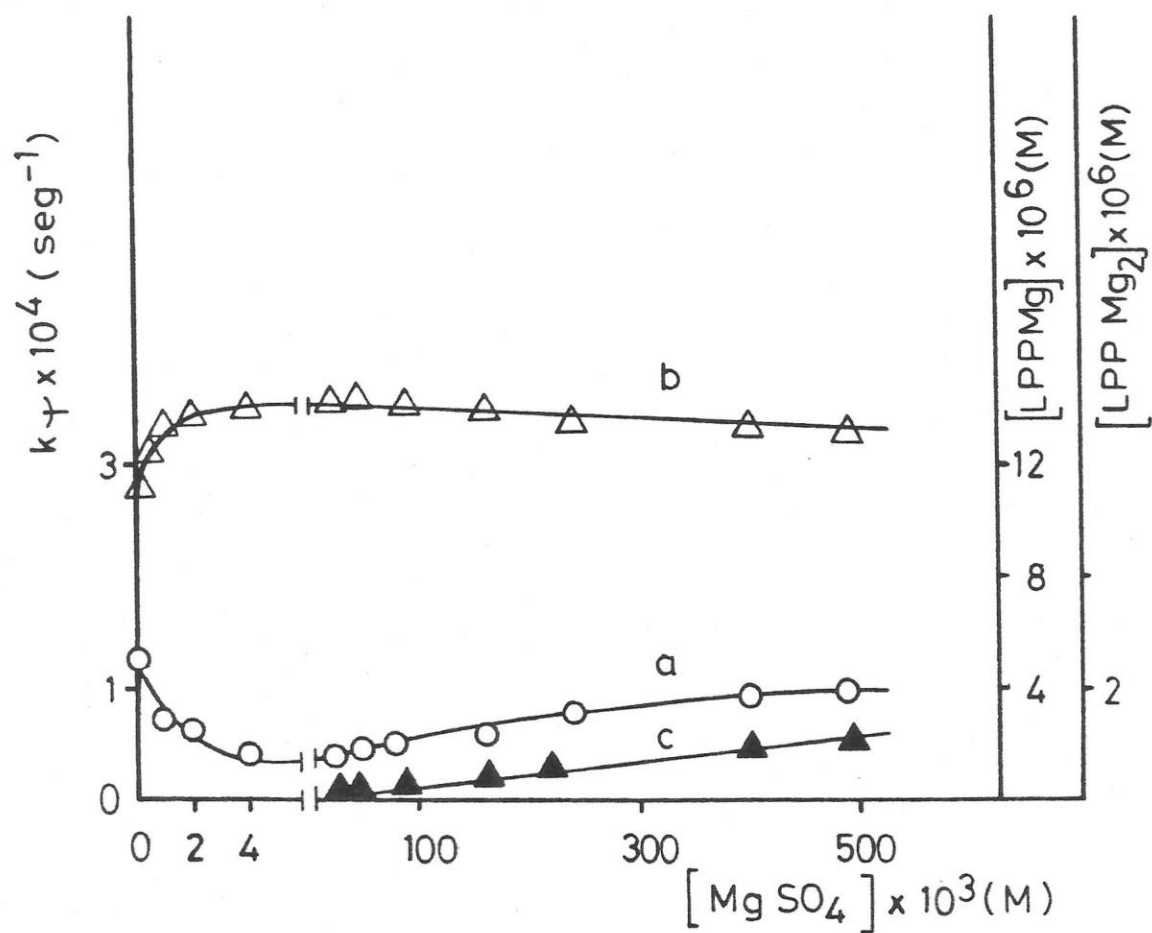


Figura 27 Relación entre la concentración de los complejos mono y bismetálicos de LPP con Mg^{2+} y la velocidad de hidrólisis.

$[LPP] = 14,4 \times 10^{-6}$; a) k_p (O - O), b) $[LPPMg]$ (Δ - Δ) y c) $[LPPMg_2]$ (\blacktriangle - \blacktriangle).

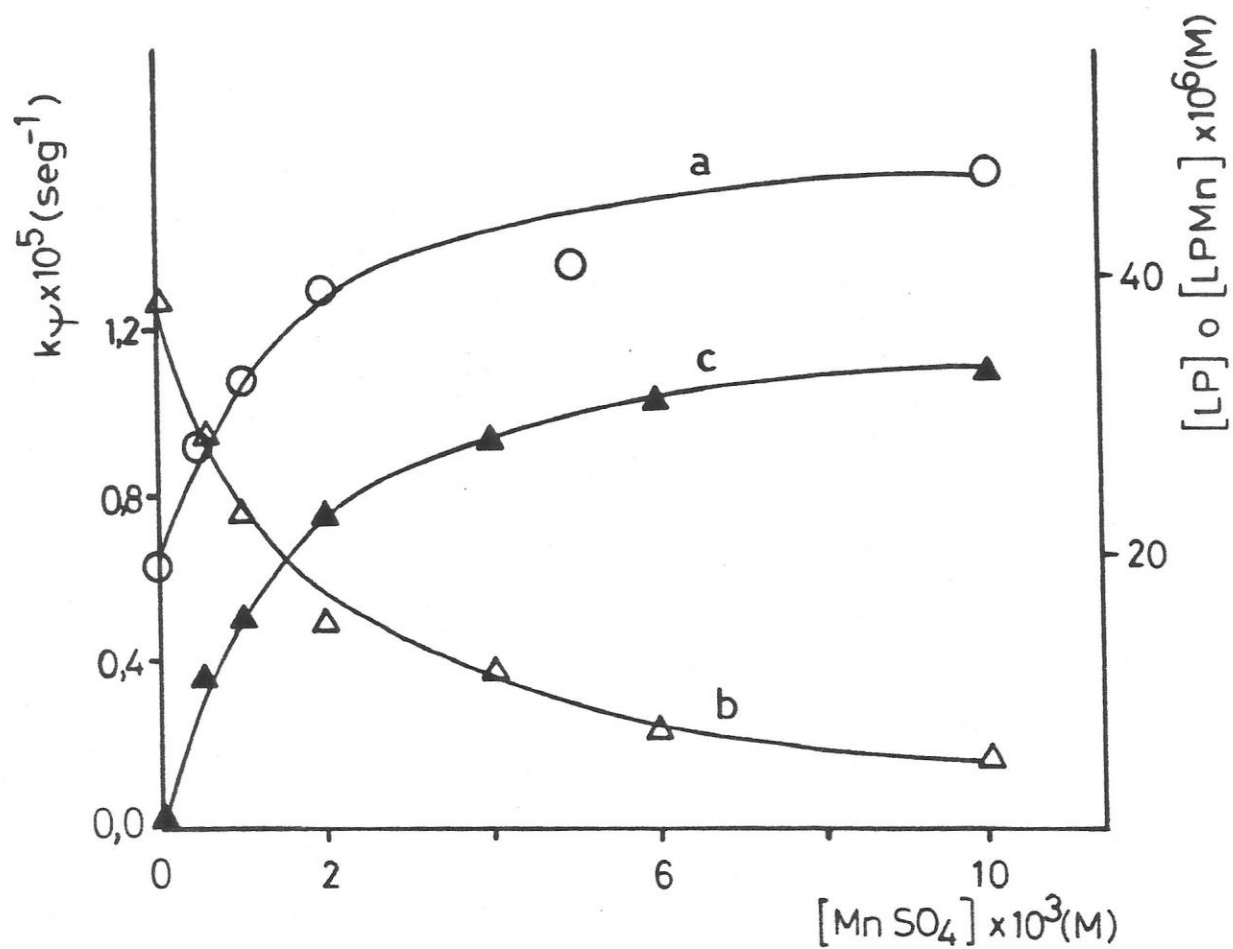


Figura 28 Efecto de la concentración de Mn^{2+} sobre la hidrólisis de LP.

Condiciones de reacción descritas en la fig. 16
 $[LP] = 38 \times 10^{-6}$ M; a) $k\psi$ (O-O), b) $[LP]$ (Δ - Δ) y c) $[LPMn]$ (\blacktriangle - \blacktriangle).

paralela al aumento de la constante de la reacción, correlación que ratifica el valor de la constante de formación K_{1f} para LPMn determinada por titulación potenciométrica.

3.1.3.7 Distribución de productos de hidrólisis a diferentes valores de pH.

La hidrólisis de LPP a pH 7,0 lleva a la formación de una mezcla de alcoholes e hidrocarburos (tabla 20) en la que los productos de sustitución exceden a los de eliminación por un factor de 4, predominando los compuestos de cadena abierta.

Al comparar esta reacción con la hidrólisis catalizada por ácido, a pH 0,4, se observa que la distribución de productos difiere marcadamente; en esta última prácticamente no se observan productos de eliminación, aún cuando en ambos casos el producto principal es LOH.

Por otra parte, frente al agregado de Mg^{2+} o Mn^{2+} se produce un aumento importante en la cantidad de productos cíclicos, ya sea se compare con la reacción a pH 7 o a pH 0,4.

Para el caso de LP, los productos son muy similares si se compara la reacción a pH 7 en ausencia o presencia de Mn^{2+} , pero, al igual que en el caso del LPP, se forma una mayor cantidad de productos de eliminación y de compuestos cíclicos que en la reacción a pH ácido.

Estos resultados están de acuerdo con un mecanismo en el que se forman pares iónicos, puesto que si la hidrólisis de

TABLA 20

Distribución de productos en la hidrólisis de LPP y LP.

	LPP			
	pH = 7,0			pH = 0,4 ^{a)}
	No cata- lizada	Mg ²⁺	Mn ²⁺	
LOH	37,1	44,9	27,8	59,7
TOH	38,0	41,2	49,0	23,0
GOH	1,9		0,6	11,3
NOH	1,8		0,4	3,3
Mirceno	11,0	13,8	5,7	0,6
Limoneno	1,6		6,2	0,34
E+Z ocimeno	8,6		10,3	1,2
% ROH	79,0	86,0	77,0	97,3
% HC	21,3	13,8	22,0	2,3
% Prod.cíclicos	39,6	41,2	55,0	23,3

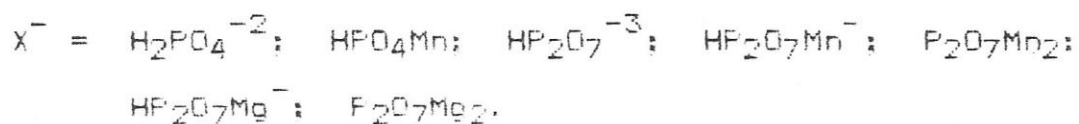
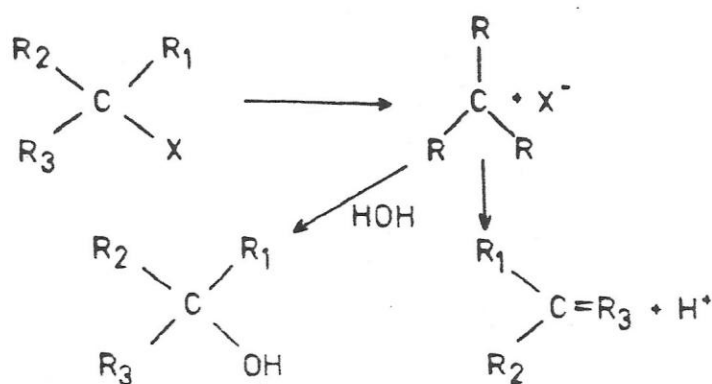
a) Dramer y Rittersdorf 1967.

CONT. TABLA 20

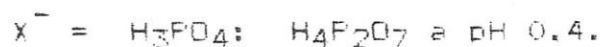
	LP		
	pH = 7,0		pH = 0,4 ^{a)}
	No cata- lizada	Mn ²⁺	
LOH	44,0	41,0	63,4
TOH	28,0	36,0	17,7
GOH	2,5	2,4	11,6
NOH	5,7	4,4	3,9
Mirceno	9,8	8,8	0,7
Limoneno	1,0		0,6
E+Z ocimenos	8,7	7,9	1,5
% ROH	80,2	83,8	96,6
% HC	19,5	16,7	3,3
% Prod.cíclicos	29,0	36,0	18,3

a) Cramer y Rittersdorf 1967.

los compuestos ocurriera a través de la formación de un intermediario catiónico único, que en este caso correspondería al catión linalilo, la naturaleza del grupo saliente, luego de formado el catión, no debiera influir en la distribución de productos, es decir, deberían ser idénticos. En la reacción de hidrólisis que se discute, en cambio, si bien la porción orgánica es la misma, el grupo saliente difiere tanto en tamaño como en carga:



Se considera la especie predominante a pH7.



La naturaleza de X^- estaría determinando el curso posterior de la reacción y, por tanto, la proporción de alcoholes e hidrocarburos a formarse. Ahora bien, a pH 0.4 por una parte no se observa prácticamente diferencia entre los productos de LPP y LP y por otra, hay un bajo contenido de compuestos cíclicos lo que permite suponer que estos productos

provendrían del catión linalilo libre.

Al respecto, cabe indicar que la participación de los pares iónicos como intermediarios de reacciones fue establecida por Winstein en la década del 50 (Lowry y Richardson, 1981); y para la hidrólisis de GPP y GP Rojas y Vial (1988) encuentran que la formación del par iónico es la etapa limitante de la reacción y postulan que el grupo saliente interactúa principalmente con el carbono desde el cual se elimina.

De este modo, los productos que aquí se han obtenido pueden explicarse al considerar que en el par iónico la presencia del grupo difosfato en el centro terciario produce un impedimento al ataque de H_2O , favoreciendo la eliminación del protón del carbono vecino a ese centro, con la consecuente formación de mirceno y E y Z ocimenos. La presencia del difosfato favorecería, además, el ataque del carbono 6 sobre el carbono 1, con formación del catión terpinilo, que posteriormente se estabilizaría por eliminación de un protón o por agregado de H_2O , explicando así la presencia de limoneno dentro de la abundante cantidad de productos cíclicos. El complejo bismetálico favorece más aún esta reacción protegiendo el carbono terciario del ataque de H_2O .

Lo anteriormente señalado resulta consecuente con el esquema planteado por Cori y col. (1986) (fig. 29), en que dos conformaciones del derivado del linalilo darían cuenta

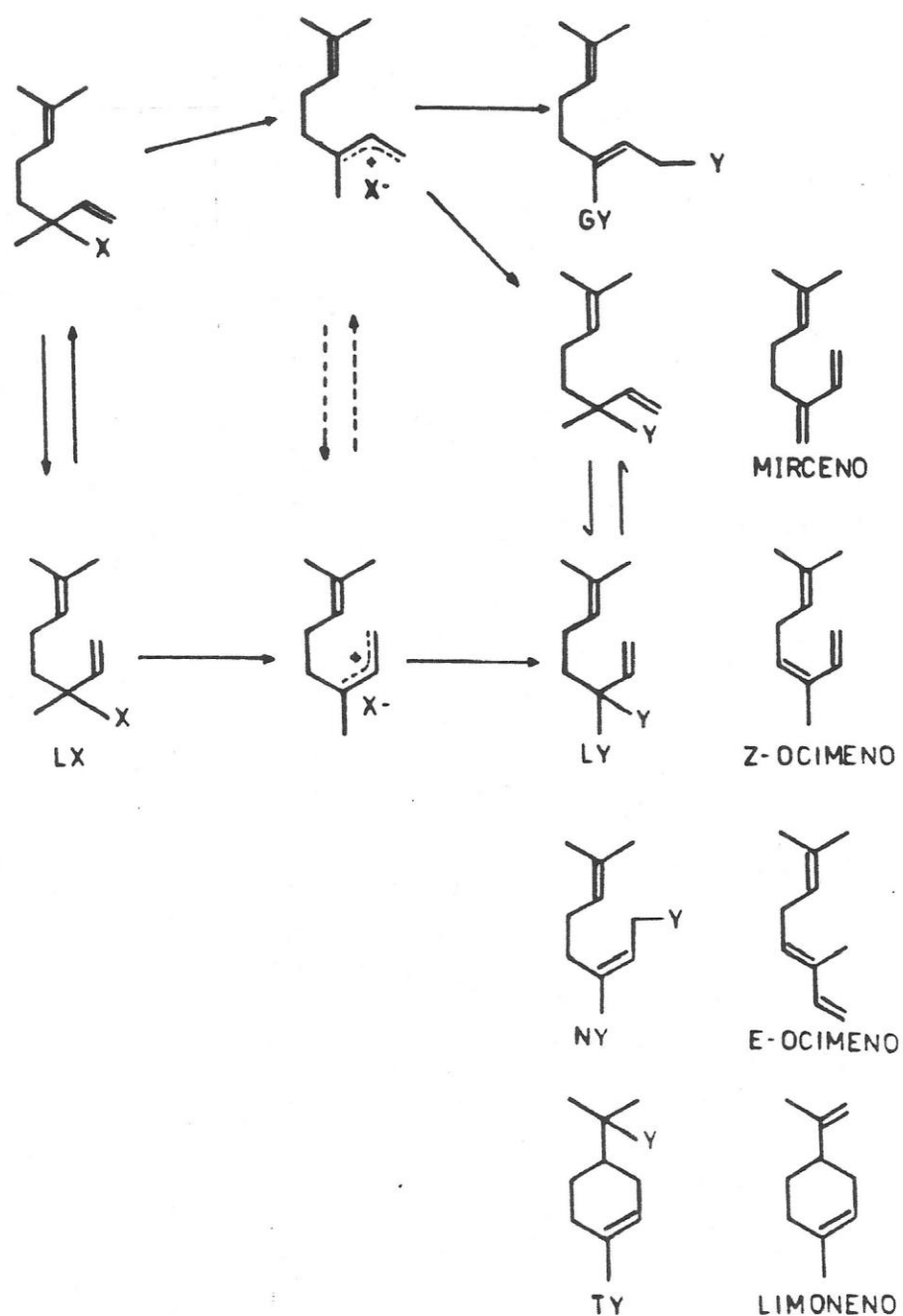


Fig. 29 Esquema que ilustra las principales reacciones de sustitución y eliminación de los derivados de linalilo.

A diferencia del esquema original obtenido de Cori, Bunton y col. (1986), en que los intermediarios son catiónicos, aquí se consideran como pares iónicos.

X = fosfato, difosfato, complejo monometálico o bismetálico. Y = OH.

de los productos observados. La conformación abierta originaría LOH, GOH, mirceno y ocimeno, y la conformación cerrada LOH, NOH, mirceno, ocimeno, TOH y limoneno.

El comportamiento de LPP a pH 9 difiere del recién discutido ya que la hidrólisis lleva en este caso a la formación exclusiva de LOH cuando se está en velocidades iniciales, lo que corresponde hasta aproximadamente 15 hrs. de calentamiento a 30° (tabla 21), ($k_{\gamma} = 5,1 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$). A medida que avanza la reacción comienzan a aparecer TOH y finalmente HC los que probablemente surgen por eliminación y reordenamiento de LOH, ya que estos compuestos son los productos predominantes bajo control termodinámico (Cramer y Rittersdorf 1967; Astin y col. 1976; Baxter y col. 1978); la formación de alcoholes e HC llega hasta 26% del LPP inicial, y hacia el final de la reacción se observan en la fase acuosa los isómeros menos reactivos GPP y NPP. La composición de esta fase acuosa se calculó a partir de la composición de los alcoholes provenientes de la hidrólisis con fosfatasa durante 15 min. Los detalles experimentales se encuentran en la sección 2.3.8.3.

Este ordenamiento se decidió estudiar en forma más acabada, y se describe en la sección 3.1.3.9.

3.1.3.8 Parámetros de activación.

La figura 30 muestra las gráficas de Arrhenius que se obtuvieron para la hidrólisis de LPP y de LPPMn + LPPMn₂.

TABLA 21

Productos de hidrólisis y reordenamiento de LPP a pH 9

Tiempo (horas)	ROH e HC (%)	RFP
15	LOH 100	LPP
21	LOH 87,5 TOH 12,5	
41	LOH 70 TOH 30	
65	HC 5 LOH 3 TOH 92	LPP 78 NPP 9 GPP 13

Los valores de energía de activación que se obtienen tienen relación inversa con las constantes cinéticas observadas, vale decir que $E_{act} (LPPMn + LPPMn_2) > E_{act} LPP$, y sin embargo es el complejo bismetálico la especie más reactiva. Esta misma tendencia en el resultado se obtiene para GPP y su complejo bismetálico (tabla 22). Si bien es preciso tener presente que el valor bajo de $K_{2f}^{\ddagger} LPP$ impide tener en el medio de reacción exclusivamente al complejo bismetálico, cuya concentración puede alterarse por efecto del cambio de temperatura, se estima que este efecto en el equilibrio $GPP + 2Mn^{2+} \rightleftharpoons GPPMn_2$ no debería alterar la concentración del complejo bismetálico en forma significativa dado el alto valor de $K_{2f}^{\ddagger} GPP$.

La discrepancia aparente entre k_{ψ} y E_{act} podría resolverse al analizar el término entrópico de la reacción, que estaría determinando en gran medida los valores relativos de la energía libre de activación de estos compuestos (tabla 22). Para LPP y GPP ΔS^{\ddagger} tiene valores inferiores al de los respectivos complejos bismetálicos.

Aún cuando no sería lícito atribuir a una sola causa los valores que adquiere este término, una explicación plausible a los resultados encontrados podría darse sobre la base de que siendo la ionización la etapa determinante de la reacción, y ya que en ésta a partir de una molécula se forman inicialmente dos iones, se debería esperar un aumento de entropía, que es

	Ea (kcal/mol)	log A (seg ⁻¹)
LPP	19.3±0.67	9.8±0.27
LPPMn + LPPMn ₂	25.0±1.77	14.6±0.07

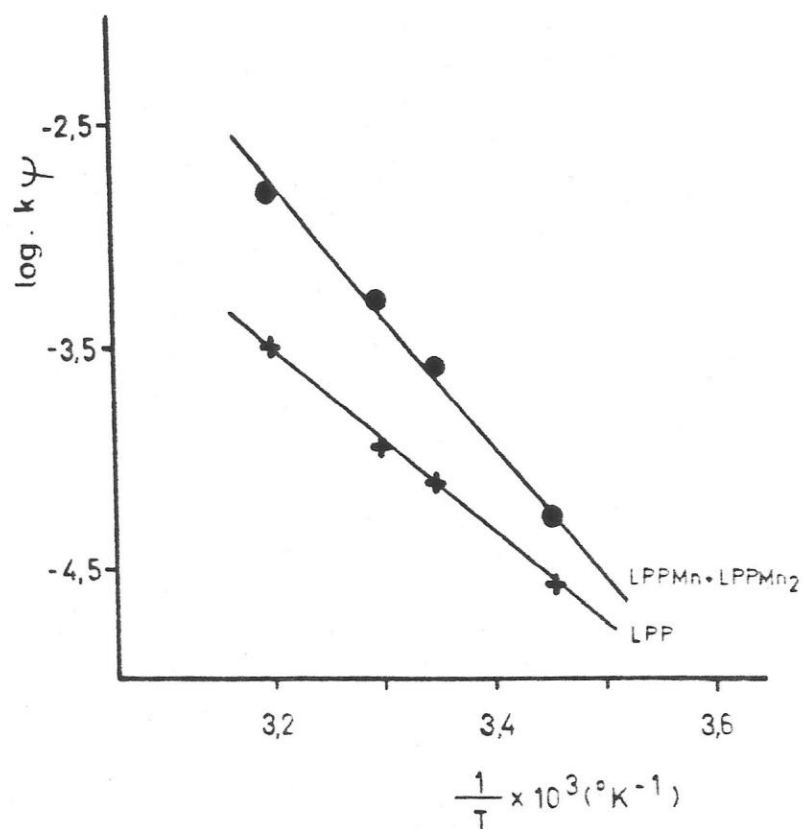


Figura 30 Gráfico de Arrhenius para la hidrólisis de LPP (+ - +) y LPPMn + LPPMn₂ (● - ●).

[LPP] = 3×10^{-6} M; amortiguador TEE-HCl 0.2 M pH 7.0; tiempo = 5 min.
 [LPPMn] = 1.1×10^{-6} M; [LPPMn₂] = 1.9 μM.

TABLA 22

Parámetros de activación para la hidrólisis de LPP, GPP
y sus complejos bismetálicos.

	ΔH^\ddagger (kcal/mol)	ΔS^\ddagger (cal/mol °K)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
LPP	18,7+0,64	-15,6+0,04	23,4
LPPMn ₂	24,4+1,73	6,2+0,03	22,6
GPP ^{a)}	24,4	-8,8	27,0
GPPMn ₂ ^{a)}	30,4	16,0	25,6

a) Parámetros obtenidos de los datos que informan Vial y col.
(1981).

lo que ocurre para el caso de los complejos bismetálicos. Los valores negativos que se obtienen con LPP y GPP podrían indicar cierta restricción al movimiento de los iones por solvatación preferencial de estos durante la formación del complejo activado.

3.1.4 Reordenamiento de LPP.

En varias ocasiones en que LPP se encontraba en una mezcla de propanol: NH_3 : H_2O = 6:3:1 se observó su reordenamiento a NPP y GPP, sin embargo, esto se logró controlar manteniéndolo a 4°. El reordenamiento detectado en H_2O a pH 9 puso nuevamente de manifiesto esta reacción que reviste especial relevancia en el contexto del estudio el comportamiento de LPP para llegar a entender la reacción de biosíntesis de hidrocarburos, ya sea a partir de GPP o de NPP. De hecho en numerosas publicaciones (Potty Bruemmer, 1970; George-Nascimento y Cori, 1971; Cane y col., 1982; Croteau y col., 1984) se presenta como el mecanismo más probable que GPP se isomerizaría a LPP y éste sería el precursor inmediato de la formación de monoterpenos cíclicos. Sin embargo, tal como lo indicara Croteau (1987), la isomerización de GPP a LPP o viceversa, era un elemento de la ciclación que debía estudiarse, ya que no se habían presentado argumentos experimentales directos que indicaran que tal isomerización ocurriera.

Por lo anteriormente mencionado, y dado que la velocidad de reordenamiento a pH 9 y 30° es baja, como se puede ver porque solamente luego de 65 h hay compuestos primarios en cantidades relativamente importantes, se decidió extremar las condiciones trabajando en NaOH 0,5 M (pH 13,7) y a 70° (fig. 31). En este experimento se emplearon ampollas que se sellaron antes de iniciar la reacción logrando así evitar la evaporación del medio y de los probables alcoholes e hidrocarburos producidos. No fue posible obtener suficiente cantidad de estos últimos por lo que se estudió solamente el reordenamiento en la fase acuosa. En las condiciones indicadas se llega hasta la formación de 40% NPP, 50% GPP y queda sin reordenar 10% de LPP. De la primera fase de la curva se obtuvo un valor aproximado de $k_{\text{reordenamiento}} = 1,1 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$. En esta fase acuosa no se encontró terpinil difosfato, TPP, aún cuando se tuvo presente que las fosfatasas no hidrolizan este derivado (Avalos, 1986). La ausencia de este compuesto podría deberse a que LPP adopta bajo las condiciones de trabajo preferencialmente una conformación abierta.

Al respecto, cabe citar el trabajo de Winstein y col. (1972) quienes estudiaron la solvólisis de linalil p-NO₂-benzoato en 70% de acetona en agua, a 75° y 100°; obtuvieron alcoholes, hidrocarburos y los compuestos reordenados geranil, neril y terpinil benzoatos, este último en baja concentración,

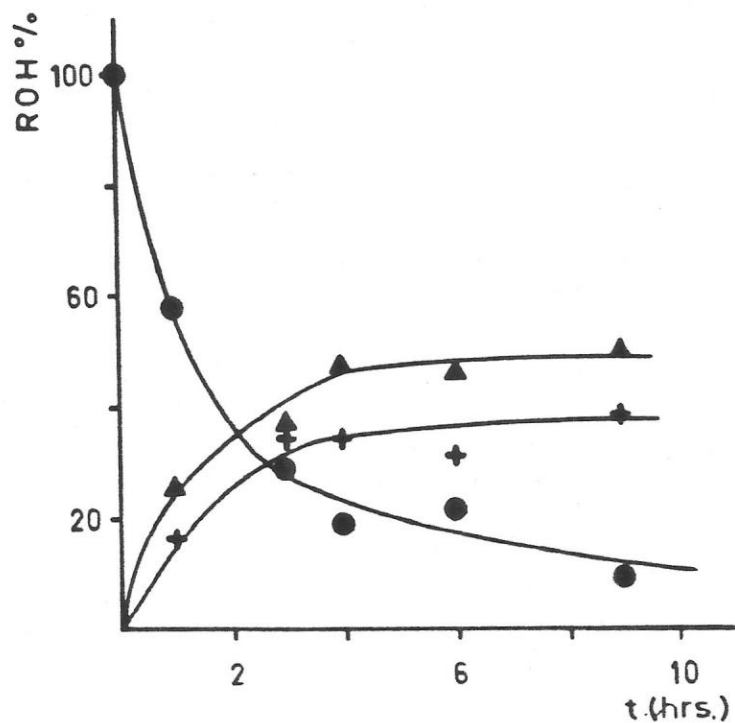


Figura 31 Reordenamiento de LPP (●-●) a NPP (+-+) y a GPP (▲-▲).

[LPP] = $7,4 \times 10^{-6}$ M. [NaOH] = 0,5 M, temp. = 70°.
Luego de detenida la reacción se hidrolizó la fase acuosa en tampón bicina pH = 9 con fosfatasas de *E. coli* y de intestino de ternero.

que disminuye al aumentar la temperatura. Los autores propusieron la formación de pares iónicos los cuales ciertamente permiten explicar todos los productos observados.

En este caso, la hidrólisis a concentración de NaOH 0,5M será muy lenta, pero hay una velocidad finita de heterólisis a un par iónico que puede reordenarse. El mecanismo que procede en este caso difiere, posiblemente, del que ocurre a pH neutro o ácido en el tiempo de ruptura y formación de enlaces y ciertamente en el retorno del grupo difosfato.

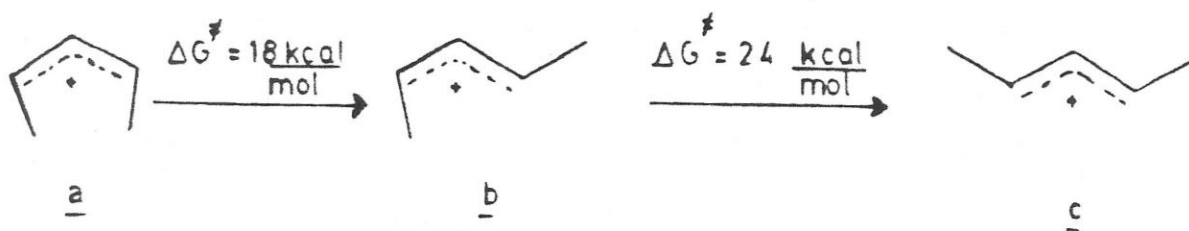
La reacción en el sentido opuesto, desde GPP y NPP para obtener LPP, no se observó, si bien, considerando el principio de reversibilidad microscópica, ésta debiera ocurrir.

3.1.5 Interconversión de carbocationes y reordenamiento de los difosfatos.

Uno de los argumentos que se esgrimió (Bunton y Cori, 1978), y que continúa empleándose (Croteau, 1987), para postular al LPP como intermediario de la biosíntesis de monoterpenos, es que la energía libre rotacional del carbocatión geranilo sería muy alta como para que éste rotara y posteriormente se ciclara. Los datos que se han tomado en cuenta son, por una parte, cálculos teóricos hechos para cationes similares a geranilo, y por otra, los resultados

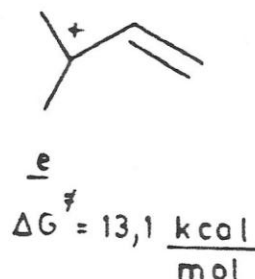
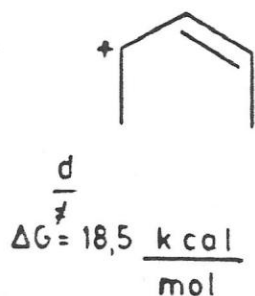
experimentales sobre la rotación de cationes obtenidos mediante NMR y los estudios de solvólisis de los derivados de geranilo y nerilo.

Algunos de los primeros valores que se obtuvieron, fueron los aportados por Bollinger y col. (1970), quienes prepararon cationes 1,3-dimetilalilo (designados aquí como a, b y c), los que adoptan una estructura coplanar de modo de permitir la sobreposición de los orbitales p del sistema π . Encontraron que las barreras a la rotación alrededor del doble enlace parcial, medidas mediante NMR, son suficientemente altas para impedir la interconversión a bajas temperaturas, pero a -10° a se isomeriza a b con vida media de 10 minutos y a $+35^\circ$ b se isomeriza a c.



Por su parte, Allinger (1975) calculó las barreras de energía rotacionales de diversos cationes, entre ellos de a y c, obteniendo valores relativamente bajos para este último, lo que se explicaría porque los grupos metilos ubicados en el mismo centro catiónico bajarían la barrera energética, ya que durante la rotación estos grupos alcanzan una orientación

ortogonal con el doble enlace y el o los grupos metilos estabilizan por hiperconjugación más que en forma deslocalizada.

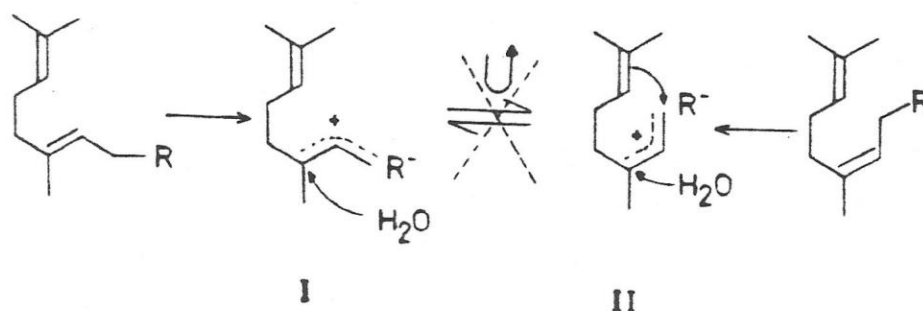


Mayr y col. (1979) reconsideraron en base a cálculos *ab initio* estas barreras de energía y obtuvieron resultados en algunos casos mayores a los previamente informados. Para el catión deslocalizado *e*, obtuvieron $\Delta G_{\text{rotacional}} = 18.2$ kcal/mol.

Aún cuando hasta la fecha no se ha calculado la altura de la barrera correspondiente a los cationes geranilo y nerilo, ni se ha evaluado el efecto de la formación de pares iónicos sobre la estabilidad conformacional de dichos cationes, es poco probable que se vaya a lograr un valor menor que 13-18 kcal/mol y, por otra parte, Mayr estimó los efectos de solvatación en aproximadamente 1-1.5 kcal, valor que habría que agregar al calculado para el catión libre; por tanto, éste sería el rango que se esperaría para el catión geranilo.

Ahora bien, los estudios de solvolisis de los derivados de nerilo dan principalmente productos cíclicos, en tanto que

los derivados de geranilo los dan acíclicos (Cramer y Rittersdorf, 1967 ; Bunton y col., 1978; Cori y col., 1986); los productos indican que la reacción involucra una deslocalización alílica muy importante y muestran también que la interconversión rotacional del carbocatión deslocalizado (I \rightleftharpoons II) es lenta con respecto al ataque sobre el centro primario o terciario. Esta conclusión se mantiene para los respectivos complejos bimetálicos de los difosfatos.



Como se ha mostrado en la tabla 22. $\Delta G_{GPP}^{\ddagger} = 27$ kcal/mol. $\Delta G_{GPPMn_2}^{\ddagger} = 25,6$ kcal/mol; y para el caso de los derivados con cloruro, la energía libre de activación de la solvólisis en $H_2O/acetona = 30/70$ es $\Delta G_{GCl}^{\ddagger} = 23,9$ kcal/mol y $\Delta G_{NCl}^{\ddagger} = 23,4$ kcal/mol (Cori y col., 1986) indicando esto que, salvada la etapa de ionización del compuesto, las estabilizaciones del catión por ataque de H_2O , para los derivados de geranilo, o por ataque del carbono β , para los derivados de nerilo, son reacciones más rápidas que la velocidad de rotación, esta última con el valor de $\Delta G_{rotacional} = 13-18$ kcal/mol.

De lo recién expuesto se deduce que en presencia de un nucleófilo como H_2O o como el doble enlace $C_6=C_7$, es poco probable llegar a obtener rotación de los cationes. Sería factible en cambio, que esta rotación ocurriera en condiciones en que el atrapamiento nucleofílico no tuviera importancia y en que la estabilización de los cationes intermediarios estuviera favorecida, por ejemplo, por la presencia del contraión.

Una de las reacciones que podría reunir estas características es la que llevaron a cabo Haley y col. (1969) con geranildifenilfosfato en eter etílico a 37° durante 7 días. Obtuvieron 33% de hidrocarburos cíclicos. Los autores postularon que estos compuestos provendrían de linalildifenilfosfato que se habría formado en el seno de reacción, y que no detectaron. Dado que el período de reacción fue muy largo, también podría haber ocurrido reordenamiento de los hidrocarburos de cadena abierta generados. A pesar de esto último, del trabajo no surgen elementos que permitan descartar la formación y rotación del catión.

La evaluación de estas dos alternativas, rotación del carbocatión y reordenamiento del derivado de geranilo a linalilo y la posterior ciclación de éste, se podría hacer comparando las energías de activación de cada proceso. Tal como se ha expresado, en la literatura y en esta tesis no se detecta el reordenamiento de geranilo a linalilo, aunque sí se

observa en el sentido inverso. Sin embargo, este reordenamiento en términos de energía libre de activación no debería constituir una ventaja con respecto a la rotación, ya que la energía de activación para la formación de compuestos cíclicos a partir de LPPMn₂ resulta superior por lo menos en 4 kcal ($\Delta G^\ddagger_{\text{ciclación LPPMn}_2} = 22,6 \text{ kcal/mol}$; $\Delta G^\ddagger_{\text{rotación G}^+} = 13-18 \text{ kcal/mol}$).

En conclusión, los datos presentados indican que la rotación del carbocatión geranilo no constituiría una etapa limitante en la reacción de formación de compuestos cíclicos a partir de GPP en un medio poco nucleofílico y no acuoso. Esta etapa estaría favorecida cinéticamente por sobre el reordenamiento de GPP a LPP y posterior ciclación de este último.

3.1.6 Hidrólisis de geranil y neril difosfato en micelas de dodecil sulfato de sodio.

Se investigó la reacción de hidrólisis de GPP y NPP en micelas de dodecil sulfato de sodio, SDS, que tienen cabezas de grupo con carga negativa. Se empleó este tipo de micelas ya que se consideró, por una parte, que no debería unir en forma efectiva compuestos aniónicos como RPP^{3-} , $RPPH^{2-}$ y $RPPM^{-}$, pero podría unir especies neutras como RPPHM o el complejo bismetálico $RPPM_2$ y por otra parte, este detergente aniónico podría estabilizar el par iónico intermediario $G^+(PPM_2)$, alargando su vida media, permitiendo con ello la rotación del carbocatión alílico y favoreciendo, de este modo, la formación de hidrocarburos cíclicos por sobre la formación de alcoholes. Podría, así, este sistema constituir un buen modelo de la reacción catalizada por la ciclasa.

El estudio se centró en la determinación cinética de la selectividad en la unión de los diversos compuestos y en el análisis de la naturaleza de los productos.

Si bien la concentración micelar crítica, cmc, en H_2O es 8×10^{-3} M (Bunton, 1979), dado que se requieren concentraciones relativamente altas de M^{2+} para formar los complejos $RPPM_2$, se determinó la cmc a concentración de $Mn^{2+} = 25 \times 10^{-3}$ M. Se empleó para ésto el método clásico del cambio de tensión superficial en función de concentraciones crecientes de

detergente (Bunton, 1979) y se obtuvo el valor de 5×10^{-4} M, valor que es consistente con el hecho de que los contraiones inducen la micelación de los detergentes iónicos, reduciendo las repulsiones entre las cabezas de los monómeros (Gunnarson y col., 1980).

En la figura 32, se muestra la dependencia de las constantes de reacción de hidrólisis de GPP en función de las concentraciones de Mn^{2+} y de Mg^{2+} , tanto en H_2O como en SDS 3×10^{-2} M. Se puede ver que en ausencia de M^{2+} la constante de reacción es la misma ya sea en H_2O o en SDS, pero a medida que la concentración de M^{2+} aumenta, esta constante aumenta, llegando a un valor de saturación en la micela a concentración de M^{2+} menor que en H_2O .

El comportamiento de NPP en ausencia de metal es igual que el de GPP (figura 33), lo cual es consistente con el hecho de que la micela repele coiones y por tanto quedarían RPP^{3-} y $RPPM^{2-}$ en la fase acuosa; sin embargo, a diferencia de GPP, a medida que la concentración de M^{2+} aumenta, la constante de reacción aumenta, llegando solamente a un valor límite en presencia de SDS.

Si se utilizan los valores de constantes de formación de los complejos metálicos de NPP y GPP (tabla 18), se puede calcular que en H_2O a una concentración de M^{2+} de 0,25M se encuentra 28% y 50% de las especies $NPPMn_2$ y $NPPMg_2$ y en ambos casos la constante de reacción continúa aumentando en

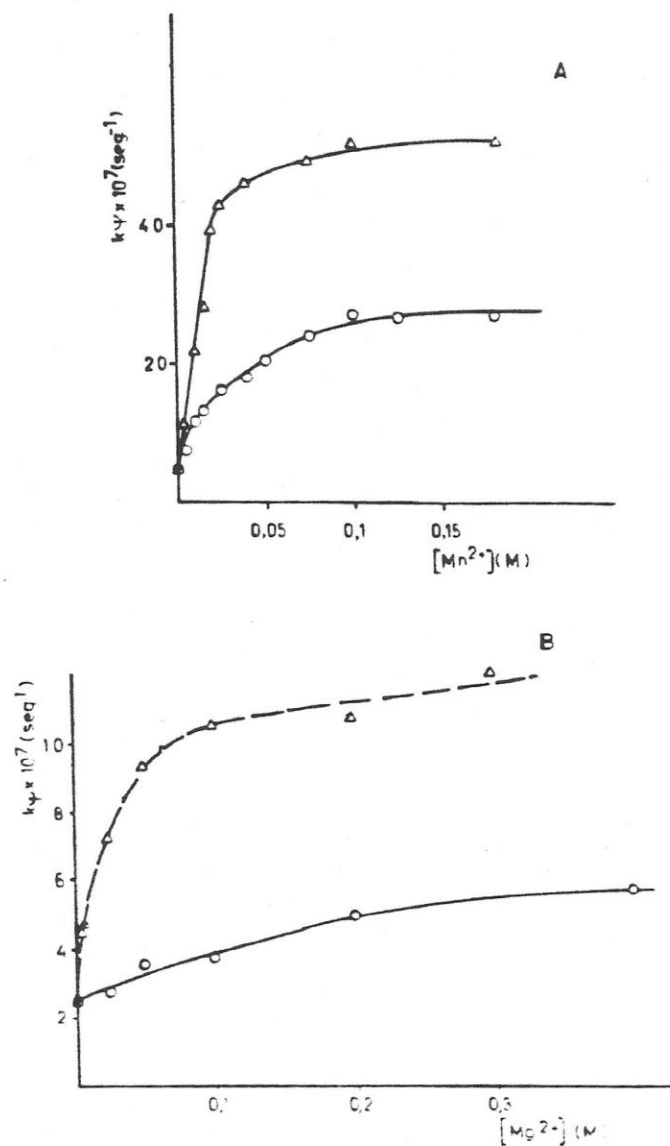


Figura 32 Hidrólisis de GFP en función de la concentración de Mn^{2+} y de Mg^{2+} en H_2O (O-O) y en SDS 30×10^{-3} M (Δ-Δ).

Fig. A= $[GPF] = 6 \times 10^{-6}$ M, $[TES-HCl] = 3 \times 10^{-3}$ M pH= 6,7,
 $[Mn^{2+}] =$ variable.

Fig. B= $[GPF] = 6 \times 10^{-6}$ M, $[TES-HCl] = 3 \times 10^{-3}$ M pH=7,
 $[Mg^{2+}] =$ variable.

Experimentos realizados a 25°.

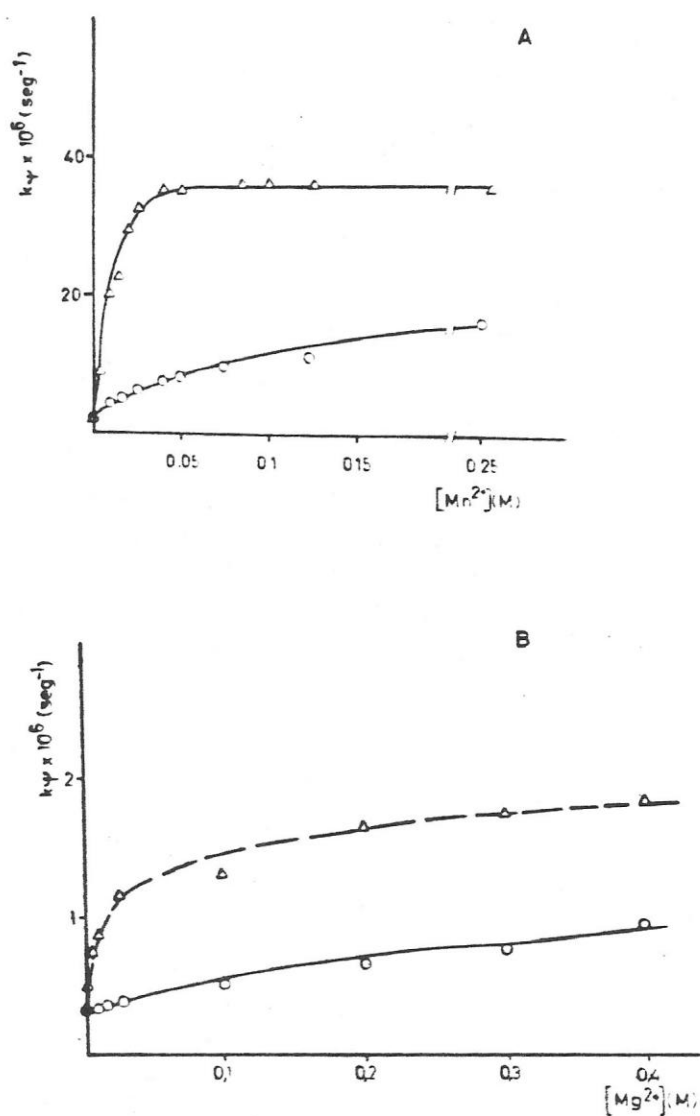


Figura 33 Hidrólisis de NPP en función de la concentración de Mn^{2+} y de Mg^{2+} en H_2O (O-O) y en SDS 30×10^{-3} M (Δ - Δ).

Fig. A = $[NPE] = 2,6 \times 10^{-6}$ M, $[TES-HCl] = 3 \times 10^{-3}$ M; pH= 6,7,
 $[Mn^{2+}] =$ variable.

Fig. B = $[NPE] = 4,8 \times 10^{-6}$, $[TES-HCl] = 3 \times 10^{-3}$ M; pH= 7,
 $[Mg^{2+}] =$ variable.

Experimentos realizados a 25°.

función del aumento de concentración de estos complejos. En cambio, todo el GPP se encuentra en la forma de $GPPM_2$ y ya no se observa un incremento de velocidad. En SDS, en cambio, la constante de reacción de NPP y de GPP llega a un valor límite que se lograría cuando todo el sustrato se encuentra como el complejo bismetálico; esto estaría favorecido por la atracción, por parte de las cabezas de grupo del detergente, de los contraiones M^{2+} y $(NPPM_2)^+$, estos últimos siendo retirados del H_2O y concentrados en la superficie micelar. De los resultados de estos experimentos también se puede deducir un efecto cinético de la micela, adicional al recién analizado, que queda en evidencia especialmente con GPP. En condiciones de saturación, la reactividad del complejo $GPPM_2$ en la micela es 2 veces mayor que en H_2O . Como se verá más adelante, se trata de un efecto en la velocidad de formación de productos, donde la micela probablemente favorece y estabiliza el par iónico intermediario y no en la distribución de productos.

Un efecto interesante de mencionar es el que los valores que adquiere k_y dependen por una parte de las concentraciones relativas de especies mono y bismetálicas, las que dependen a su vez del tipo y concentración de M^{2+} usado, y por otra, de la concentración de SDS. Si bien en la figura 34 se observa un comportamiento micelar ya descrito (Bunton 1979), se encontró que éste no responde a ecuaciones simples de catálisis

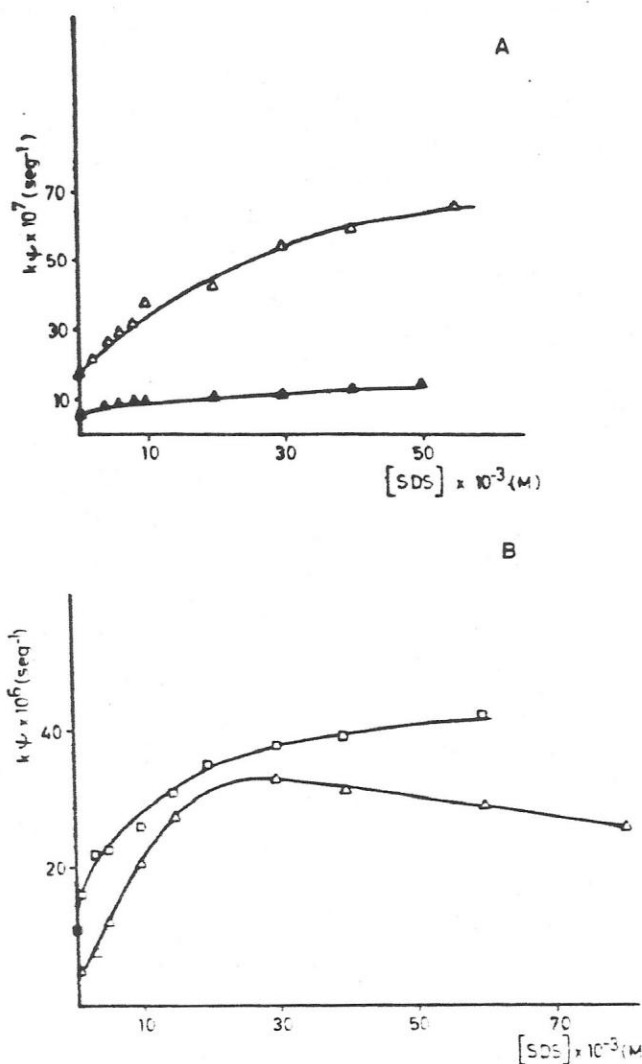


Figura 34 Hidrólisis de GPPMn₂, de GPPMg₂ y de NPPMn₂ en función de la concentración de SDS.

Fig. A = $[GPP] = 5,9 \times 10^{-6}$ M, $[TES-HCl] = 3 \times 10^{-3}$ M pH= 6,7 en presencia de Mn²⁺ 0,1 M ($\Delta-\Delta$), y pH= 7 en presencia de Mg²⁺ 0,2 M ($\blacktriangle-\blacktriangle$)

Fig. B = $[NPP] = 2,6 \times 10^{-6}$ M, $[TES-HCl] = 3 \times 10^{-3}$ M pH= 6.7 en presencia de Mn²⁺ 0,25M ($\square-\square$) y 0,025M ($\Delta-\Delta$).

micelar, lo que podría deberse a que el empleo de altas concentraciones de M^{2+} produciría un efecto electrostático importante en la micela, que podría alterar su forma y su estructura.

Las tablas 23 y 24 muestran la distribución de productos obtenidos con GPP y NPP en presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} . Para GPP, los productos son los mismos en presencia y ausencia de SDS. Sin embargo, para NPP se observa un aumento en los hidrocarburos cíclicos limoneno y terpinoleno. Esto último podría deberse a que en H_2O sólo 20% del sustrato está como complejo bismetálico y el resto como complejo monometálico; así, los productos provienen fundamentalmente de esta última especie, y no difieren en forma significativa de los que se obtienen a pH ácido o neutro. En presencia de SDS, en tanto, los productos provendrían del complejo bismetálico, el que favorece la formación de hidrocarburos. Tal como ya se ha indicado, en el complejo bismetálico los dos metales están, por una parte disminuyendo la carga negativa del grupo saliente difosfato, pero al mismo tiempo este grupo estaría protegiendo al catión del ataque del H_2O y asistiendo a la eliminación (Portilla, 1988).

La fase acuosa residual obtenida luego de la extracción de los alcoholes e hidrocarburos fue hidrolizada con fosfatasas (sección 2.3.8.3), mostrando que los alcoholes obtenidos provienen de los difosfatos orgánicos no

reordenados.

En síntesis, en el sistema micelar estudiado se encontró un efecto de concentración del complejo bismetálico que implica su unión específica a la superficie micelar, lo que puede ser analogado a la capacidad de unión de este complejo por parte de la enzima; además, se ha logrado obtener un aumento en la velocidad de reacción de $RPPM_2$ respecto a la reacción en H_2O que sugiere que, dependiendo de las características del medio de reacción, se podría lograr efectos cinéticos relevantes que ayudaran a explicar el comportamiento de estos compuestos en el sitio activo de las ciclasas.

TABLA 23

Productos de hidrólisis de los complejos con Mn^{2+}
de geranil y neril difosfato^{a)}.

	GPP - Mn^{2+}		NPP - Mn^{2+}	
	H ₂ O	SDS	H ₂ O	SDS
ROH	96	95,2	94,6	75
HC	4	4,5	6,3	23,3
LOH	72,5	70	16,5	14,3
TOH	3,4	3,2	65,8	62
NCH	-	-	10,3	-
GOH	20	22	2	-
Mirceno	1,8	2,1	-	-
Úcimenos	1,1	0,7	-	-
Limoneno	0,8	1,0	4,2	17,7
Terpinoleno	0,2	0,7	2,1	5,6

- a) [TES-HCl] = 3×10^{-3} M pH 6,7
 [SDS] = 30×10^{-6} M
 [GPP] = 11×10^{-6} M y [Mn^{2+}] = 40×10^{-3} M
 [NPP] = 14×10^{-6} M y [Mn^{2+}] = 25×10^{-1} M

Portilla. (1988).

TABLA 24

Productos de hidrólisis de los complejos con Mg^{2+}
de geranil y neril difosfato^{a)}.

	GPP - Mg^{2+}		NPP - Mg^{2+}	
	H ₂ O	SDS	H ₂ O	SDS
ROH	97	95	93	85
HC	3	5	7	15
LOH	66	75,6	10,4	11
TOH	9	3,5	82,6	74
NOH	-	-	-	-
GOH	18	15,6	-	-
Mirceno	1,9	3	-	-
Ocimenos	1,1	2	-	-
Limoneno	-	-	5	10
Terpinoleno	-	-	2	5

a) [TES-HCl] = 3×10^{-3} M pH 7
 [SDS] = 30×10^{-6} M
 [GPP] = 11×10^{-6} M y $[Mg^{2+}] = 40 \times 10^{-6}$ M
 [NPP] = 14×10^{-6} M y $[Mg^{2+}] = 40 \times 10^{-6}$ M

3.2 BIOSINTESIS DE HIDROCARBUROS MONOTERPENICOS

3.2.1. Utilización de LPP por el sistema enzimático proveniente de C. limonum.

El sistema enzimático obtenido de un extracto parcialmente purificado de C. limonum cataliza la formación de α -pineno, β -pineno, γ -terpineno y limoneno a partir de $[1-^3\text{H}]$ LPP. La mezcla de hidrocarburos es cualitativamente la misma que la que se obtiene con los sustratos GPP o NPP (Figura 35, tabla 25).

Resultados similares se han obtenido con sistemas enzimáticos provenientes de Mentha spicata, en que se forma α -TDH y carvona (Suga 1980), de Salvia officinalis, en que se forma canfeno, limoneno α y β -pineno (Gambliel y Croteau 1982 y 1984), de Artemisia annua, con formación de isotuyona, 1,8-cineol y α -pineno (Banthorpe y col. 1983) y de Salvia officinalis y Tanacetum vulgare, que dan origen a bornildifosfato (Croteau y col. 1985).

Dado que junto con el estudio de biosíntesis de hidrocarburos se estudió la reactividad de LPP en presencia de Mn^{2+} y de Mg^{2+} (sección 3.1), se pudo observar que bajo determinadas condiciones experimentales se presenta una seria dificultad en la interpretación de los datos si la reactividad de este compuesto no se considera en forma apropiada: la figura 36 muestra la relación entre la concentración de LPP y

la velocidad de formación de hidrocarburos en la reacción catalizada por la ciclasa, y en su ausencia. Se puede ver que a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad de reacción enzimática aumenta hasta llegar a un valor típico de saturación, en tanto que la velocidad de reacción no enzimática continúa aumentando. Esto lleva a que la composición de los hidrocarburos que provienen de la reacción enzimática varíe en forma aparente, dependiendo de la importancia relativa que adquiera la hidrólisis no enzimática de LPP; así por ejemplo, a concentración de LPP = $0,5 \times 10^{-6} M$ (figura 37A) se obtienen α y β pineno, limoneno y γ -terpineno, en tanto que a concentración de $32 \times 10^{-6} M$ (figura 37B), además se encuentran los hidrocarburos acíclicos mirceno y ocimenos provenientes de la reacción no enzimática. Resalta, además, en este experimento, el hecho de que limoneno es el único hidrocarburo común que se forma en ambas reacciones (figura 37A y C).

La importancia que reviste la contribución de la hidrólisis de LPP y el peso que puede llegar a tomar en los experimentos biosintéticos puede aún ser mayor que la que aquí se ha ilustrado si la reacción se prolonga más allá de 10 minutos o si la actividad enzimática es muy baja. Así debe de haber ocurrido con un extracto enzimático de S. officinalis (Gambliel y Croteau 1982 y 1984) en que se detectó la formación de mirceno y ocimenos, y en que los autores

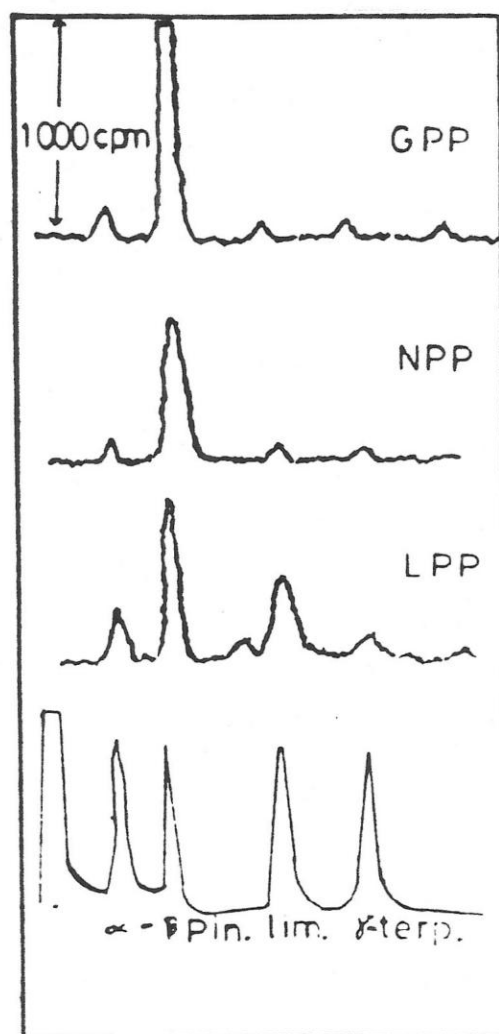


Figura 35 Formación de hidrocarburos a partir de $[1-^3\text{H}]$ GPP, $[1-^3\text{H}]$ NPP y $[1-^3\text{H}]$ LPP empleando ciclasa de C. limonum.

El trazado inferior corresponde a los picos de los estándares detectados por GLC. Los trazados superiores (A), (B) y (C) corresponden a HC radiactivos detectados por el contador Geiger para fase gaseosa. Las condiciones experimentales se describen en la sección 2.7.

Radiactividad específica: $[1-^3\text{H}]$ GPP = $2,9 \times 10^4$ dpm/nmol; $[1-^3\text{H}]$ NPP = $5,9 \times 10^4$ dpm/nmol; $[1-^3\text{H}]$ LPP = $6,75 \times 10^4$ dpm/nmol.

TABLA 25

Distribución de hidrocarburos formados por ciclasas de
C. limonum con sustratos diferentes a)

Producto	8,4 μ M LPP 1 mM Mn^{2+}	15,4 μ M GPF 3 mM Mn^{2+}	6 μ M NPF 3 mM Mn^{2+}
α -pineno	250 (14)	62 (7)	13 (8)
β -pineno	810 (44)	805 (86)	130 (79)
mirreno ^{b)}	100 (5)	0	0
limoneno	450 (25)	31 (3)	14 (9)
δ -terpineno	160 (9)	33 (3)	7 (4)
ocimeno ^{b)}	64 (3)	9 (1)	0
Actividad esp. total	1834	940	164

a) Fortilla y col., 1982.

Las concentraciones de sustratos y Mn^{2+} se ajustaron para obtener velocidades iniciales máximas de reacción.

Los valores entre paréntesis representan porcentajes de HC respecto al total recuperado. La actividad específica está expresada en $nM \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$.

b) HC provenientes de hidrólisis no enzimática.

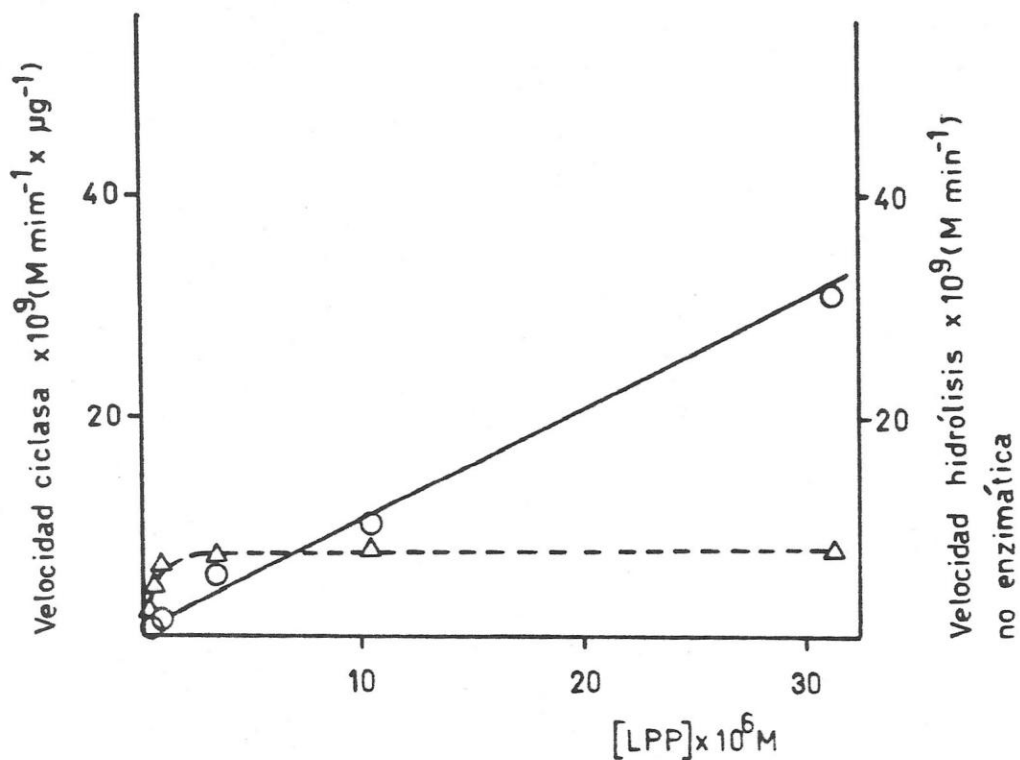


Figura 36 Efecto de la concentración de LPP sobre la velocidad de reacción catalizada por la ciclasa (Δ - Δ) y sobre la velocidad de hidrólisis de LPP (O-O).

El extracto enzimático purificado por cromatografía en DEAE-Sephadex se incubó a 30° durante 3,5 min en amortiguador TES-HCl 50 mM, pH 7, con Mn^{2+} 0,9 mM y concentraciones variables de [$1-^3H$] LPP.

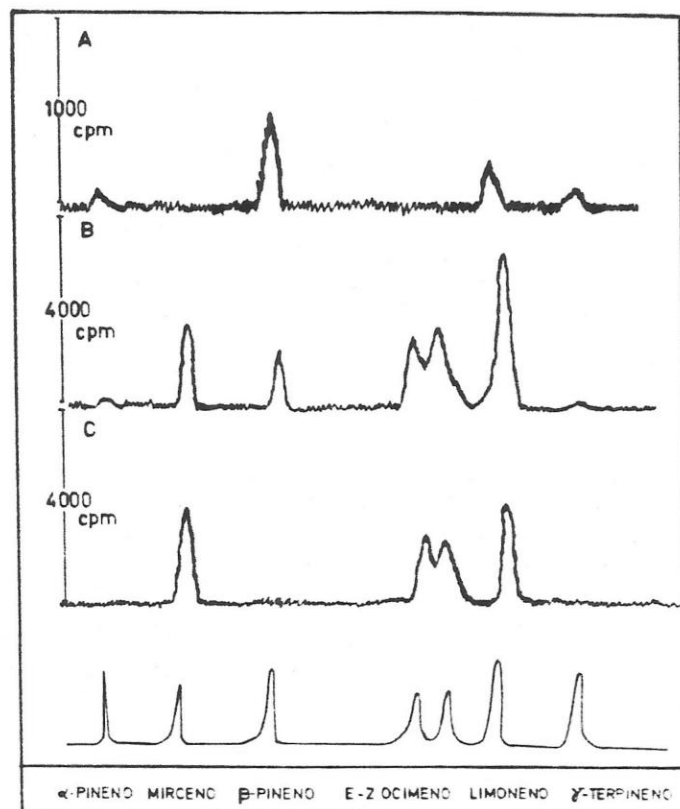


Figura 37 Formación de HC a partir de $[1-^3\text{H}]$ LPP empleando ciclasa de *C. limonum* y por hidrólisis no enzimática.

Los trazados superiores indican la respuesta a la radiactividad detectada por el contador Geiger para fase gaseosa, mientras que el trazado inferior indica la respuesta a estándares coinyectados, detectados por GLC.

(A) Reacción de ciclasa a $[\text{LPP}] = 0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$

(B) Reacción de ciclasa a $[\text{LPP}] = 30 \times 10^{-8} \text{ M}$

(C) Hidrólisis no enzimática a $[\text{LPP}] = 30 \times 10^{-6} \text{ M}$

Radiactividad específica $[1-^3\text{H}]$ LPP = $6,75 \times 10^4$ dpm/nmol

atribuyen su presencia a productos de biosíntesis anormales puesto que no se forman al utilizar GPP o NPP.

3.2.2. Parámetros cinéticos

Para obtener información sobre la especificidad y eficiencia del sistema enzimático se compararon las constantes cinéticas K_m y V_{max} con los tres sustratos. LPP resultó ser mejor sustrato que NPP o GPP (tabla 26) aunque la actividad relativa varió de una a otra preparación enzimática. Se utilizaron concentraciones mayores que $13 K_m$ sin obtener un efecto inhibitor, comprobando que el sistema sigue un comportamiento michaeliano.

Como se ha mostrado anteriormente (sección 3.1.3.) por una parte Mn^{2+} o Mg^{2+} se unen a los difosfatos alílicos LPP, NPP y GPP, formando un complejo bismetálico que es más reactivo que el difosfato libre, y por otra parte, nuestro grupo demostró que el verdadero sustrato de la GPP ciclasa es este complejo bismetálico (Rojas y col. 1983); por esto se comparó la velocidad de reacción con la concentración de $LPPM$ y $LPPM_2$ calculadas, utilizando K_{1f}' y K_{2f}' , a diferentes concentraciones de LPP y M^{2+} . Puede verse en las figs. 38 y 39 que la velocidad de reacción aumenta junto con la concentración del complejo bismetálico; se ve también que la velocidad sigue aumentando aún en aquellas zonas de la curva en las cuales la concentración del complejo monometálico ha

TABLA 26

Parámetros cinéticos de las ciclasas^a

Sustrato (μM)	[Mn^{2+}] (mM)	K_m (μM)	V ($\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
LPP (0,25-44,0)	1	0,4	1,10	2,75
NPP (0,25-30)	3	1,0	0,1	0,1
GPP (0,9-8,0)	3	2,9	0,72	0,25

a) Portilla y col., 1982

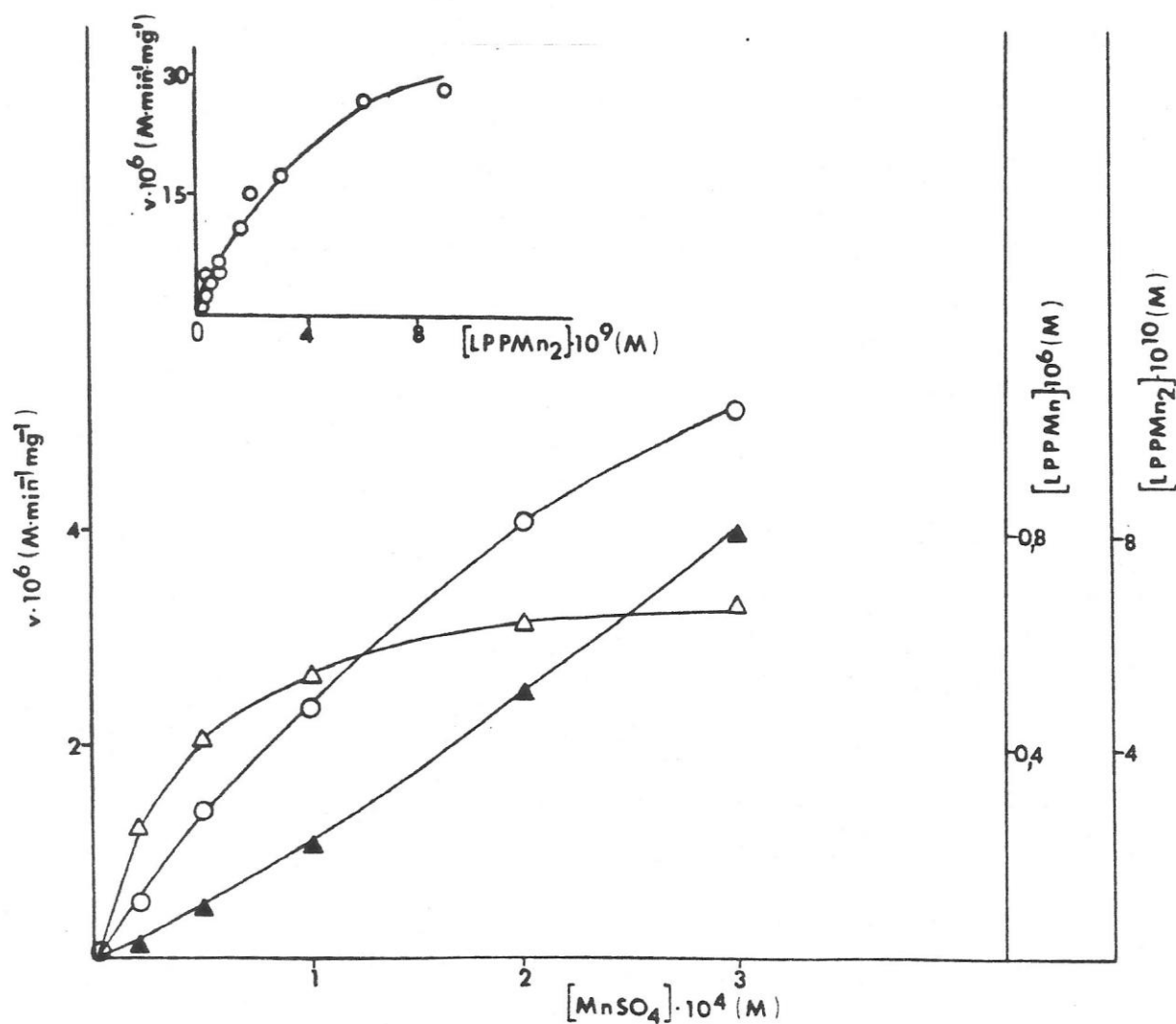


Figura 38 Relación entre la concentración de los complejos LPPMn y LPPMn₂ y la velocidad de reacción de la ciclasa.

$[\text{LPP}] = 0,77 \times 10^{-6} \text{ M}$; velocidad de reacción enzimática (O - O); $[\text{LPPMn}]$ ($\Delta - \Delta$); $[\text{LPPMn}_2]$ ($\blacktriangle - \blacktriangle$).

En la inserción: velocidad de reacción en función de la concentración calculada del complejo bimetálico LPPMn₂. Están incluidos los datos de velocidad a concentración de LPP variable y a concentración de $\text{Mn}^{2+} = 3 \text{ mM}$.

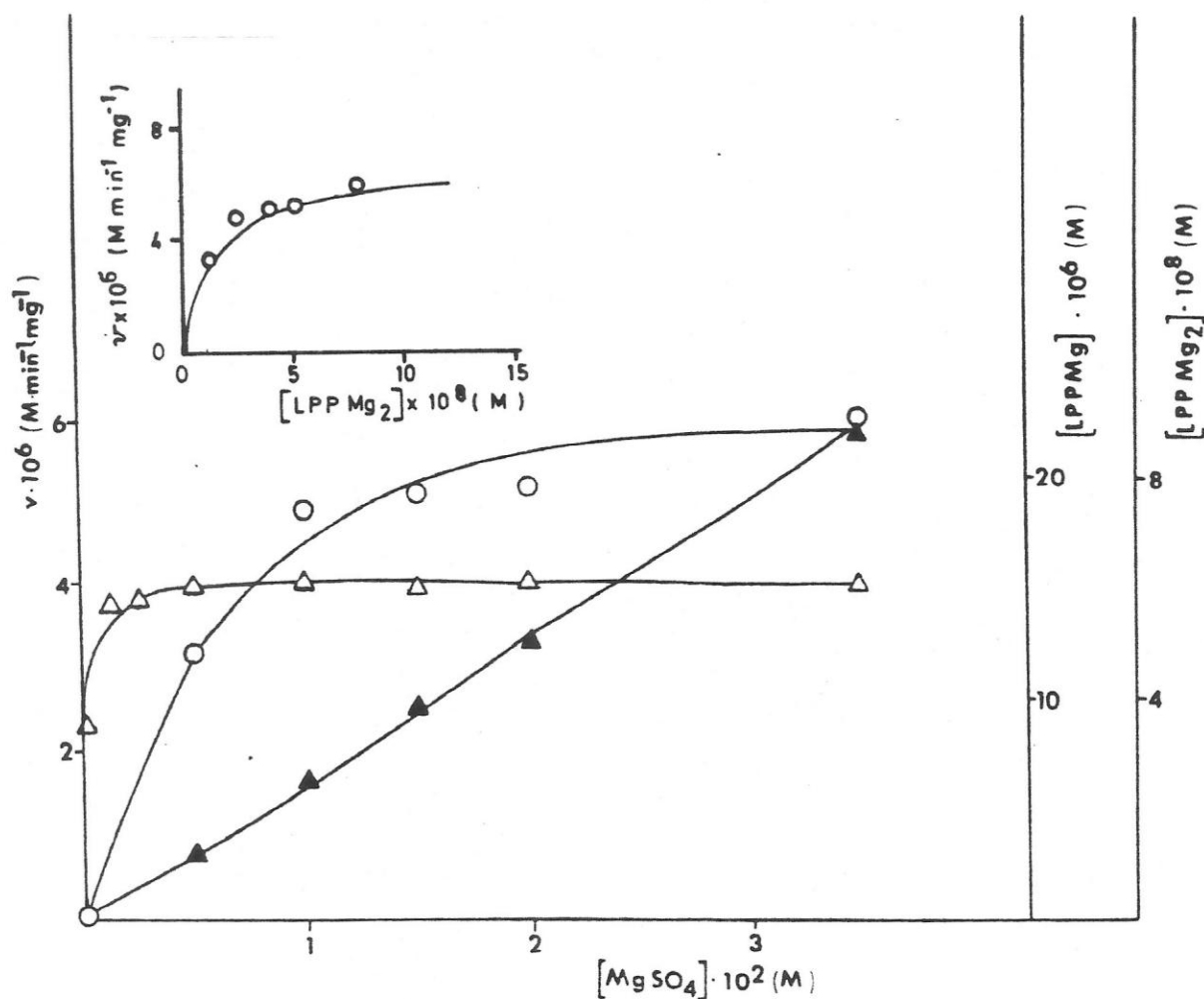


Figura 39 Relación entre la concentración de los complejos de LPPMg y LPPMg₂ y la velocidad de reacción de la ciclasa.

$[LPP] = 10 \times 10^{-6}$ M; velocidad de reacción enzimática (O-O); $[LPPMg]$ (Δ-Δ); $[LPPMg_2]$ (▲-▲).

En la inserción: velocidad de reacción en función de la concentración calculada del complejo bismetálico LPPMg₂.

alcanzado un nivel máximo. De estos experimentos se puede concluir que el compuesto que es utilizado por la ciclasa es el complejo bimetálico, para el cual la enzima sigue un comportamiento hiperbólico.

Luego, mediante el método de resolución gráfica de Eisenthal y Cornish-Bowden (1974), se calcularon K_m y V_{max} para $LPPMn_2^+$, obteniendo los valores de la tabla 27. De ella se desprende que la mayor eficiencia de la enzima (V_{max}/K_m) es para el complejo $LPPMn_2$, y que $LPPMg_2$ es utilizado con mucha menor eficiencia.

Llama la atención el valor de $2,75 \times 10^{-9} M$ para la K_m de la enzima con $LPPMn_2^+$. Este valor es uno de los más bajos de la literatura enzimológica e implica una unión tan fuerte que podría explicar el que no se haya encontrado LPP libre como intermediario en la transformación enzimática de GPP en hidrocarburos, o al utilizar precursores más lejanos como MVA o IPP; en todos los experimentos hay metal presente, y por lo tanto, el LPP que pudiese existir libre formaría el complejo y se ligaría fuertemente a la enzima generando productos. Es dable mencionar al respecto que los parámetros que aquí se informan podrían aún modificarse ya que, por una parte, se ha usado un sistema enzimático que todavía contiene fosfatasas que hidrolizan los sustratos, restando así sustrato disponible para la ciclasa, y por otra parte, se empleó una mezcla de (R) y (S) LPP, y sería de esperar que uno de ellos fuera utilizado

TABLA 27

Parámetros cinéticos para RPPM₂ y RPP total en la reacción catalizada por las ciclasas^{a)}

SUSTRATO	K_m (μM)	$\frac{V}{K_m}$ ($\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$\frac{V}{K_m}$ ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
LPPMn ₂	$2,75 \times 10^{-3}$	32,5	11.800
LPPMg ₂	$4,8 \times 10^{-2}$	7,6	160
NPPMn ₂	$1,08 \times 10^{-2}$	1,3	120
GPPMn ₂	1,4	7,0	5
LPP _{tot} (Mn ²⁺)	0,4	32,5	81
NPP _{tot} (Mn ²⁺)	1	1,3	1,3
GPP _{tot} (Mn ²⁺)	2,9	7,0	2,4

a) Portilla y col., 1987.

preferencialmente por sobre el de quiralidad opuesta.

Es interesante destacar que la conclusión a la que se llega, en cuanto a la utilización del complejo $RPPM_2$, tiene carácter general para las monoterpeno ciclasas, y muy probablemente para las sesquiterpeno ciclasas. Así por ejemplo, con los datos que aquí se han obtenido se puede demostrar que la velocidad de formación de hidrocarburos catalizada por la ciclasa de C. limonum se correlaciona con la concentración de $NPPMn_2$ (figura 40A) y que la bornildifosfato sintetasa (figura 40B) y la ciclasa que cataliza la formación de β -pineno, obtenida de S. officinalis (figura 40C) utilizan $GPPM_2$ (Croteau y Karp 1979a; Gambliel y Croteau 1984).

De estos resultados se puede obtener la K_m de la ciclasa para $NPPMn_2$ (tabla 27) que tiene un valor 100 veces menor que para el NPP total.

Para el caso de la ciclasa de S. officinalis que cataliza la formación de α -pineno a partir de GPP se puede calcular un valor de $K_m = 0,45 \times 10^{-6} M$ lo que indica que la unión del complejo bimetálico a enzimas provenientes de distintas especies es cuantitativamente semejante.

También en la biosíntesis de los sesquiterpenos cíclicos humuleno, tricodieno y cariofileno, sintetizados a partir de FPP, está descrito el requerimiento por Mg^{2+} o Mn^{2+} (Croteau y Gundy 1984; Cane y col. 1981). Si bien los autores no entregan información que permita elaborar sus resultados, se puede

Figura 40 A) Velocidad de reacción de la ciclasa de C. limonum en función de la concentración de Mn^{2+} .

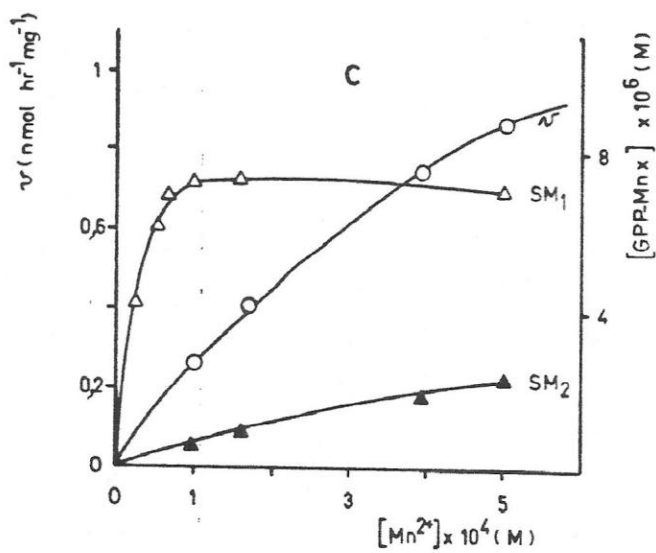
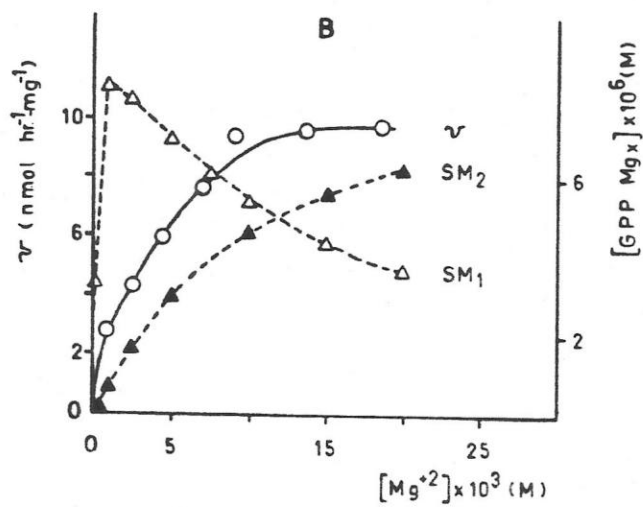
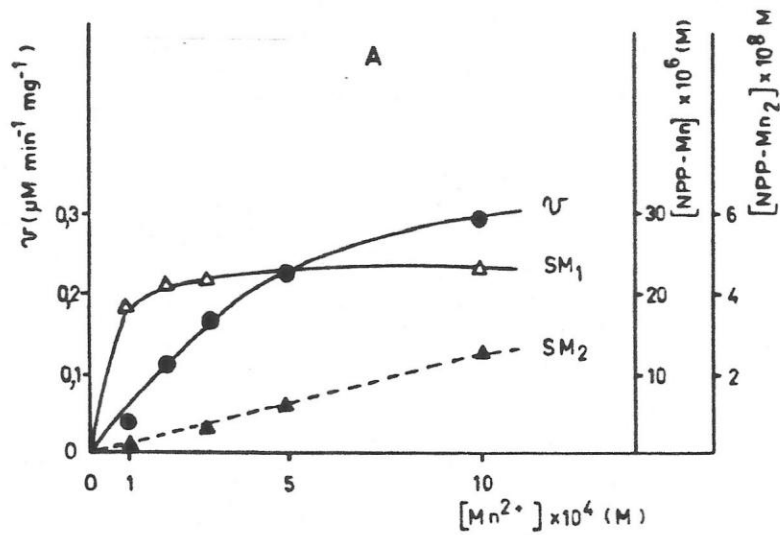
Datos obtenidos de experimentos realizados por M.C. Rojas y L. Chayet con $[Mn^{2+}]$ variable manteniendo $[NPP]=24 \mu M$.

B) Velocidad de reacción de bornildifosfato sintetasa de S. officinalis, en función de la concentración de Mg^{2+} .

Datos obtenidos de Croteau y Karp, 1979a.

C) Velocidad de reacción de ciclasa de S. officinalis que cataliza la biosíntesis de β -pineno en función de la concentración de Mn^{2+} .

Datos obtenidos de Gambliel y Croteau 1984.



presumir que el papel que cumpliría el metal sería similar al que cumple en la biosíntesis de monoterpenos, ya que la reacción también implica la eliminación del grupo difosfato con rotura C-O.

A diferencia de las reacciones recién analizadas, en la mayoría de las reacciones de transferencias de grupos fosforilos, en que hay rotura O-P, el metal se une formando un complejo monometálico favoreciendo la transferencia desde el sustrato dador hacia el aceptor. Es el caso de las primeras etapas de la ruta de isoprenoides en que el complejo monometálico ATPMg se utiliza en la transformación de MVA en IPP (Jabalquinto y Cardemil 1987). Luego, IPP se isomeriza a DMAPP, y en la reacción de condensación entre éstos, catalizada por la prenilsintetasa, 2 moles de Mg^{2+} anclan los dos sustratos permitiendo la condensación 1,4 (Poulter 1978). En este caso el grupo difosfato de DMAPP se elimina con rotura C-O formando un carbocación, reacción que en este aspecto puede considerarse análoga a la de biosíntesis de hidrocarburos cíclicos (Cori 1983).

Aunque hay descritos complejos bismetálicos, estos en general no participan en las reacciones de biosíntesis, exceptuando las reacciones que aquí se han analizado. Así por ejemplo, en la reacción $Hexosa + ATPMg \rightarrow HexosaP + ADPMg + H^+$ catalizada por la hexoquinasa de levadura, la formación del complejo $ATPMg_2$ produce una disminución de la velocidad por

secuestro del sustrato como un complejo inactivo (Noat y col. 1970); probablemente algo similar puede estar ocurriendo en la hidrólisis de los fosfatos GPP, NPP, FPP y ATP, catalizada por fosfatasas de C. sinensis (Pérez y col. 1980), en la cual se suprime la actividad enzimática a concentración de Mn^{2+} en que los sustratos estarían en el medio de reacción como complejos bismetálicos.

3.2.3 Estudios de inhibición.

GPP o NPP no radiactivos disminuyen la formación de $[1-^3H]$ LPP. La efectividad de estos inhibidores, medida como $I_{50}^a)$, (figura 41, tabla 28), es inferior a la capacidad de unión por LPP ($K_mLPP = 0,4 \mu M$) y comparable a la unión que éstos compuestos tienen cuando son empleados como sustratos. Aunque esto podría sugerir que una sola enzima uniría los sustratos primarios o terciario en el mismo sitio catalítico, la evidencia que se ha acumulado (sección 3.2.5) indica que el sistema enzimático contiene varias monoterpeneo ciclasas; por esto la inhibición observada estaría indicando únicamente que la LPP ciclasa es capaz de unir los isómeros primarios.

a) El término I_{50} corresponde a la concentración de inhibidor necesaria para reducir la velocidad de reacción en 50% a una concentración determinada de sustrato.

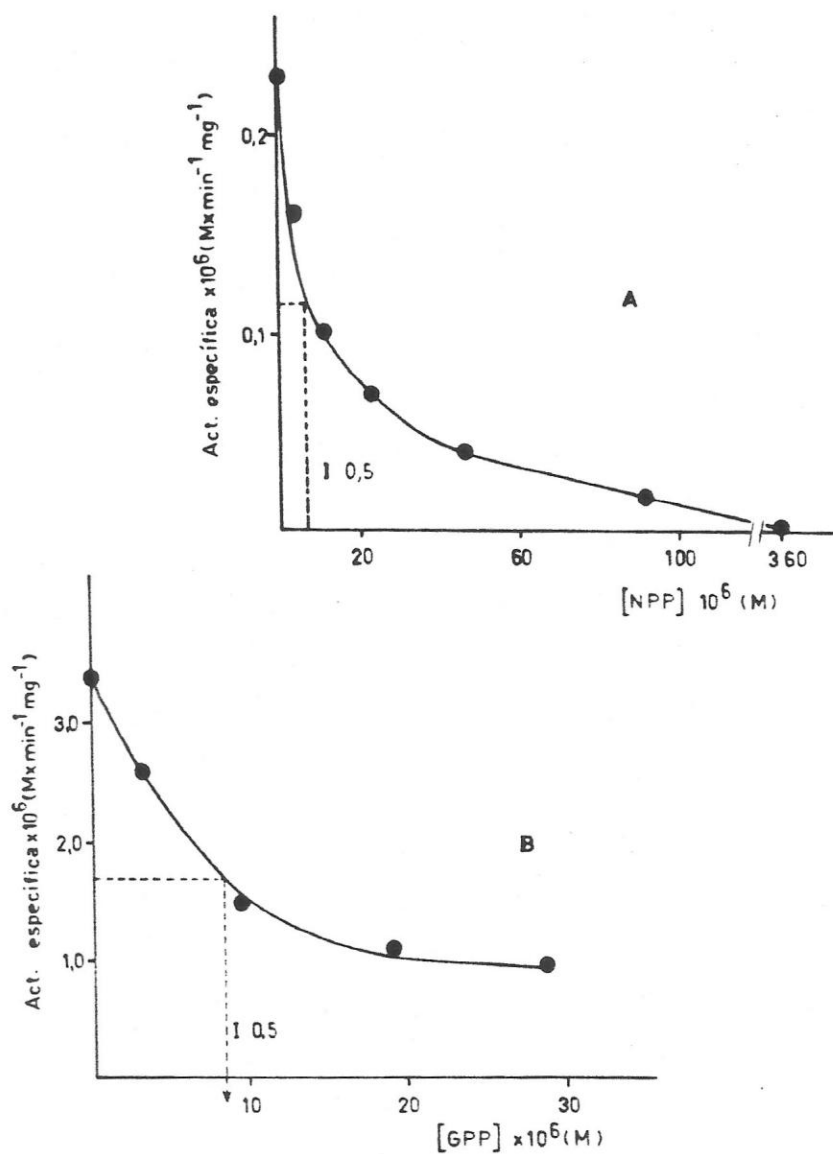


Figura 41 Inhibición de la biosíntesis de hidrocarburos al utilizar [1-³H] LPP como sustrato.

El extracto enzimático, purificado por cromatografía en DEAE-Sephadex, se incubó a 30° durante 3,5 min en amortiguador TES-HCl 100 mM, pH 7,0, con [1-³H] LPP 1 μ M, MnSO₄ 2 mM y concentraciones variables de NPP (fig. A) o de GPP (fig. B).

Los fosfomonoésteres GP, NP y LP,, que no son sustratos, inhiben la formación de hidrocarburos con valores de I_{50} entre 40 y 100 μM , demostrando así que el grupo difosfato, o más bien su complejo bismetálico, es esencial para la interacción enzima-ligando.

Tal como se ha visto en la sección 3.1, LP y por analogía GP y NP, no forman complejos bismetálicos que serían fundamentales para la unión; de modo que se puede concluir que el complejo bismetálico es requerido en forma absoluta por la ciclasa para la unión, además de que este complejo facilita la salida del grupo sin carga $\text{P}_2\text{O}_7\text{M}_2$ y estabiliza el catión inicialmente formado, es decir cumple un papel destacado en la unión y en la catálisis.

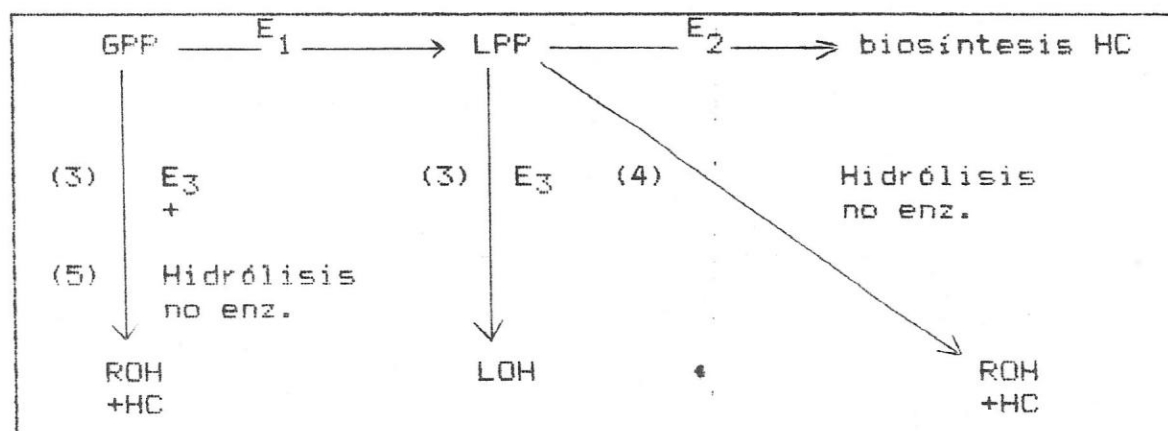
TABLA 28

Inhibición de la biosíntesis de hidrocarburos.

Inhibidor	I_{50} (μM)
NPP	6
GPP	8,5
NP	>100
GP	80
LP	45

3.2.4 Formación de LPP durante la transformación de GPP en hidrocarburos.

Dentro del planteamiento del postulado de biosíntesis de los hidrocarburos cíclicos a través del intermediario LPP pueden darse varias alternativas que lo involucren. Una de ellas es que la reacción transcurra en el sitio activo de una sola enzima que catalice la secuencia isomerización-ionización-ciclación-eliminación. Otra, que la reacción transcurra por medio de la participación de dos enzimas diferentes, una isomerasa, (E_1), y una ciclasa, (E_2). Dentro de esta ruta biosintética es necesario considerar que al romper las células se liberan fosfatasas, (E_3), que hidrolizan los compuestos fosforilados generando los respectivos alcoholes no reordenados. De los valores relativos de concentraciones de enzimas E_1 , E_2 y E_3 y de sus constantes cinéticas dependerá que exista la posibilidad de detectar LPP.



Así por ejemplo, si la concentración de E_3 es muy baja, $k_1 \gg k_2$ y la concentración de E_1 es suficientemente alta podría acumularse LPP; en este caso no se esperaría observar un período de latencia.

Por otra parte, en caso de que se formara LPP cabría la posibilidad de detectarlo a través de la presencia de LOH, el que provendría de la hidrólisis catalizada por las fosfatasas que contiene la preparación, o a través de la presencia de TOH y LOH, productos mayoritarios de su hidrólisis no enzimática (vía 4) (sección 3.1.3.7).

Finalmente, en caso de detectar la presencia de LOH durante los experimentos de biosíntesis sería preciso descartar que éste no proviniera de la hidrólisis no enzimática de GPP (vía 5).

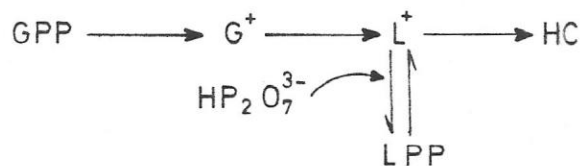
Se llevaron a cabo numerosos experimentos para determinar la existencia del intermediario, entre las cuales se pueden mencionar los siguientes:

- La incubación del extracto con $[1-^3\text{H}]$ GPP $10 \mu\text{M}$ y MnSO_4 3 mM entre 5 y 60 min (hasta 10% de sustrato transformado) da origen a 0.1% LOH + 4,9% GOH + 5% HC. Al incubar el extracto hervido se forma LOH en igual cantidad, concluyéndose de este modo que el alcohol proviene de la hidrólisis no enzimática de GPP (vía 5). Entre los alcoholes no se detectó TOH por lo que se concluye de este experimento que no hay evidencias de la secuencia isomerización de GPP a LPP (vía 1) e hidrólisis no

enzimática de LPP (vía 4).

- La fase acuosa residual en que se encontraban los difosfatos orgánicos que no se transformaron a ROH + HC, se hizo pasar por una columna de Chelex para eliminar el Mn^{2+} . Posteriormente se hidrolizó con fosfatasas tal como se describe en la sección 2.7.7, encontrando LOH en un rango entre 0,05% y 0,07% con respecto al GPP empleado. El experimento control, con GPP que no se había incubado previamente con el extracto, forma un porcentaje similar por lo que se puede concluir que en la fase acuosa no se acumula LPP.

- Se agregó $HP_2O_7^{3-}$ en concentraciones 150 y 300 μM y se incubó el medio de reacción por periodos variables (hasta 20% de sustrato transformado en alcoholes e hidrocarburos). No se emplearon concentraciones mayores de $HP_2O_7^{3-}$ para no producir una inhibición de la enzima (Cori y col. 1980). Se pensó, en este caso, que si la reacción ocurría en el sitio activo de una sola enzima, el agregado de $HP_2O_7^{3-}$ podía favorecer la liberación del intermediario de acuerdo al equilibrio:



El resultado fue semejante a los anteriores, es decir, no

se encontraron indicios de la presencia de LPP en el medio de reacción .

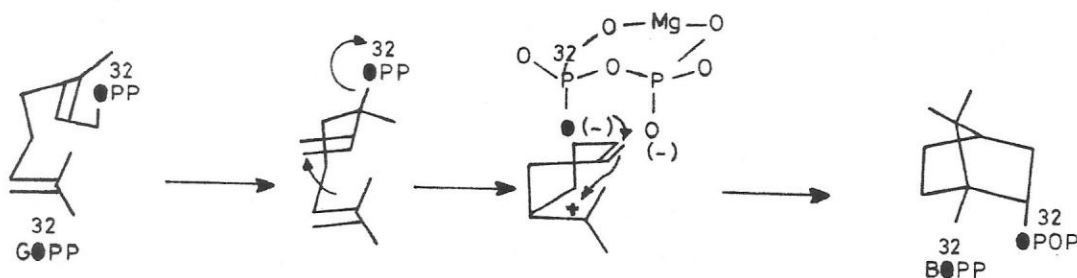
Es preciso indicar al respecto que los experimentos realizados concuerdan con el hecho de que al incubar un extracto parcialmente purificado de C. limonum no se observa un período de latencia (Rojas 1975), y concuerdan también con los resultados obtenidos por Croteau y col. (Poulouise y Croteau 1978, Croteau y col. 1980, Gambliel y Croteau 1984), quienes al utilizar diferentes preparaciones enzimáticas de T. vulgaris, F. vulgare y S. officinalis no encontraron interconversión de GPP en NPP o en LPP.

Por otra parte, el esquema planteado en el que participan dos enzimas, una isomerasa y una ciclasa tampoco puede sustentarse, no sólo por el hecho de que no fue posible aislar el probable intermediario sino porque algunas preparaciones enzimáticas de C. limonum utilizan exclusivamente GPP; esto último se puede interpretar más bien en términos de la existencia de varias ciclasas, cada una específica por uno de los isómeros GPP, LPP o NPP, como se analiza en 3.2.5.

La hipótesis de isomerización en el sitio activo de la ciclasa no ha sido hasta la fecha demostrada aún cuando en la literatura se ha presentado como parte de su mecanismo . Es el caso de la biosíntesis de fenchol (Croteau y col. 1984) y de BPP (Cane y col. 1982). En la biosíntesis de este último se utilizó G¹⁸O³²PP, indicando los autores que la ausencia de

barajamiento de la marca en el producto implicaría que la etapa de ciclación sería rápida comparada con el intercambio posicional de los isótopos durante la etapa inicial de isomerización.

Esta reacción es la única conocida en que el grupo saliente difosfato no se elimina. Puede también interpretarse el resultado anterior sin la formación obligatoria de LPP



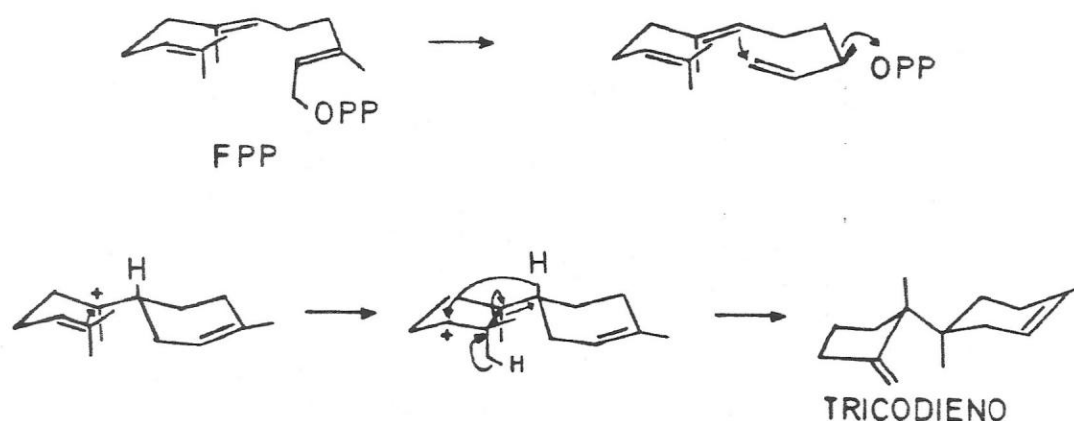
si durante la reacción se forma un par iónico en que el grupo difosfato queda ligado a la enzima, a través de uno de los metales por ejemplo, y luego del cierre de los anillos, retorna formando el nuevo enlace con el mismo oxígeno que estaba unido al C1 de GPP.

Otro experimento que da un resultado que igualmente puede tener más de una interpretación es el realizado con 6,7 dihidroGPP (Wheeler y Croteau 1986), el que al carecer del doble enlace en posición 6,7 no se puede ciclar. El sistema enzimático de *S. officinalis* que sintetiza α y β - pineno da origen con este compuesto a hidrocarburos y alcoholes. La composición de esta mezcla de productos podría provenir de 6,7 dihidro LPP o de 6,7 dihidroGPP, ya que al comparar la hidrólisis de estos derivados (Rittersdorf y Cramer 1967) se

ve que cualitativamente ambos dan productos similares .

6,7 dihidroGPP	6,7 dihidro derivados					
	mirceno	Z-ocimeno	E-ocimeno	LOH	NOH	GOH
10 μ M	29	10	16	16	5	25
80 μ M	16	6	9	24	7	38

Estos resultados recién comentados han sido empleados en la biosíntesis de sesquiterpenos cíclicos, en la cual el intermediario propuesto NdPP se asienta en la analogía con el papel que cumple el LPP (Cane y Ha 1988). Dado que la participación del NdPP como intermediario no había sido demostrada explícitamente, estos autores entregaron al sistema enzimático, que proviene de *Trichotecium roseum* [2,13-¹⁴C] NdPP y [1-³H] FPP durante 60 minutos; analizaron a intervalos la relación ³H / ¹⁴C en el producto, la que inicialmente tenía el mismo valor que la de los sustratos, y al término del experimento había aumentado 1,7 veces.



Según los autores estos resultados constituirían un apoyo a la participación de NdPP como intermediario biosintético, aún cuando los resultados también son consistentes con la participación tanto de NdPP como de FPP como sustratos de enzimas diferentes; el aumento de la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ en el producto se debería a la presencia de una isomeraza contaminante de la preparación.

En suma, la evidencia aportada por experimentos biosintéticos no demuestra que LPP o NdPP sean intermediarios obligatorios de la biosíntesis de mono y sesquiterpenos, sino que más bien demuestra que son sustratos muy efectivos de los diversos sistemas ensayados.

3.2.5 Disociación de actividades ciclásicas.

Al explorar las actividades enzimáticas de diversas preparaciones hemos encontrado mucha fluctuación tanto en el patrón de composición de hidrocarburos como en el de utilización preferencial del GPP o NPP o LPP. Así por ejemplo, algunas preparaciones forman sabineno, en tanto que otras carecen de esta actividad; otras utilizan exclusivamente GPP, es decir LPP y NPP no son sustratos; y una preparación perdió su capacidad de utilizar NPP (Cori y col. 1980). Esto último ocurrió por envejecimiento del sistema enzimático, que se había guardado al estado de polvo liofilizado a -20° durante 8 meses.

Todos estos hechos apuntaban a la existencia de varias ciclasas específicas por sustrato y por producto, por lo que se procedió a discriminarlas o a disociarlas. Para ello se abordaron dos metodólicas diferentes: filtración en Sephadex y radioinactivación.

3.2.5.1 Filtración en Sephadex G-100.

Se sometió una preparación enzimática que provenía de una columna de intercambio de DEAE-Sephadex a filtración en Sephadex G-100, obteniendo una ligera disociación entre las actividades medidas con los sustratos primarios y terciario; pero tanto estas actividades como el total de las proteínas se eluyeron en un pico ancho que cubría prácticamente todo el rango de filtración de la columna, indicando que la muestra contenía proteínas que interaccionaban entre sí. Por ésto se volvió a someter la muestra a intercambio iónico en DEAE-Sephadex tal como se describe en la sección 2.7.6, y las fracciones que contenían la actividad ciclásica se concentraron y aplicaron a la columna de Sephadex G-100 (figura 42). El patrón de elución muestra claramente que la actividad de LPP ciclasa se disocia de las actividades de NPP y GPP ciclasas, corroborando los resultados preliminares obtenidos con preparaciones menos purificadas, y aunque los picos están sobrepuestos la separación es suficientemente

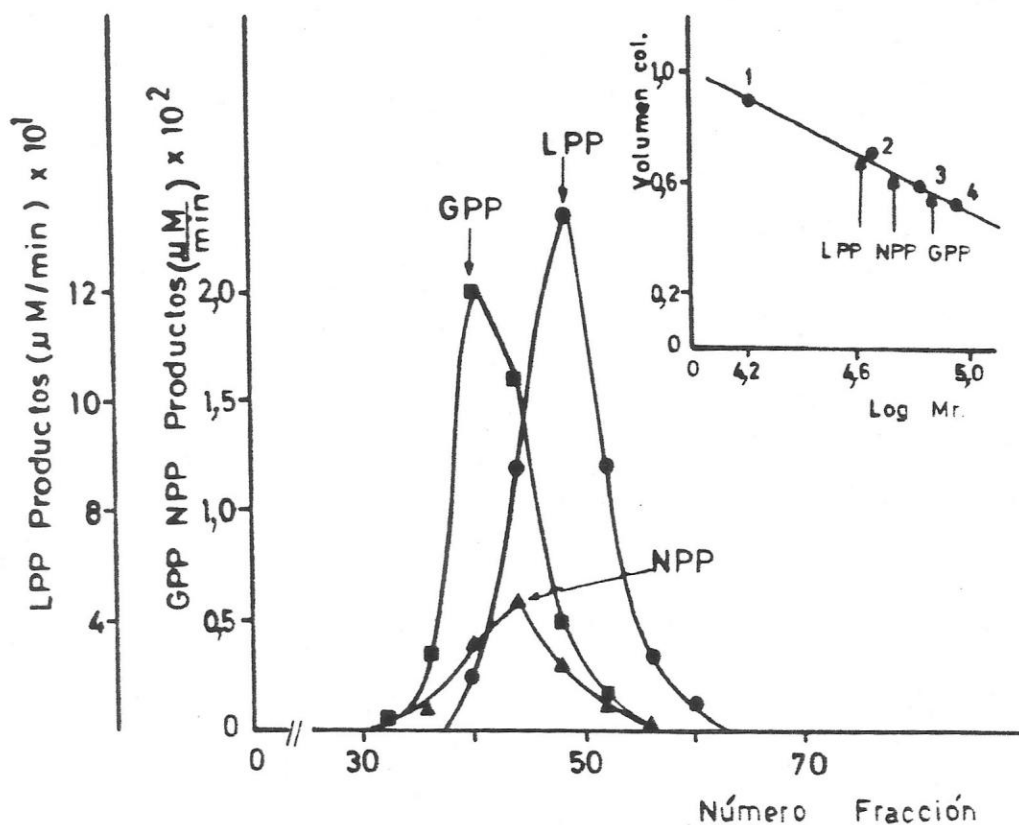


Figura 42 Determinación de las masas relativas de GPP, NPP y LPP ciclasas por filtración en Sephadex G-100.

Esté graficada la actividad enzimática total de cada fracción con GPP (■ - ■), NPP (▲ - ▲) y LPP (● - ●). Las condiciones experimentales se describen en la sección 2.7.6.

En la inserción: elución de proteínas estándares. 1 = mioglobina ($M_r = 17,000$); 2 = ovalbumina ($M_r = 45,000$); 3 = seroalbumina ($M_r = 66,500$); 4 = hexopuinasa de levadura ($M_r = 90,000$). Se indica con flechas la elución de GPP, NPP y LPP ciclasas.

buena como para que se logre tener fracciones que contienen solamente la actividad LPP ciclasa.

Al interpolar en la curva de calibración hecha con proteínas estándares se obtuvieron las masas relativas de 75.000, 56.000 y 45.000 para las GPP, NPP y LPP ciclasas demostrando, de este modo, la existencia de tres proteínas que difieren marcadamente en su masa molecular y especificidad por sustrato. Aún cuando no fue posible determinar la concentración de proteínas de cada fracción por los métodos convencionales, se puede apreciar en la tabla 29 que la preparación aplicada a la columna tiene las actividades de LPP y GPP ciclasas dentro del mismo orden de magnitud, en tanto que la actividad de LPP que emerge de la columna es alrededor de 80 veces mayor que la de GPP ciclasa; es decir, el paso por el gel afectó en forma diferente a estas proteínas recuperándose un 15% de las unidades iniciales de GPP ciclasa y 200% de las de LPP ciclasa.

3.2.5.2 Radioinactivación de ciclasas

La inactivación de las actividades ciclásicas ocurrió como una función exponencial de la dosis de radiación. La figura 43 muestra que el logaritmo de la actividad residual es función lineal de la dosis de radiación; de los valores D_{37} para cada actividad se determinaron las masas moleculares

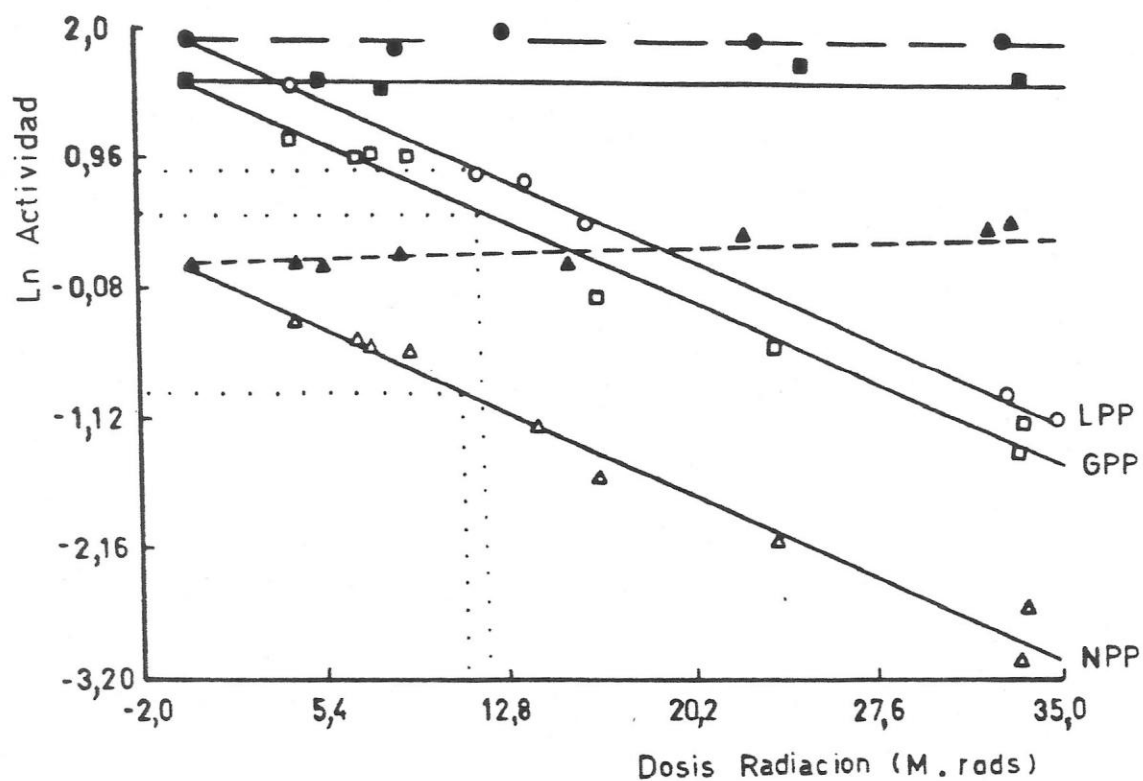


Figura 43 Radioinactivación de GPP, NPP y LPP ciclasas como una función de la dosis de irradiación.

Se ensayaron las actividades GPP (□-□), NPP (△-△), y LPP (○-○) a tiempos variables de exposición. Los controles sin irradiar (símbolos llenos) mantuvieron la actividad.

La M_r se calculó de acuerdo a la relación: $M_r = 6.4 \times 10^{11} / D_{37}$, en que D_{37} GPP ciclasa = 11,5 Mrad, D_{37} NPP ciclasa = 11,15 Mrad y D_{37} LPP ciclasa = 11,5 Mrad.

relativas (sección 2.7.5), obteniendo los siguientes valores: Mr GPP ciclasa = 57.000 ± 2.800 , Mr NPP ciclasa 56.000 ± 1.300 y Mr LPP ciclasa 56.000 ± 1.300 . Las masas moleculares encontrados se pueden considerar similares dentro del error experimental de la determinación y no informan sobre la GPP ciclasa de Mr 75.000 que se ha detectado por filtración. Cabe indicar que también se detecta cierta diferencia entre los valores de Mr de la LPP ciclasa determinados por estos métodos; sin embargo, se estima que esta diferencia cae dentro del rango habitual (Kempner y Schlegel 1979).

Pensando que es más probable que una enzima de gran tamaño molecular sea impactada por la radiación γ que una más pequeña, lo que se podría revelar por la ausencia de un producto, se analizaron los productos a diferentes tiempos de exposición a la radiación, y hasta 5% de la actividad remanente. La tabla 29 muestra las actividades específicas y el porcentaje de productos que se obtiene a dosis de radiación cero; se encontró que la relación entre los tres hidrocarburos se mantuvo constante, indicando la misma masa molecular para las enzimas.

Además, como una manera de comprobar que las moléculas impactadas quedaban completamente inactivas, es decir, que la actividad residual que se media correspondía a proteínas que no habían sufrido daño, se determinó la K_m de estas enzimas cuando habían sufrido un 50% de inactivación. Se encontró que

TABLA 29

Actividad específica de las ciclasas sometidas a filtración en Sephadex G-100 y a radioinactivación.^{a)}

Producto	LPP	GPF	NPP
α -pineno	0,4 (6)	0,27 (6)	0,065 (5)
β -pineno	0,54 (8)	3,87 (86)	1,04 (80)
limoneno	5,36 (80)	0,36 (8)	0,2 (15)
Actividad esp. total	6,3	4,5	1,3

a) Portilla y Rojas, 1989.

La actividad específica está expresada en $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de cada producto.

la enzima residual tenía los mismos valores de K_m que la enzima control.

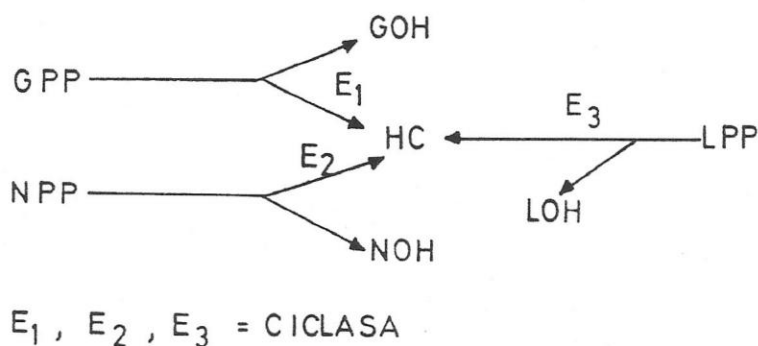
Estos dos resultados, igual relación entre hidrocarburos e iguales valores de K_m antes y después de la radioinactivación, permiten concluir que durante la exposición a la radiación no hubo daños parciales y que la única actividad residual detectada se debe a unidades que no han recibido radiación y que estas unidades están completamente activas.

De este modo, los resultados descritos muestran por una parte una GPP ciclasa de $M_r = 75.000$ (determinada por filtración en Sephadex G-100) y por otra, una GPP ciclasa de $M_r = 56.000$ (determinada por radioinactivación). Una probable explicación para esta discrepancia es proponer que ya que el procedimiento de radioinactivación permite detectar la unidad mínima catalítica en tanto que el de filtración pone en evidencia la unidad enzimática completa, la radioinactivación estaría afectando la subunidad catalítica de $M_r = 56.000$ y que ésta podría tener unida una subunidad de $M_r = 20.000$ sin actividad de ciclasa y por lo tanto no detectada.

A diferencia de esta enzima, la LPP ciclasa se detecta como una sola unidad que logra ser completamente separada de la GPP ciclasa en algunas fracciones de la columna de Sephadex G-100, constituyendo así la primera demostración definitiva de que el sistema de C. limonum contiene varias enzimas y que

éstas difieren en sus Mr.

La presencia de varias ciclasas permite, de este modo, explicar la gran variabilidad en cuanto a utilización de sustratos y formación de productos; sin embargo la existencia de una enzima que utiliza exclusivamente LPP requiere, sin duda, una explicación con respecto al papel que cumpliría en el metabolismo de los monoterpenos. Teniendo presente que se ha aislado LOH de diversas variedades de Citrus (Attaway y col., 1967) se puede postular la existencia de una enzima que catalizaría la biosíntesis de LPP que, dependiendo del tejido o de la especie sería utilizado en la biosíntesis de hidrocarburos o de LOH.



El LPP no ha sido aislado aún de extractos vegetales, lo que puede atribuirse por lo menos a dos causas: estos extractos presentan normalmente valores de pH alrededor de 5 lo que conduciría a su hidrólisis inmediata, y la rotura de las células libera fosfatasa que podrían hidrolizarlo. Resultaría así de especial interés la obtención de una preparación que permitiera enfocar el estudio de la biosíntesis del LPP.

CONCLUSIONES

El estudio de la hidrólisis de LPP y LP a diferentes valores de pH y en presencia o ausencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} permitió conocer la reactividad de estos compuestos desde el punto de vista de la cinética, de la estequiometría de unión de Mn^{2+} o Mg^{2+} y de la distribución de productos.

Se encontró que tanto el LPP y el LP como sus complejos metálicos se hidrolizan a mayor velocidad que sus isómeros primarios el GPP y el NPP, que los monofosfatos y los respectivos complejos de estos últimos.

Por inspección de la tabla 19 se puede concluir que todos los complejos bismetálicos $RPPM_2$ estudiados son varios órdenes de magnitud menos estables que los respectivos complejos monometálicos y que el efecto de los metales se manifiesta aumentando la velocidad de hidrólisis; resulta así que la especie más reactiva es el complejo $RPPM_2$. Las constantes de formación de $LPPMn_2$ y $LPPMg_2$ encontradas son dos órdenes de magnitud inferiores a las de los complejos del GPP (tabla 18), hecho que atribuimos a impedimento estérico de la unión del segundo metal.

De acuerdo con los valores de constantes de formación de los complejos mono y bismetálicos (tabla 18), se puede señalar que aquellos que contienen Mn^{2+} resultan más estables que los que contienen Mg^{2+} . En términos de la teoría de Pearson (1987 y 1988) el Mn^{2+} sería un catión más "blando" que el Mg^{2+} al contener orbitales d semillenos y podría

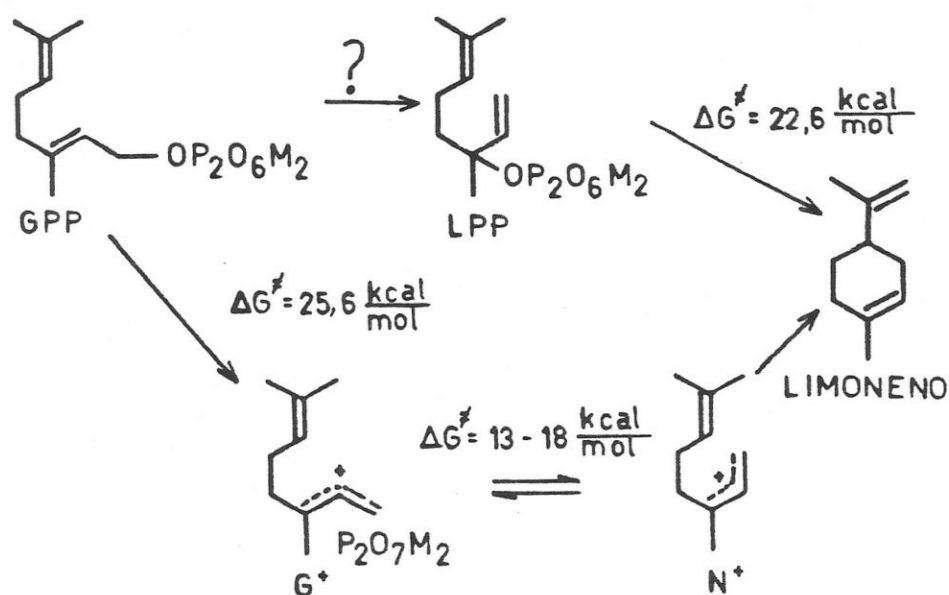
establecer cierto grado de covalencia con $RP_2O_7^{3-}$. En cambio el Mg^{2+} que no contiene estos orbitales, participaría en una interacción fundamentalmente iónica.

A diferencia del difosfato, el LP forma solamente un complejo monometálico y únicamente con Mn^{2+} .

Por otra parte, de la comparación de la distribución de productos de la hidrólisis de LPP y LP a pH ácido y neutro, o en presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} , se desprende que ésta ocurre a través de intermediarios diferentes, del tipo de los pares iónicos. Sin embargo, en condiciones de pH básico se detecta reordenamiento de LPP a GPP y NPP. Sobre esta base es dable proponer que GPP pueda a su vez reordenarse a LPP, aún cuando en esta tesis tal reordenamiento no se encuentra.

Si bien este último hecho daría solidez experimental al planteamiento de que en las reacciones de biosíntesis de hidrocarburos cíclicos GPP se isomerizaría a LPP y este último sería el precursor de todos los compuestos cíclicos (Croteau 1987), también se encuentran argumentos en su contra. Por una parte las ciclasas utilizan el complejo bismetálico que es un buen grupo saliente pero no un buen nucleófilo que pueda atacar sobre el centro terciario, por otra el reordenamiento se encuentra únicamente a pH básico, condición en la que no se elimina el grupo difosfato. Finalmente, las conclusiones obtenidas en base a cálculos de energía libre de activación apuntan a que el reordenamiento de GPP a LPP y la posterior

ionización de este último no constituiría una clara ventaja energética, si se compara con la ionización del GPP y la rotación del carbocación resultante. Es de destacar que ambas alternativas implican como primera etapa la rotura del enlace C₁-O del GPP, constituyendo en las reacciones de hidrólisis la etapa limitante (Rojas y Vial 1988).



El estudio de la reactividad de GPP y NPP en presencia de Mn²⁺ o Mg²⁺ en micelas de SDS permitió observar un incremento en la velocidad de hidrólisis de ambos compuestos. Además, para el caso del NPP se produce un aumento de la cantidad de hidrocarburos, hecho que se atribuye a la concentración del complejo bismetálico en la superficie micelar.

Por los resultados expuestos, el estudio realizado a pH 7 en presencia de Mn²⁺ o Mg²⁺ se acerca más que la hidrólisis a pH ácido a la reacción que debe ocurrir en el sitio activo

de las monoterpeno ciclasas , y en particular de las ciclasas de C. limonum.

Para el sistema de C. limonum se puede concluir que un complejo LPPM₂ es el sustrato de la biosíntesis de los hidrocarburos α y β -pineno, limoneno y γ terpineno, siendo el complejo bismetálico con Mn²⁺ mejor utilizado que el de Mg²⁺ .

Asímismo la porción difosfato , o más precisamente el complejo bismetálico, resulta esencial para la unión y la catálisis , ya que el LP por una parte no es sustrato, y por otra, es un muy mal inhibidor. El complejo LPPM₂ podría unirse al sitio activo de la enzima por medio de uno o de ambos metales, los cuales además facilitarían la salida del grupo difosfato al neutralizar sus cargas.

Hemos presentado antecedentes que indican que el conjunto de enzimas que aprovecharían la alta reactividad del complejo bismetálico se puede extender más allá de las que forman hidrocarburos monoterpénicos e incluiría las que catalizan la biosíntesis de mono y sesquiterpenos cíclicos a partir de los respectivos ésteres difosforilados.

Por otra parte, al explorar una preparación parcialmente purificada encontramos que no se detecta LPP en el medio de reacción, ni su producto de hidrólisis enzimática LOH, ni los alcoholes provenientes de hidrólisis no enzimática LOH y TOH, lo cual en definitiva nos lleva a descartar que ocurra una isomerización previa a cargo de una enzima y que otra

diferente utilice el producto para formar los hidrocarburos.

Se concluye en esta tesis que el sistema contiene varias enzimas responsables de la biosíntesis de los hidrocarburos, es decir que no se trata de una sola enzima capaz de utilizar en forma inespecífica GPP, NPP o LPP: Se ha logrado separar las unidades responsables de estas actividades por medio de la filtración en Sephadex G-100, obteniendo para la GPP ciclase una $M_r = 75.000$, para la NPP ciclase una $M_r = 56.000$ y para la LPP ciclase una $M_r = 45.000$.

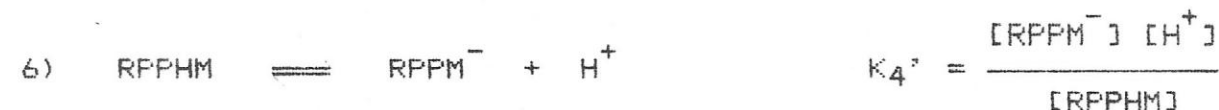
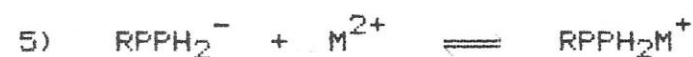
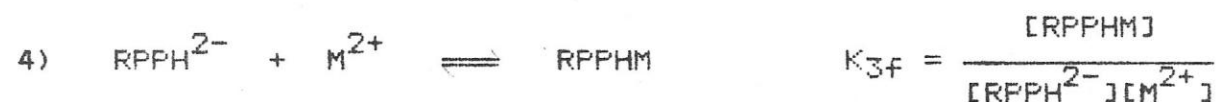
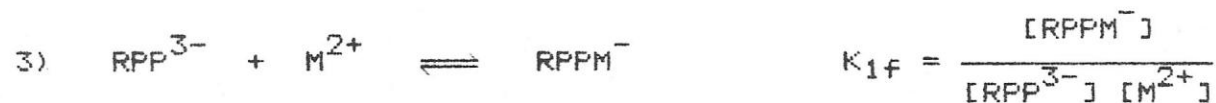
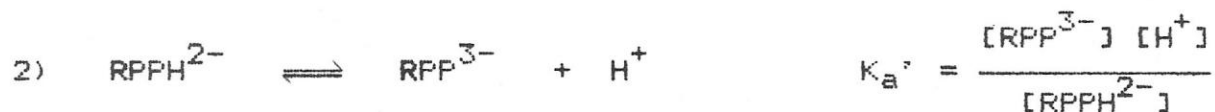
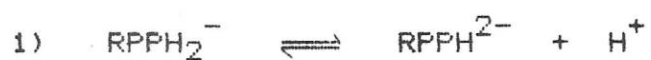
Nuestras observaciones apoyan la hipótesis de formación del carbocatión con rotación más bien que la de la formación de LPP como intermediario; tomamos en cuenta para ello que hemos aislado dos enzimas que utilizan en forma excluyente GPP y LPP, que los estudios de hidrólisis de LPP indican que una isomerización de GPP a LPP no constituiría una ventaja catalítica con respecto a la rotación del carbocatión geranilo y que parece probable la participación del aminoácido metionina durante la reacción (Cori y col. 1981). Se puede plantear de este modo una nueva versión del mecanismo carbocatiónico , en el cual luego de la unión con la enzima debe ocurrir la fisión C_1-O para formar un par iónico inicial; a continuación un nucleófilo, como podría ser la metionina, estabilizaría la carga del catión dando origen a un intermediario linalilo unido covalentemente a la enzima. La contribución de este intermediario facilitaría la rotación en

A P E N D I C E S

APENDICE 1

Deducción de las ecuaciones para el cálculo de las constantes K_{1f} o $K_{RPP^3-}^{M^{2+}}$, K_{3f} o $K_{RPPH^{2-}}^{M^{2+}}$ y K_4' o K_{RPPHM}^*

Los equilibrios y las constantes de equilibrio involucradas son:



* La deducción es igualmente válida para el monofosfato RP^{2-} y RPH^- . Se reserva el término K_2' para referirse a la constante de disociación del complejo bismetálico $RPPM_2$.

La constante de disociación de protón de $RPPH_2^-$ no se determinó porque se detectó hidrólisis de los compuestos; sin embargo, se puede considerar similar a la de $ADPH_2^-$, $pK = 2,0$ (Phillips, 1966). Al iniciar la titulación a $pH = 4$ la contribución de esta especie es muy pequeña, por tanto se pueden eliminar las ecuaciones 1) y 5).

Para los efectos de la deducción se define:

$$a) \quad T_M = [M^{2+}] + [RPPHM] + [RPPM^-]$$

en que $[M^{2+}]$ corresponde a $[M^{2+}]$ libre

$$b) \quad T_A = [RPPH^{2-}] + [RPP^{3-}] + [RPPHM] + [RPPM^-]$$

En el sistema $RPP/M = 1:1$ $T_M = T_A$ y la concentración de protones titulables es:

$$c) \quad [H^+] = [RPP^{3-}] + [RPPM^-] - aT_A + [OH^-]$$

"a" representa los moles de base agregada por mol de ligante presente.

Se expresan las concentraciones de RPP^{3-} , $RPPM^-$ y T_A en función de las constantes de equilibrio:

A partir de las ecuaciones 6) y a) y considerando que $T_M = T_A$ se obtiene $RPPM^-$:

$$d) \quad [RPPM^-] = \frac{T_A - [M^{2+}]}{K_4' + [H^+]}$$

A partir de las ecuaciones b) y d) se obtiene [RPPHM]

$$e) \quad [RPPHM] = [H^+] \frac{T_A - [M^{2+}]}{K_4' + [H^+]}$$

Estos términos se incorporan en la ecuación b)

$$f) \quad T_A = [RPP^{3-}] \left[\frac{[H^+]}{K_a'} + 1 \right] + \frac{[H^+]T_A - [H^+][M^{2+}] + K_4'T_A - K_4'[M^{2+}]}{K_4' + [H^+]}$$

Se define $Z = \frac{[H^+]}{K_a} + 1$; se reemplaza en f) y se obtiene [RPP³⁻]:

$$g) \quad [RPP^{3-}] = \frac{[M^{2+}]}{Z}$$

Se incorpora este término en la ecuación c) y se despeja [M²⁺]:

$$[H^+] + aT_A - [OH^-] = \frac{[M^{2+}]}{Z} + [RPPM^-]$$

$$[H^+] + aT_A - [OH^-] = \frac{[M^{2+}]}{Z} + K_{1f} [M^{2+}] [RPP^{3-}]$$

$$[H^+] + aT_A - [OH^-] = \frac{[M^{2+}]}{Z} + K_{1f} \frac{[M^{2+}]^2}{Z}$$

$$0 = K_{1f} [M^{2+}]^2 + [M^{2+}] - Z [H^+] + aT_A - [OH^-]$$

$$7) \quad [M^{2+}] = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4K_{1f}(Z) \left[[H^+] + aT_A - [OH^-] \right]}}{2K_{1f}}$$

Se dan diferentes valores de K_{1f} para obtener los correspondientes valores de $[M^{2+}]$. El resto de los términos se miden experimentalmente.

Para obtener la expresión que define K_{3f} se emplean las ecuaciones 7), 4) y g) y se despeja $[RPPHM]$.

$$[RPPHM] = T_A - [M^{2+}] - \frac{K_{1f} [M^{2+}]^2}{Z}$$

La $[RPPH^{2-}]$ se despeja de la ecuación 2), y se introduce en la ecuación 4) quedando así:

$$8) \quad K_{3f} = \frac{K_a'}{[M^{2+}]^2 [H^+]} \left[ZT_A - Z[M^{2+}] - K_{1f} [M^{2+}]^2 \right]$$

Los valores de $[M^{2+}]$ se sustituyen en la ecuación 8), obteniendo así los valores correspondientes de K_{3f} .

Se grafican los valores de K_{3f} vs K_{1f} . Se obtiene una línea para cada punto de la curva de titulación. La intersección en un sólo punto corresponde a la solución única de las ecuaciones.

Además se puede obtener K_4' a partir de las ecuaciones 2)

y 4).

$$K_{3f} = \frac{K_a' [\text{RPPM}]}{K_4' [\text{M}^{2+}] [\text{RPP}^{3-}]} = \frac{K_a' (K_{1f})}{K_4'}$$

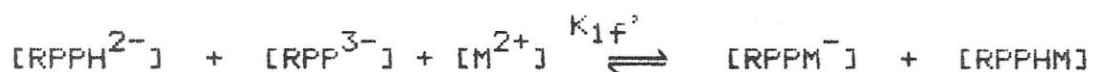
9)

$$K_4' = \frac{K_a' (K_{1f})}{K_{3f}}$$

APENDICE 2

Deducción de la constante de unión aparente K_{1f}' :

K_{1f}' aparente representa la constante de unión a metal de todas las especies ligantes presentes:



Las concentraciones de RPPM^- y RPPHM se expresan como funciones de K_{1f} y K_{3f} según las ecuaciones 3) y 4) del Apéndice 1. De este modo:

$$K_{1f}' \text{ aparente} = \frac{K_{3f} [\text{RPPH}^{2-}] [\text{M}^{2+}] + K_{1f} [\text{RPP}^{3-}] [\text{M}^{2+}]}{([\text{RPP}^{3-}] + [\text{RPPH}^{2-}]) [\text{M}^{2+}]}$$

Al expresar $[\text{RPP}^{3-}]$ en términos de su constante de disociación según la ecuación 2) del Apéndice 1, se obtiene:

$$10) \quad K_{1f}' = \frac{K_{1f} + K_{3f} [\text{H}^+] / K_a'}{[1 + [\text{H}^+] / K_a']}$$

En los cálculos cinéticos se empleó K_1' que representa la constante de disociación aparente del complejo monometálico RPPM .

$$e) \quad [SM_1] = K_2' \frac{(T_A - [S])}{K_2' + [M^{2+}]}$$

Utilizando las ecuaciones c) y d), se obtiene $[SM_2]$:

$$f) \quad [SM_2] = [M^{2+}] \frac{(T_A - [S])}{K_2' + [M^{2+}]}$$

Se introducen los términos correspondientes a $[SM_1]$ y $[SM_2]$, de las ecuaciones e) y f) respectivamente, en la expresión general de velocidad de la ecuación 13).

$$v_{total} = k_0[S] + \frac{(T_A - [S]) (k_1 K_2' + k_2 [M^{2+}])}{K_2' + [M^{2+}]}$$

Si $[M^{2+}]$ es $\gg K_1'$, la $[S]_{libre} \Rightarrow 0$, ya que

$$[S] = \frac{K_1' [SM_1]}{[M^{2+}] \uparrow \uparrow \uparrow}$$

por lo tanto, la expresión de velocidad se reduce a:

$$v_{total} = \overset{0}{\cancel{k_0[S]}} + \frac{(T_A - \overset{0}{\cancel{[S]}) (k_1 K_2' + k_2 [M^{2+}])}{K_2' + [M^{2+}]}$$

$$v_{total} = \frac{T_A (k_1 K_2' + k_2 [M^{2+}])}{K_2' + [M^{2+}]}$$

Se obtiene finalmente la constante experimental ya que:

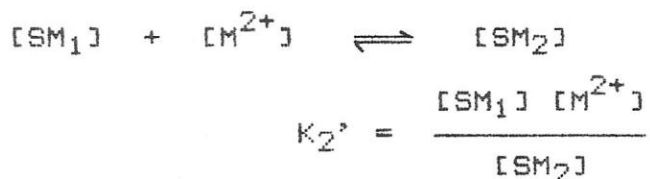
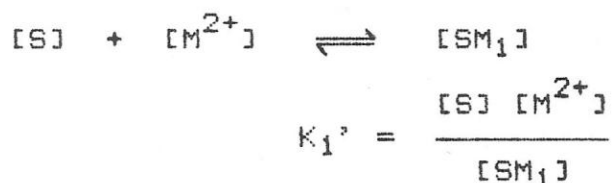
$$v_{total} = k_Y T_A$$

APENDICE 3

Deducción de la expresión cinética de la constante de hidrólisis k , en función de la concentración de metal.

Para los efectos de la deducción, se define:

- a) S = ligante libre total.
 - b) SM_1 = especie monometálica total.
 - c) SM_2 = especie bismetálica total.
 - d) T_A = concentración total de ligante = $[S] + [SM_1] + [SM_2]$
- y se consideran los siguientes equilibrios:



La expresión de velocidad es:

$$13) \quad v_{total} = k_0[S] + k_1[SM_1] + k_2[SM_2]$$

Utilizando las ecuaciones b) y d), se obtiene $[SM_1]$:

$$T_A = [S] + [SM_1] \left[1 + \frac{[M^{2+}]}{K_2'} \right]$$

$$14) \quad k_Y = \frac{k_1 K_2' + k_2 [M^{2+}]}{K_2' + [M^{2+}]}$$

Esta ecuación se puede transformar en la ecuación de una hipérbola de acuerdo al siguiente procedimiento:

$$\text{Sea } g) \quad k_Y = A + k_1 \quad \text{y por tanto} \quad A = k_Y - k_1$$

Al reemplazar en la ecuación 14, se obtiene:

$$A + k_1 = \frac{k_1 K_2' + k_2 [M^{2+}]}{K_2' + [M^{2+}]}$$

que se puede reordenar y simplificar:

$$A = \frac{k_1 K_2' + k_2 [M^{2+}] - k_1 (K_2' + [M^{2+}])}{K_2' + [M^{2+}]}$$

$$A = \frac{k_1 (\cancel{K_2'} - \cancel{K_2'} - [M^{2+}]) + k_2 [M^{2+}]}{K_2' + [M^{2+}]}$$

$$A = \frac{(k_2 - k_1) [M^{2+}]}{K_2' + [M^{2+}]}$$

que en definitiva corresponde según la ecuación g) a:

$$15) \quad (k_{\psi} - k_1) = \frac{(k_2 - k_1) [M^{2+}]}{K_2' + [M^{2+}]}$$

Linearización de la hipérbola:

La ecuación 15 se puede linearizar utilizando diferentes procedimientos:

- Según Hanes y Woolf (1932)

$$\frac{[M^{2+}]}{(k_{\psi} - k_1)} = \frac{K_2'}{(k_2 - k_1)} + \frac{[M^{2+}]}{(k_2 - k_1)}$$

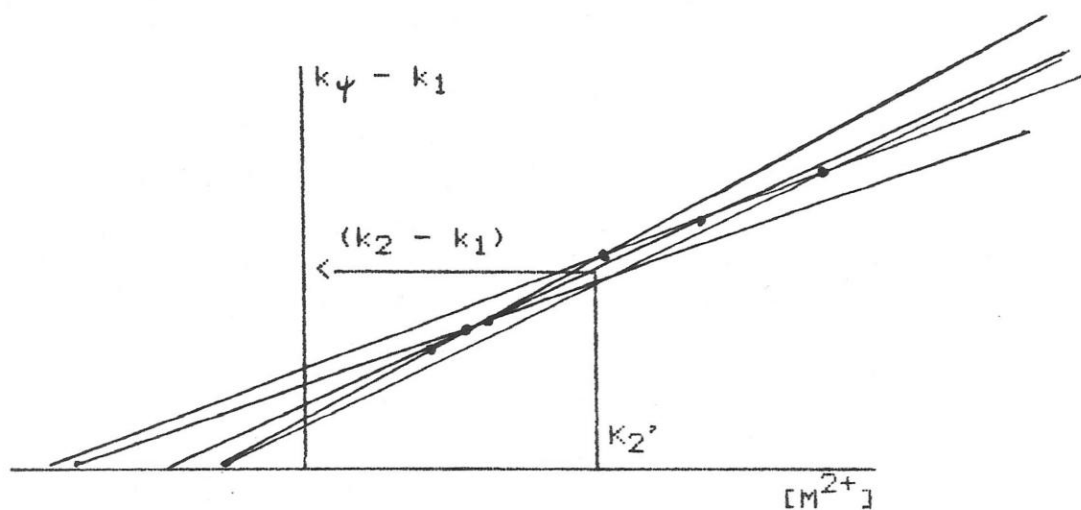
en que al graficar $[M^{2+}] / (k_{\psi} - k_1)$ en función de $[M^{2+}]$, la intersección = $K_2' / (k_2 - k_1)$ y la pendiente = $1 / (k_2 - k_1)$.

- Según Eisenthal y Cornish-Bowden (1974), se puede obtener una solución gráfica de la ecuación 15) si se reordena en la forma:

$$\frac{(k_2 - k_1)}{(k_{\psi} - k_1)} - \frac{K_2'}{[M^{2+}]} = 1$$

En el espacio $(k_2 - k_1)$, K_2' , la ecuación corresponde a una recta. En la práctica, para cada punto experimental $([Mn^{2+}], (k_{\psi} - k_1))$ se traza una recta; la coordenada del

punto, ó la mediana de los puntos, donde las líneas se cortan entrega el valor de $(k_2 - k_1)$ y K_2' que satisface la ecuación.

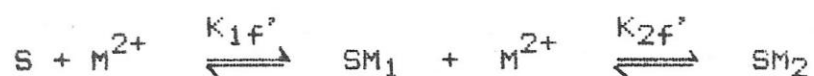


NOTA: Los puntos representan las intersecciones entre las rectas y no corresponden a valores experimentales.

APENDICE 4

Deducción de las ecuaciones para el cálculo de las concentraciones de las especies mono y bismetálicas.

Para el equilibrio:



en que $[M^{2+}]$ = concentración del metal libre

$[SM_1]$ = concentración del complejo monometálico

$[SM_2]$ = concentración del complejo bismetálico

$[S]$ = concentración del ligante libre

T_M = concentración de metal total

T_A = concentración de ligante total = $S + SM_1 + SM_2$

El sistema se puede describir por medio de las siguientes ecuaciones:

$$a) \quad K_{1f'} = \frac{[SM_1]}{[S][M^{2+}]}$$

$$b) \quad K_{2f'} = \frac{[SM_2]}{[SM_1][M^{2+}]}$$

$$c) \quad [M^{2+}] = T_M - [SM_1] - 2[SM_2]$$

$$d) [S] = T_A - [SM_1] - [SM_2]$$

Incorporando b) en la ecuación c), se tiene:

$$[M^{2+}] = T_M - [SM_1] - 2K_{2f}' [SM_1][M^{2+}]$$

$$e) \boxed{[M^{2+}] = \frac{T_M - [SM_1]}{1 + 2K_{2f}' [SM_1]}}$$

Incorporando b) en la ecuación d), se tiene:

$$[S] = T_A - [SM_1] - K_{2f}' [SM_1][M^{2+}]$$

y [S] se introduce en la ecuación a)

$$a') \left[T_A - [SM_1] - K_{2f}' [SM_1][M^{2+}] \right] [M^{2+}] = \frac{[SM_1]}{K_{1f}'}$$

y $[M^{2+}]$ (e) se introduce en ecuación a')

$$a'') \left[T_A - [SM_1] - K_{2f}' [SM_1] \frac{T_M - [SM_1]}{1 + 2K_{2f}' [SM_1]} \right] \frac{T_M - [SM_1]}{1 + 2K_{2f}' [SM_1]} = \frac{[SM_1]}{K_{1f}'}$$

Al desarrollar esta expresión, se obtiene la siguiente ecuación cúbica:

$$17) \left[\frac{4(K_{2f}')^2}{K_{1f}'} - K_{2f}' \right] [SM_1]^3 + \left[2T_A K_{2f}' + \frac{4(K_{2f}')^2}{K_{1f}'} - 1 \right] [SM_1]^2 + \left[T_M + K_{2f}' (T_M)^2 + T_A + \frac{1}{K_{1f}'} - 2T_A K_{2f}' T_M \right] [SM_1] - T_M T_A = 0$$

Con esta ecuación se determina el valor de $[SM_1]$. Luego se reemplaza el valor de SM_1 obtenido y $[M^{2+}]$ (e) en la ecuación b), obteniendo así $[SM_2]$

$$18) \quad [SM_2] = K_{2f}'[SM_1] \frac{T_M - [SM_1]}{1 + 2K_{2f}'[SM_1]}$$

y finalmente se determina $[S]$:

$$[S] = T_A - [SM_1] - [SM_2]$$

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- Adams, S.P. & Heinstein, P.
Phytochemistry (1973), 12, 2167.
- Allinger, N.L. & Siefert, H.J.
J. Am. Chem. Soc. (1975), 97, 752.
- Arigoni, D.
Pure Appl. Chem. (1975), 41, 219.
- Astin, K.B. & Whiting, M.C.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. (1976), 1160.
- Attaway, J., Pieringer, A.P. & Barabas, L.J.
Phytochemistry (1967), 6, 25.
- Attenburrow, J., Cameron, A. F. H., Chapman, J.H., Evans, R. M., Hems, B.A., Jansen, A.B.A. & Walker, T.
J. Chem. Soc. (1952), 1194.
- Avalos, V.
Tesis para optar al título de Químico-Farmacéutico (1986). U de Chile, Santiago.
- Baer, E.
J. Am. Chem. Soc. (1944), 66, 303.
- Banthorpe, D.V. & Charlwood, B.V.
En "Encyclopedia of Plant Physiology" (1980), 8, 185. New Series (Bell, E.A., Charlwood, B.V., Eds.) Berlin, Springer Verlag.
- Banthorpe, D.V., Christou, P., Pink, C. & Watson, D.
Phytochemistry (1983), 22, 2465.
- Banthorpe, D.V., Long, D.R.S. & Pink, C.
Phytochemistry (1983), 22, 2459.
- Banthorpe, D.V. & Poots I.
Phytochemistry (1979), 18, 1297.
- Baxter, R.L., Lawrie, W.A., Mc Hale, D.
Tetrahedron (1978), 34, 2195.
- Beytía, E.D. & Porter, J.W.
Annual Review Biochem. (1976), 45, 113.
- Beytía, E., Valenzuela, P. & Cori, O.
Arch. Biochem. and Biophys. (1969), 129, 346.
- Bollinger, J.M., Brinich, J.M. & Oláh, G.A.
J. Am. Chem. Soc. (1970), 92, 4025.

- Brems, D. & Rilling, H.
J. Am. Chem. Soc. (1977), 99, 8351.
- Bunton, C.A.
Catal. Rev. Sci. Eng. (1979), 20, 1.
- Bunton, C.A. & Cori, O.
Interciencia (1978), 3, 291.
- Bunton, C.A., Cori, O., Hachey, D., Leresche, J.P.
J. Org. Chem. (1979), 44, 3238.
- Burton, K.
Biochem. J. (1959), 71, 388.
- Butler, J.N.
En "Ionic Equilibrium a Mathematical Approach" (1964), Cap. 8,
287, Addison-Wesley Co. Inc. E.E.U.U.
- Cane, D.E.
En "Biosynthesis of isoprenoid compounds" (1981), 1 cap.6, 283.
(Porter J.W. & Spurgeon S.L., Eds.) J. Wiley & Sons, Inc.
- Cane, D., Iyengar, R & Shiao, M.S.
J. Am. Chem. Soc. (1981), 103, 914.
- Cane, D., Saito, A., Croteau, R., Shaskus, J. & Felton, M.
J. Am. Chem. Soc. (1982), 104, 5831.
- Cane, D.E., Swanson, S. & Murthy, P.P.
J. Am. Chem. Soc. (1981), 103, 2136.
- Chayet, L., Pérez, L.M., Cardemil, E., de la Fuente, M.,
Rojas, C., Portilla, G., Hashagen, U., Taucher, G. & Cori, O.
VII International Congress of Essential Oils,
Kyoto (1977), 200.
- Chayet, L., Pont-Lezica, R., George-Nascimento, C. & Cori, O.
Phytochemistry (1973), 2, 95.
- Chayet, L., Rojas, C., Cardemil, E., Jabalquinto, A.M.,
Vicuña, J.R. & Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys. (1977), 180, 318.
- Chayet, L., Rojas, C., Cori, O. & Bunton, C.A.
Bioorg. Chem. (1984), 12, 329.
- Coates, R.M. & Cavender, P.
J. Am. Chem. Soc. (1980), 102, 6358.
- Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys. (1969), 135, 415.

- Cori, O.
En "Bases moleculares de la acción hormonal" (1976), 11. M. Perreta, J. Minguell & Swaneck, G., eds., Ed. Universitaria, Santiago.
- Cori, O.
Phytochemistry (1983), 22, 331.
- Cori, O., Chayet, L., Pérez, L.M., Bunton, C. A. & Hachey, D.
J. Org. Chem. (1986), 51, 1310.
- Cori, O., Cardemil, E., Chayet, L., Jabalquinto, A.M., Vicuña, R. & Devés, R.
Ciencia e Investigación (1974), 30, 95.
- Cori, O., Chayet, L., de la Fuente, M., Fernandez, L. A., Hashagen, U., Perez, L. M., Portilla, G., Rojas, C., Sanchez, G. & Vial, M. V.
Mol. Biol. Biochem. Biophys. (1980), 32, 97.
- Cori, O., Chayet, L., Pérez, L. M., Rojas, M. C., Portilla, G., Holuigue, L., Fernández, L. A.
Arch. Biol. Med. Exp. (1981), 14, 129.
- Cramer, F. & Rittersdorf, W.
Tetrahedron (1967), 23, 3015.
- Croteau, R.
Chem. Rev. (1987), 87, 929.
- Croteau, R., Burbott, A.J. & Loomis, W.P.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1973), 50, 1006.
- Croteau, R., Felton, M. & Ronald, R.
Arch. Biochem. Biophys. (1980), 200, 534.
- Croteau, R. & Gundy, A.
Arch. Biochem. Biophys. (1984), 233, 838.
- Croteau, R. & Karp, F.
Arch. Biochem. Biophys. (1977), 179, 257
- Croteau, R. & Karp, F.
a) Arch. Biochem. Biophys. (1979), 198, 523
b) Arch. Biochem. Biophys. (1979), 198, 512
- Croteau, R., Shaskus, J., Cane, D., Saito, A. & Chang, C.
J. Am. Chem. Soc. (1984), 106, 1142.
- Croteau, R., Shaskus, J., Renstrom, B. & Felton, N. H.
Biochemistry (1985), 7077.
- Deno, N.C., Haddon, D.C. & Nowack, E.N.
J. Am. Chem. Soc. (1970), 92, 6691.

- Dixie, V.M., Laskovics, F.M., Noall, W.I. & Foulter, C.D.
J. Org. Chem. (1981), 46, 1967.
- Edmond, J. Popjack, G., Wong, S.H. & Williams, V.P.
J. Biol. Chem. (1971), 246, 6254.
- Eisenthal, R., Cornish-Bowden, A.
Biochem. J. (1974), 139, 715.
- Evans, R., Hanson, J.R. & Nyfels, R.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, (1976), 1214.
- Fiske, C.H. & Subbarow, Y.
J. Biol. Chem. (1925), 66, 375.
- Francis, M.J.D., Banthorpe, D.V. & Le Patourel, G.N.J.
Nature (1970), 228, 1005.
- Fricke, M. & Hart, E.J.
En "Radiation Dosimetry" (1966), 11, 167. (Attix, F.M. & Roesck, W.C. eds). Academic Press, New York.
- Gambliel, H. & Croteau, R.
J. Biol. Chem. (1982), 257, 2335.
J. Biol. Chem. (1984), 259, 740.
- George-Nascimento, C. & Cori, O.
Phytochemistry (1971), 10, 1803.
- Good, N.E., Winget, G.D., Wilhelmina, W., Connolly, N., Izawa, S., Singh, R.M.
Biochemistry (1966), 5, 467.
- Gunnarson, G., Jonsson, B. & Wennerstron, H.
J. Phys. Chem. (1980), 84, 3114.
- Handbook of Chemistry and Physics
49th ed. (1968), D91. The Chemical Rubber Co. eds. U.S.A.
- Haley, R.C., Miller, J. y Wood, H.C.J.
J. Chem. Soc. (C) (1969), 264.
- Hanes, C.S.
Biochem. J. (1932) 26, 1406.
- Holuigue, L.
Tesis para optar al título de Bioquímico (1980), Universidad de Chile. Santiago.
- IUPAC tentative rules for the nomenclature of Organic Chemistry. J. Org. Chem. (1970), 35, 2849.
- Jabalquinto, A. M. & Cardemil, E.
Biochim. Biophys. Acta (1987), 916 172.

- Job, P.C.
Hebd. Seances Acad. Sci (1933), 196, 181.
- Keffard, J.F. & Chandler, B.V.
"The Chemical Constituents of Citrus fruits" (1970), cap. 11, 92. (Chichester C.O., Mrack E.M. & Stewart G.F. eds). Academic Press New York.
- Kempner, E. S. & Schlegel, W.
Anal. Biochem. (1979), 92, 2.
- Klowwen, M.H., Heide, Ter.
J. Chromatography (1962), 7, 297.
- Kepner, G.R. & Macey, R.I.
Biochem. Biophys. Acta (1963), 163, 180.
- Mayr, H., Forner, W., Schleyer, P.
J. Am. Chem. Soc. (1979), 101, 6032.
- Nakon, R. Krishnamoorthy, C.R.
Science (1983), 221, 749.
- Noat, G., Ricard, J. Borel, M. & Got, C.
Eur. J. Biochem. (1970), 13, 347.
- O'Sullivan, W.J. & Smithers, G.W.
Methods in Enzymol. (1979), 63 294.
- Overton, K.H. & Roberts, F.M.
Biochem. J. (1974a), 144, 585.
- Overton, K.H. & Roberts, F.M.
Phytochemistry (1974b), 13, 2741.
- Pearson, R.G.
J. Chem. Educ. (1987), 64, 561.
Inorg. Chem. (1988), 27, 734.
- Pérez, L.M., Taucher, G. & Cori, O.
Phytochemistry (1980), 19, 183.
- Phillips, R.
Chem. Rev. (1966), 66, 501.
- Phillips, R.C., Phillips, G. & Rutman, R.J.
Biochemistry (1963), 2, 501.
- Popjack, G., Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Rykage, R. & Goodman, D.W.S.
J. Biol. Chem. (1962), 246, 6254.
- Pollard, E.C.
Adv. Biol. Med. Phys. (1953), 3, 153.

- Portilla, G.
Arch. Biol. Med. Exp. (1988), 21, 17.
- Portilla, G. & Rojas, M. C.
Biochem. Int. (1989), 18, 173
- Portilla, G., Rojas, C., Chayet, L. & Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys. (1982), 218, 614.
- Portilla, G., Rojas, M.C., Chiong, E. & Cori, O.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I (1987), 1479.
- Potty, V.H. & Bruemer, J.H.
Phytochemistry (1970), 9, 1001.
- Poulose, A.J. & Croteau, R.
Arch. Biochem. Biophys (1978), 191, 400.
- Poulter, C.D. & Rilling, H.
Acc. Chem. Res. (1978), 11, 307.
- Poulter, C.D. & Satterwhite, D.M.
Biochemistry (1977), 16, 5470.
- Purcell, K. & Kotz, J.
"Química Inorgánica" (1979), cap. 13, 898. Reverté
Barcelona, España.
- Rittersdorf, W. & Cramer, F.
Tetrahedron (1967), 23, 3023.
- Rojas, M. C.
Tesis para optar al título de bioquímico (1975), Universidad de
Chile. Santiago.
- Rojas, M. C., Chayet, L. Portilla, G. & Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys. (1983), 222, 389.
- Rojas, M.C. & Vial, V.
Arch. Biol. Med. Exp. (1988), 21, 25.
- Sanchez, G.
Tesis para optar al título de bioquímico (1979), Universidad
de Chile, Santiago.
- Shine, W.E. & Loomis, W.D.
Phytochemistry (1974), 13, 2095.
- Sigel, H.
Chimia (1987), 41, 11.
- Sigel, H. & Amsler, P.
J. Am. Chem. Soc. (1976), 98, 7390.

- Simonsen, J.L., Barton, D.H.R. & Owen, L.N.
"The Terpenes" (1961), 3, 121. (Billing & Sons Ltd. ed.)
Guildford.
- Stadtman, E., Novelli, G.D. and Lipmann, F.
J. Biol. Chem. (1951), 191, 365.
- Suga, T., Shishibori, T. & Morinaka, H.
J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1980), 167.
- Taqi Khan, M.M. y Martell, A.E.
a) J. Phys. Chem. (1962), 66, 14.
b) J. Am. Chem. Soc. (1962), 84, 3037.
- "The Aldrich library of NMR spectra" 2^a Ed. 2, (1), 138B.
(Charles J. Pouchert ed.)
- Tidd, B.K.
J. Chem. Soc. (B) (1971), 1168.
- Umbreit, W.W., Burnis, R.H. & Sauffer, J.P.
En "Manometric Techniques" (1959), 272. Burgess Publ. Co.,
Minn. U.S.A..
- Valenzuela, P., Beytía, E., Yudelevich, A. & Cori, D.
Arch. Biochem. Biophys. (1966), 113, 536.
- Valenzuela, P. & Cori, D.
Tetrahedron Letters (1967), 32, 3089.
- Vial, M.V., Rojas, M.C., Portilla, G., Chayet, L., Pérez,
L.M., Cori, D. & Bunton, C.A.
Tetrahedron (1981), 37, 2351.
- Warburg, O., Christian, W.
Biochemische Zeitschrift (1941), 310, 384.
- Winstein, S., Valkanas, G. & Wilcox, C.F.
J. Am. Chem. Soc. (1972), 94, 2286.
- Woolf, B. Citado en Allgemeine Chemie der Enzyme por Haldane,
J. B.S. y Stern, K.G. (Dresden y Leipzig, Steinkopff Verlag),
(1932), 119.
- Zeitschel, O.
Chem. Ber. (1906), 39, 1780.

COMMUNICATION

Synthesis of Monoterpene Hydrocarbons from [1-³H] Linalyl Pyrophosphate by Carbocyclase from *Citrus Limonum*¹

GLORIA PORTILLA, M. CECILIA ROJAS, LILIANA CHAYET,
AND OSVALDO CORI²

Departamentos de Química y Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago 1, Chile

Received April 26, 1982

A partially purified enzyme preparation from the flavedo of *Citrus limonum* utilized [1-³H]linalyl pyrophosphate as a substrate for cyclic terpene hydrocarbon formation more efficiently than the pyrophosphates of nerol and geraniol. The products formed from all three substrates are α -pinene, β -pinene, limonene, and γ -terpinene. Neryl and geranyl pyrophosphate inhibit the formation of these products from linalyl pyrophosphate. No free linalyl pyrophosphate could be detected during the enzymatic formation of cyclic terpene hydrocarbons from geranyl pyrophosphate. Mn^{2+} catalyzes the non-enzymatic solvolysis of linalyl pyrophosphate, forming myrcene and ocymenes and no bicyclic hydrocarbons. Linalyl pyrophosphate is a sterically plausible precursor of cyclic hydrocarbons, but the present data support only its role as an alternative substrate and not as an obligatory free intermediate in terpene biosynthesis.

Higher plants synthesize cyclic hydrocarbons like α -pinene, β -pinene, and limonene, from noncyclic precursors. Chemical considerations led to the proposal that NPP,³ the Z isomer of GPP, could be the sole precursor of cyclic monoterpenes since it exhibits the adequate Z conformation required for a 1-6 cyclization (1, 2). This was confirmed in *Pinus* and *Salvia* (3, 4). In other species GPP could be a better substrate than NPP for the hydrocarbon-forming enzymes (carbocyclases)⁴ in the absence of E-Z isomerization (5-8).

¹This work was supported by Grant B-1127 from Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional, Universidad de Chile, by PNUD-UNESCO Programa RLA-78-024, and by NSF-CONICYT (Chile) in a cooperative program with the University of California, Santa Barbara.

²To whom all correspondence should be addressed.

³Abbreviations used: GPP, geranyl pyrophosphate (C₁₀, 2E); NPP, neryl pyrophosphate (C₁₀, 2Z); LPP, linalyl pyrophosphate (C₁₀, tertiary); GLC, gas-liquid chromatography; Tes, N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid.

⁴The enzyme activity which forms cyclic monoterpene hydrocarbons from noncyclic allylic pyrophos-

phosphate esters, different from the primary products formed by prenyltransferases are intermediates in the biosynthesis of cyclic mono- and sesquiterpenoids (6, 9, 10).

LPP, the tertiary isomer of GPP, has been proposed as a stereochemically plausible precursor of cyclic monoterpenes (5, 8, 11, 12) (Fig. 1). However, this proposal must account for conflicting evidence. Linalool or a phosphorylated derivative appeared as a product in the formation of C₁₀ terpenoids from [4-¹⁴C]isopentenyl pyrophosphate by extracts of orange flavedo (5) but the detected linalool could be well the product of nonenzymatic solvolysis (13-15) catalyzed by Mn^{2+} or Mg^{2+} of the newly formed GPP. Linalool has also been reported to form cyclic prenols

phate esters through the formation of C-C bonds (C-C intramolecular ligase) will be referred to as "carbocyclase" in order to differentiate it from cyclase activities which form C-O-C bonds or generate cyclic prenols (i.e., cineole or α -terpineol). Since no unique relationship between substrates and products has been established, we consider it premature to propose a formal name for the enzyme. Unless explicitly discussed, no assumption is made as to the existence of one or more enzymes in this activity.

0003-9861/82/000000-00\$02.00/0

Copyright © 1982 by Academic Press, Inc.

All rights of reproduction in any form reserved.

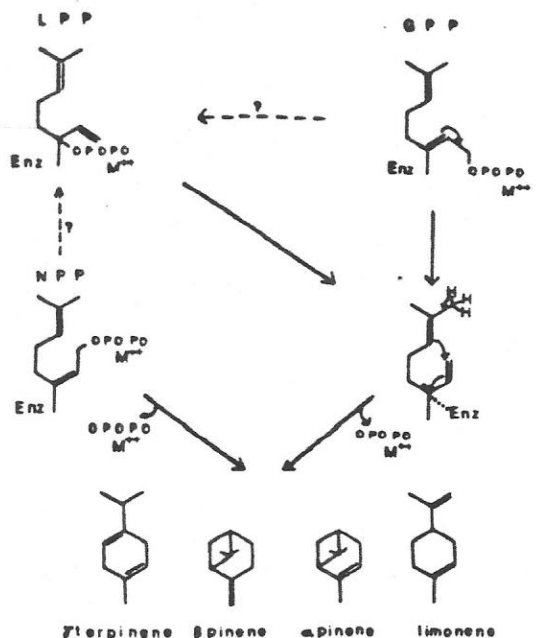


FIG. 1. Participation of allylic substrates in the biosynthesis of cyclic monoterpene hydrocarbons.

in orange vesicles (11). While LPP has been described as a poor substrate for the formation of cineole in *Salvia* (16) it was found to be effective in the formation of α -terpineol and carvone by enzymes from *Mentha* (17) or α - and β -pinenes by an extract from *Salvia* leaves (18). There is no clear-cut evidence as to its role as an intermediate in the biosynthesis of cyclic monoterpenes.

An enzyme preparation from *Citrus limonum* forms cyclic hydrocarbons from GPP and NPP (19). Linalyl monophosphate is not a substrate, but it inhibits this enzyme system (12).

In view of the various reported evidence, we considered it of interest to compare the effectiveness of LPP, GPP, and NPP as substrates of a 55-fold purified carbocyclase from *C. limonum*. This preparation is the most active cyclase described so far (6, 12), and it would enable us to establish kinetic parameters and inhibition patterns.

Since GPP and NPP are solvolyzed in the presence of Mn^{2+} (12, 13, 15) and tertiary compounds are known to be more reactive than their primary isomers, it was necessary to explore the Mn^{2+} catalyzed solvolysis of LPP. A preliminary account of these results has been presented (20).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

[1- 3H]NPP and GPP (sp act, 5.9×10^4 and 2.9×10^4 dpm/nmol, respectively) were prepared as described previously (19).

Tritiated linalool was prepared by rearrangement of [1- 3H]geraniol (21) in 0.05 N acid, followed by separation on Adsorbosil columns eluted with a gradient of ethyl acetate from 1 to 5% (v/v) in hexane.

[1- 3H]LPP (sp act, 6.75×10^4 dpm/nmol) was prepared by phosphorylation of [1- 3H]linalool (22) and purified by preparative TLC on silica gel-H plates (propanol-ammonia-water, 6:3:1, v/v). Enzymatic hydrolysis of synthetic [1- 3H]LPP yielded only linalool as product, as assayed by radio GLC (19, 23). This method would detect contaminants to the extent of less than 1%. The linalool/phosphorus ratio was 2.05.

LPP stored at 4°C in ammonia at pH 10 rearranged to GPP, NPP, and α -terpinyl pyrophosphate to the extent of 4, 2, and less than 1% in 50 days. Linalyl monophosphate did not rearrange under the same conditions.

Carbocyclase from *C. limonum* was purified from

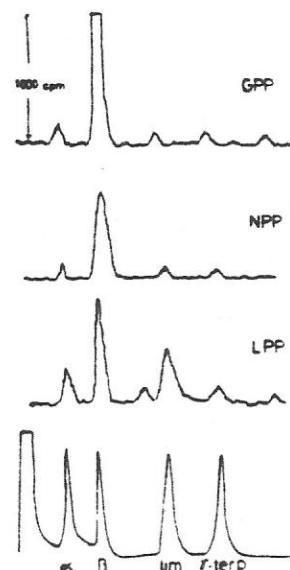


FIG. 2. Formation of radioactive terpene hydrocarbons from different substrates by carbocyclase from *C. limonum*. Experimental conditions as described in text. The hexane extract from an enzymatic incubation mixture was treated with silicic acid to remove oxygenated compounds. After addition of carriers it was injected into a gas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector coupled to a Geiger counter for gaseous phase. Column: (6.25) \times 250 cm. Support: Chromosorb G AW-DMCS. Liquid phase: 0.83% polyethylene glycol adipate. Temperatures: injector, 180°C; column, 50°C; detector, 200°C; geiger tube, 170°C. Counting efficiency for 3H : 15%. Lower tracing: carrier mass peaks; upper tracings: radioactivity. Substrates as indicated.

TABLE I

DISTRIBUTION OF HYDROCARBONS FORMED BY *Citrus* CARBOCYCLASE FROM DIFFERENT SUBSTRATES

Product ^a	Hydrocarbons formed (nm min ⁻¹ mg ⁻¹)		
	8.4 μ M LPP, 1 mM Mn ²⁺	15.4 μ M GPP, 3 mM Mn ²⁺	6 μ M NPP, 3 mM Mn ²⁺
α -Pinene (0.49)	250 (14%)	62 (7%)	18 (8%)
β -Pinene (0.56)	810 (44%)	805 (86%)	130 (79%)
Myrcene ^b (0.79)	100 (5%)	0	0
Limonene (1.00)	450 (25%)	31 (3%)	14 (9%)
γ -Terpinene (1.3)	160 (9%)	33 (3%)	7 (4%)
Ocymenes ^b (1.7)	64 (3%)	9 (1%)	0
Total hydrocarbons	1834	940	164

Note. For assay conditions, see Experimental Procedures. Substrate and Mn²⁺ concentrations were adjusted to obtain maximum initial rates of reaction.

^a Figures in parentheses after the products indicate their relative retention volume referred to limonene. Percentages are indicated as function of total recovered hydrocarbons.

^b From nonenzymatic solvolysis.

a polyethylene glycol preparation (19) by chromatography on DEAE-Sephadex (24).

To obtain initial reaction rates, experiments were carried out for 3.5 min at 30°C in a final volume of 1 ml in 50 mM Tes buffer, pH 7.0, containing 2 mM 2-mercaptoethanol, 1-20 μ g protein/ml (sp act, 2-7 nmol/min/mg), variable amounts of substrates (from 0.5 to 80 μ M) and Mn²⁺ (0-30 mM). Reaction was quenched by cooling to 0°C and vigorous stirring with 2 ml hexane. Radioactivity in the hexane extract was analyzed for total products and for hydrocarbons. (19).

After addition of carriers, the products were identified by GLC in a gas chromatograph directly coupled to a Geiger counter for gaseous sample (radio-GLC) (5, 19). The concentration of hydrocarbons was estimated from the area under the radioactivity tracings and comparison with known amounts of radioactive standards. Results were corrected for the nonenzymatic solvolysis of the substrates (15).

In some experiments, the aqueous phase remaining

after extraction of hydrocarbons and alcohols was analyzed for phosphorylated compounds. It was treated with Chelex in order to remove bivalent metal ions and the phosphorylated compounds remaining in the aqueous phase were hydrolyzed for 9 min in the presence of 5 mM Mg²⁺ with calf phosphomonoesterase which contains pyrophosphohydrolases. After addition of carriers, the resulting alcohols were extracted and analyzed by radio-GLC. Under these conditions the nonenzymatic solvolysis of GPP was at most 0.2%.

RESULTS

Carbocyclase from *C. limonum* catalyzed the formation from [1-³H]LPP of a mixture of terpenes tentatively identified as α -pinene, β -pinene, γ -terpinene and limonene which was qualitatively the same as that formed from GPP or NPP (Fig. 2 and Table I).

LPP was a better substrate for total hydrocarbon formation than NPP and GPP (Table II) although

TABLE II

KINETIC PARAMETERS OF CARBOCYCLASE FROM *C. limonum*

Substrate (μ M)	Mn ²⁺ (mM)	K _m (μ M)	V (nmol/ml min mg)	V/K _m (min ⁻¹ mg ⁻¹)	I ₅₀ for LPP (μ M)
NPP (0.25-3.0)	3	1.0	0.1	0.1	6
GPP (0.9-8.0)	3	2.9	0.72	0.25	8.5
LPP (0.25-44.0)	1	0.4	1.10	2.75	—

the relative activity with this substrate varied from preparation to preparation. Concentrations of LPP of $13 \cdot K_m$ or higher were not inhibitory, in contrast with GPP and NPP which inhibited carbocyclase at concentrations above 5 and $6 \cdot K_m$, respectively (24).

Nonradioactive GPP or NPP diminished the formation of radioactive hydrocarbons from $[1\text{-}^3\text{H}]\text{LPP}$ at saturating concentrations. However, the product of the total disintegrations per minute in hydrocarbons and concentration of unlabeled substrate was not constant, as could be expected from simple isotope dilution of saturating radioactive substrate (25).

The effectiveness of GPP and NPP as inhibitors (Table II), with I_{50} values (12) comparable to their K_m values, suggests that a single carbocyclase may bind primary or tertiary substrates at the same catalytic site.

Phosphomonoesters of geraniol, nerol, and linalool, which are not substrates for *Citrus* carbocyclase (12) inhibited the formation of hydrocarbons from LPP with I_{50} values between 40 and $100 \mu\text{M}$. The pyrophosphate group is essential for the enzyme-ligand interaction, since NPP and GPP were more effective inhibitors of LPP cyclase than the monophosphates.

With LPP as substrate, carbocyclase exhibited an absolute requirement for Mn^{2+} . Reaction rate reached a maximum at 0.9 mM Mn^{2+} without inhibitory effect at metal concentrations up to 30 mM . This differs from the effect observed with GPP or NPP (19).

Limonene and γ -terpinene were an important fraction of the hydrocarbons formed from LPP, while the fraction of β -pinene formed was smaller than with the primary substrates (Table I).

As reported for NPP and GPP (12, 15), nonenzymatic solvolysis of LPP at pH 7.0 was catalyzed by Mn^{2+} with a rate constant of $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ at 30°C , i.e., about 40 times the rate for GPP or NPP (15). With 0.9 mM Mn^{2+} the rate increased as a linear function of substrate concentration, whereas the rate of the enzyme-catalyzed reaction exhibited Michaelis-Menten kinetics.

The hydrocarbons formed in this nonenzymatic reaction were myrcene (51%), ocymenes (44%), and limonene (5%). No bicyclic hydrocarbons were detected. Whereas the total amount of hydrocarbons formed nonenzymatically increased with LPP and Mn^{2+} concentration, product distribution was independent of these variables. As a consequence of this nonenzymatic process, substrate and metal concentrations as well as enzyme specific activity, become crucial variables in any study of the participation of LPP in terpene biosynthesis.

The amount of noncyclic terpenes formed in the presence of carbocyclase with concentrations of LPP of $40 K_m$ was much larger than reported in Table I. It approached the proportion observed in the nonenzymatic controls, exceeding the bicyclic products formed by carbocyclase. This distortion was partic-

ularly apparent when the enzyme had a low activity. The acyclic terpenes formed by *Salvia* carbocyclase (18) could be attributed to metal catalyzed solvolysis of the substrate, even in the presence of enzyme.

In order to detect the formation of LPP as an intermediate in hydrocarbon biosynthesis from GPP, carbocyclase ($12\text{--}40 \mu\text{g}$) was incubated with $15 \mu\text{M}$ GPP for intervals of 8 to 40 min. After quenching the reaction and extracting alcohols and hydrocarbons, the aqueous phase was analyzed for phosphorylated compounds. This analysis showed that the amount of radioactivity cochromatographing with linalool ($70\text{--}100 \text{ cpm}$) was $0.07\text{--}0.2\%$ of the radioactivity found in geraniol and was the same as that found when GPP incubated with boiled carbocyclase was analyzed. This result demonstrates that no free LPP was formed during the enzymatic conversion of GPP to cyclic hydrocarbons.

The results presented show that LPP is an effective substrate for cyclic terpene hydrocarbon biosynthesis by carbocyclase from *C. limonum*. The varying effectiveness of LPP with various enzyme preparations suggests the existence of several carbocyclases whose substrate specificities are not very stringent.

The formation of LPP as an obligate precursor, either free or enzyme bound, of cyclic monoterpenes from GPP is a chemically attractive hypothesis. The facile rotation around its 1-2 single bond (Fig. 1) may bypass some rate-limiting step in the biosynthesis of cyclic hydrocarbons from GPP (12). Nevertheless, LPP has not been detected as a free intermediate in the formation of pinenes by *Salvia* extracts (18) nor in the present report, and its effectiveness as a substrate is not dramatically better than GPP in both cases. Based on existing evidence it can only be considered as a good substrate analog.

The role of tertiary intermediates in terpene biosynthesis may differ according to the origin of the enzymes and to the type of product formed. Nerolidyl pyrophosphate has been reported as a free intermediate in the biosynthesis of cyclonerodiol (9). The present and other data (18) do not support the role of its C_{10} analog, LPP as a free intermediate in the biosynthesis of monoterpenes although it may quite possibly act as an enzyme-bound species.

It is worth pointing out that there is no satisfactory rationale for the lower effectivity of NPP, which is the chemically more plausible substrate for the formation of the $\text{C}_1\text{--C}_6$ ring (12, 21) and which has been identified as a product of prenyltransferase in plant tissues (5, 23). Further studies on the substrate specificity of *Citrus* carbocyclase are in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

Dr. E. Klein, from Dragocco, Holzminden, kindly supplied standards for GLC identification. Mr. Gonzalo Pérez generously furnished *Citrus limonum*

fruits from selected trees. We are very indebted to Miss L. Holuigue for the purification of carbocyclase.

REFERENCES

1. VALENZUELA, P., BEYTÍA, E., CORI, O., AND YUDELEVICH, A. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 536-539.
2. LOOMIS, W. D. (1967) *Terpenoids in Plants* (Fridham, J. B., ed.), pp. 59-82, Academic Press, New York.
3. CORI, O. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 135, 415-418.
4. CROTEAU, R., AND KARP, F. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 257-265.
5. GEORGE-NASCIMENTO, C., AND CORI, O. (1971) *Phytochemistry* 10, 1803-1810.
6. CROTEAU, R., AND KARP, F. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 512-522.
7. BANTHORPE, D. V., EKUNDAYO, O., AND ROWAN, M. G. (1978) *Phytochemistry* 17, 1111-1114.
8. CROTEAU, R., AND FELTON, M. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 207, 460-464.
9. CANE, D. E., IYENGAR, R., AND SHIAO, M. S. (1981) *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 914-931.
10. SCHECHTER, L., AND WEST, C. A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3200-3209.
11. BRUEMMER, J. H. (1975) *Geruch und Geschmacksstoffe* (Drawert, F., ed.), pp. 167-176, Verlag H. Clark, Nuremberg, W. Germany.
12. CORI, O., CHAYET, L., PÉREZ, L. M., DELA FUENTE, M., ROJAS, M. C., PORTILLA, G., AND VIAL, M. V. (1980) *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 32, 97-110.
13. BREMS, D. N., AND RILLING, H. C. (1977) *J. Amer. Chem. Soc.* 99, 8351-8352.
14. GEORGE-NASCIMENTO, C., PONT-LEZICA, R., AND CORI, O. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 119-123.
15. VIAL, M. V., ROJAS, M. C., PORTILLA, G., CHAYET, L., PÉREZ, L. M., CORI, O., AND BUNTON, C. A. (1981) *Tetrahedron* 37, 2351-2357.
16. POULOSE, A. J., AND CROTEAU, R. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 191, 400-411.
17. SUGA, T., SHISHIBORI, T., AND MORINAKA, H. (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 167-168.
18. GAMBLIEL, H., AND CROTEAU, R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2335-2342.
19. CHAYET, L., ROJAS, M. C., CARDEMIL, E., JABALQUINTO, A. M., VICUNA, J. R., AND CORI, O. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 318-327.
20. PORTILLA, G., ROJAS, M. C., AND CORI, O. (1981) Abstracts, Fifth Annual Meeting of the Biochemical Society of Chile, p. 26, Punta de Tralca, Chile.
21. VALENZUELA, P., AND CORI, O. (1967) *Tetrahedron Lett.*, 3089-3094.
22. EDMOND, J., POPJÁK, G., WONG, S. M., AND WILLIAMS, P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6254-6271.
23. BEYTÍA, E., VALENZUELA, P., AND CORI, O. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 346-356.
24. PORTILLA, G., SÁNCHEZ, G., VIAL, M. V., CHAYET, L., ROJAS, M. C., AND CORI, O. (1979) *Arch. Med. Biol. Exp.* 12, 282.
25. KOBAYASHI, Y., AND MAUDSLEY, D. V. (1974) *Biological Applications of Liquid Scintillation Counting*, pp. 144-145, Academic Press, New York.

Secondary plant metabolism and enzyme mechanisms*

Metabolitos secundarios en vegetales y mecanismos de biosíntesis

OSVALDO CORI, GLORIA PORTILLA and LILIANA CHAYET

Laboratorio de Bioquímica General, Departamento de Bioquímica y Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Monoterpene hydrocarbons (C_{10}) are among the simplest secondary metabolites formed by higher plants. Carbocyclases transform open chain allylic pyrophosphate esters into cyclic hydrocarbons with elimination of pyrophosphate. This process is assisted by bivalent cations.

The most reactive molecular species is the substrate $-(M^{2+})_2$ complex. The non enzymic solvolysis of allylic pyrophosphates, catalyzed by bivalent cations exhibits the same stoichiometry.

Carbocyclases are most efficient with the tertiary ester linalylpyrophosphate, but it does not seem to be an obligatory intermediate in the cyclization of geranylpyrophosphate (C_{10} , 2E). The E-Z conformational change required for its cyclization may be explained through the formation of an enzyme bound ion pair, whose carbocation moiety undergoes an *anti* to *syn* conformational change. Methionine and sulfhydryl groups may facilitate this rotation.

Research with cell free systems is an obligatory phase in our understanding of the formation of natural products in plants.

Plants have been known since ancient times to contain a host of substances which have appealed to the senses of Man, like the bright colour of anthocyanines or carotenes, the taste of spices, the odour of essential oils. Sometimes they had medicinal or lethal properties (1,2) and hemlock is better known for the judicial murder of Socrates than for the structure of coniine.

As Chemistry identified substances that could be extracted from plants, the name of "secondary products" was coined for them, trying thus to hide the embarrassing fact that biochemists did not know how to explain the role of these compounds, whose structures are being unravelled at a rate of more than 1000 per year (3).

Secondary products, like terpenoids, alkaloids, tannins, flavonoids, etc., were initially thought to be inert. Their role in the relationship between plant and environ-

ment has been established (4,5) and later findings (4) show that many of these compounds have half lives of days or even hours (Table 1).

TABLE I

Half lives of secondary metabolites in different plants.*

Compound	Species	Half life (h)
Menthone	<i>Mentha piperita</i>	5
Marrubiin	<i>Marrubium vulgare</i>	24
Tomatin	<i>Lycopersicum esculentum</i>	144
Nicotine	<i>Nicotiana tabaccum</i>	22
Ricinine	<i>Ricinus communis (Young plant)</i>	4
Ricinine	<i>Ricinus communis (old plant)</i>	365

* (Adapted from ref. 4)

* La distancia entre nuestra disciplina y la Neurofisiología no permitió que Joaquín Luco fuese nuestro maestro en la ciencia. Pero hemos siempre admirado su integridad y coraje como Hombre Universitario. Podría decirse de él: "In peace there's nothing so becomes a man as modest stillness and humility. But when the blast of war blows in our ears, then imitate the action of a tiger". (Henry V, Act III sc. 1).

The presence of a secondary product in a taxon defines as validly as a morphologic character (6,7), and this is the basis of chemosystematics. Chemical composition of a plant is genetically conditioned (6,7) but there are examples of habitat influences (5,7).

The pattern of volatile products of a graft does not change to the pattern of the rootstock species (9). The enzymes necessary to form specific secondary products are present in the scion and are not influenced by the rootstock.

The presence of a given set of enzymes is a necessary but not the sole condition for a chemical character to be of systematic value: the products must accumulate in the plant. This requires the existence of storage loci in the cell, resistance to biological effects of the secondary product and other factors (6). The biochemist should be aware that the biosynthetic potential of a plant is often much larger than indicated by the actual presence of secondary products (6,10). Permeability barriers, compartmentation of enzymes and competing pathways have set the limit of incorporation of labelled precursors into intact plants to an almost unsurpassable 0.01 to 1% (3,11). It follows that only experiments with cell free systems or purified enzymes may give insight into the mechanisms of the biosynthesis of secondary products.

Comparatively simple secondary products are found in the essential oils formed by higher plants. These are mixtures of volatile compounds, which in contrast with the fatty oils, may be recovered by steam distillation. The most important components are mono and sesquiterpene hydrocarbons and alcohols. (C_{10} and C_{15}). These compounds belong to the numerous family of the terpenoids, molecules derived from isoprene (C_5H_8).

Except for isoprene itself (12), the simplest terpenoids are the monoterpene hydrocarbons $C_{10}H_{16}$, found most notoriously in conifers, and some 50 families of flowering plants (13). They may be acyclic

(ocymene, myrcene) monocyclic (limonene, γ -terpinene) or bicyclic (the pinenes), camphene, sabinene) (Fig. 1).

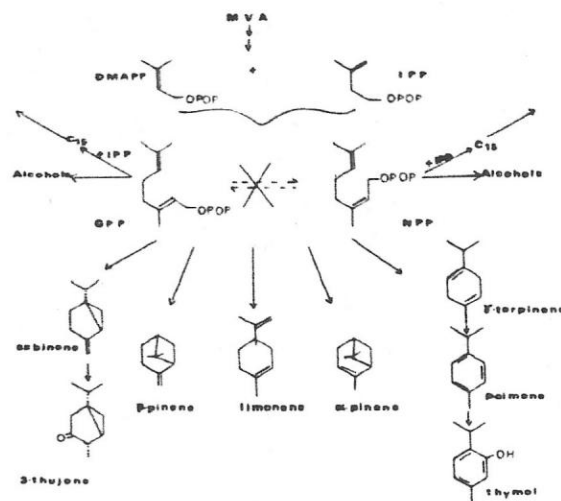


Fig. 1: Biosynthetic routes of monoterpene formation.

Enzyme reactions follow chemically well established pathways, and "biogenetic" mechanisms have been formulated to explain the biosynthesis of natural products (16), but direct enzyme work remains scarce. Difficulties encountered in the handling of enzymes, in the chemical synthesis of radioactive substrates and the identification of labelled products in nanomole quantities has caused this apparently simple problem to keep several research groups busy for almost two decades (14,17-20). The study of models has contributed to a deeper understanding of the enzyme reactions involved (19, 21-23).

In the isoprenoid pathway, mevalonic acid (MVA)* is transformed into two isomeric C_5 pyrophosphates, IPP and DMAPP (Fig. 1). The latter loses its POP group and condenses with IPP generating the isomeric C_{10} pyrophosphates GPP and NPP in a reaction catalysed by prenyltransferases (5,21). These allylic C_{10} pyrophosphates or LPP are transformed into cyclic monoterpene hydrocarbons by carbocyclases (5, 14, 15) (Figs. 1 and 2).

* The abbreviations used are: MVA, Mevalonic acid (C_6); IPP, Isopentenyl pyrophosphate (C_5); DMAPP, Dimethylallyl pyrophosphate (C_5); GPP, Geranyl pyrophosphate ($2E, C_{10}$); NPP, Neryl pyrophosphate ($2Z, C_{10}$); LPP, Linalyl pyrophosphate (C_{10} , tertiary); POP, Inorganic pyrophosphate.

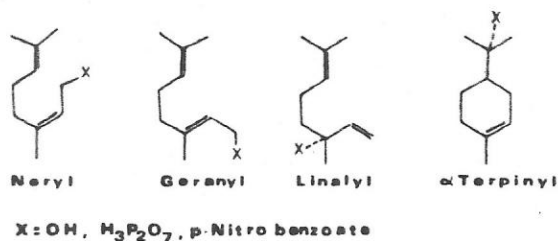


Fig. 2: Structures of C₁₀ allylic derivatives.

The present account summarizes our points of view and experimental contributions to the knowledge of the monoterpene forming enzymes from *Pinus* and *Citrus*.

Phosphorylated Precursors

The biosynthesis of monoterpenes requires the existence of a C₁₀ precursor, NPP or GPP (5). They are formed from MVA or from IPP + DMAPP by enzyme preparations from *Pinus* and *Citrus* (17,24,25). Both isomers are equally effective precursors of cyclic monoterpene hydrocarbons for carbocyclases from *Citrus sinensis* and *Citrus limonum* (15,25) as well as for enzymes from other plant sources (13,18,19). Enzymes from *Pinus radiata* or from *Salvia officinalis* form cyclic hydrocarbons exclusively from NPP (18,19,26) while carbocyclases from other sources utilize preferentially GPP (18,19).

Due to the Z conformation of NPP its role as precursor of cyclic products is structurally self evident but the E conformation of GPP precludes its cyclization to occur before undergoing some structural changes (11,17,27,28).

Formation of NPP through direct E-Z isomerization of GPP has been conclusively excluded in cell free systems (13,15,19,25) as well as the participation of a redox isomerization of E to Z alcohols as the source of NPP (29,30). No free intermediates of GPP utilization have been isolated even in multistep cyclization reactions such as the formation of fenchol and bornyl pyrophosphate (18,19).

Linalyl Pyrophosphate and Carbocyclases

With these factual limitations, the only rationale to account for the conversion of GPP into cyclic products is through intermediates with the steric requirements for cyclization, i. e. Z conformation or low hindrance to rotation around the C₂-C₃ bond (Fig. 3) The tertiary isomer LPP may adopt the *syn* conformation adequate to form a 1-6 bond. Linalool has been found in essential oils from *Citrus* and it is formed by enzymes from *Citrus sinensis* from MVA or IPP as precursors (20,25).

A partially purified preparation of carbocyclase from *Citrus limonum* forms cyclic hydrocarbons from [1-³H] allylic pyrophosphates (15) and LPP is the most efficiently utilized substrate under initial rate conditions (31). The products α pinene, limonene, β pinene and γ terpinene, are the same for all three substrates. Similar results have been obtained in *Salvia* (32). It should be stressed that no free LPP could be detected when monoterpenes were formed from [1-³H] GPP (31,32). This differs from the formation of cyclonerodiol from 2E,6E farnesylpyrophosphate (C₁₅) in fungi, where the tertiary C₁₅ isomer nerolidylpyrophosphate is a free intermediate (22).

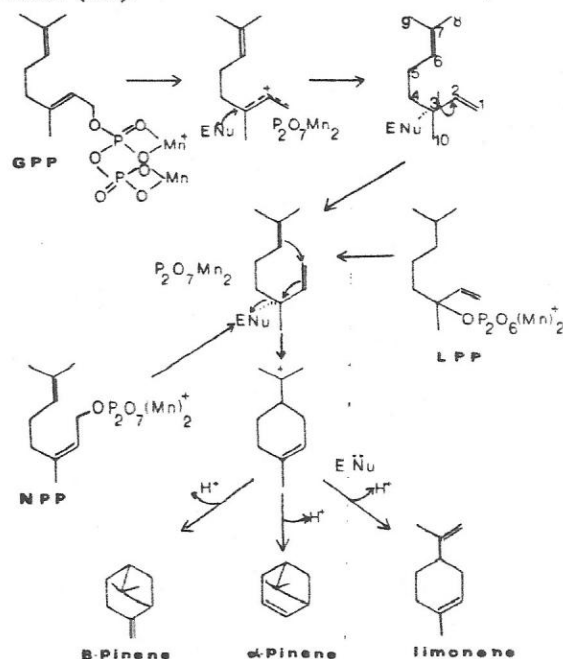


Fig. 3: Mechanisms of the formation of monoterpene hydrocarbons from allylic pyrophosphate esters.

Although LPP may be an effective substrate analogue, its role as an obligatory free intermediate is not demonstrated, nor is it formed directly from C_5 precursors by partially purified prenyltransferases (30,33). Finally, some carbocyclase preparations utilize GPP, but not LPP (31).

As a consequence, the only alternative to explain the formation of a cyclohexanoid ring from GPP would be through an enzyme bound carbocation or ion pair resembling a linalyl cation (Fig. 3). Neutralization of the negative charges of the POP leaving group would be mediated by bivalent cations (15,31). Assistance by enzyme nucleophiles (34) would delocalize the positive charge and permit rotation around the C_2-C_3 bond (14,15). The known properties of carbocyclases and of biomimetic systems (15,19,31,35) are consistent with this view.

Properties of Carbocyclases

Carbocyclases have been described in several higher plants (14,15,18,19,26,32). The highest specific activity obtained is of the order of 4–5 nmoles of hydrocarbons/min/mg protein in the enzyme from *C. limonum**.

All carbocyclases are inhibited by sulfhydryl group reagents (19). The enzyme from *C. limonum* is reversibly inactivated by para-chloromercuribenzoate or 5,5'-dithiobis(nitrobenzoate) (15,34). These data and the inflections of the pH curve at the values of 5.6 and 7.5 point to the participation of cysteinyl groups (15). About 30% of the titratable SH groups of the protein react with benzyl bromide. Their reaction is not prevented by the presence of the Mn^{2+} complexes of GPP and NPP which afford effective protection of carbocyclase activity. This suggests that the nucleophile involved may be methionine, and that cysteine although essential, does not participate in the catalytic process (34). Methionine would form with the substrate a sufficiently labile sulfonium ion to allow breakdown to hydrocarbons.

* M.C. Rojas, L. Chayet and G. Portilla – Unpublished results.

Substrates, Products and Inhibitors

With few exceptions (19,26) carbocyclases utilize two or three isomeric allylic pyrophosphates as substrates and form several hydrocarbons. Dissociation patterns of substrate specificity suggest that more than one enzyme may be involved. Aged carbocyclases from *C. limonum* lose their ability to utilize NPP, but retain their full activity with GPP (14). This is scarcely compatible with the existence of a single enzyme and also rules out a sequential process in which GPP is converted to NPP to form hydrocarbons.

The use of substrate analogs as inhibitors of carbocyclase shows that the pyrophosphate group is paramount for enzyme recognition. The organic pyrophosphates are more effective inhibitors than the corresponding monophosphates, which are known not to be substrates (14). Inorganic di- and tri phosphates are very ineffective inhibitors. The allylic character of the ligand is not required if the molecule has other potentially binding features such as the isopropylidene group: The C_{10} analog citronellyl pyrophosphate which does not have an allylic structure is an inhibitor ($I_{0.5} = 6 \times K_m$). On the contrary, IPP is far less effective ($I_{0.5} = 600 \times K_m$) than its allylic isomer DMAPP^a ($I_{0.5} = 3-13 \times K_m$).

It is unlikely that a single carbocyclase could form more than one product (15,19,31), since protons must be eliminated from very different regions of the molecule (Fig. 3) Other evidence supports this view: The pattern of terpene composition of essential oils is species specific (36,37) and seasonal and other variations produce changes in product distribution (6,8). Furthermore carbocyclase preparations from *C. limonum* lose their ability to form α pinene, while retaining their ability to form limonene and β pinene (14) and some preparations form exclusively limonene from NPP and all three hydrocarbons from GPP^a). None of these facts can be explained on the basis of a single enzyme.

Bivalent Cations and Mechanism

Carbocyclases require bivalent cations (15,

19,31). Mg^{2+} or Mn^{2+} being the most efficient. We think that the enzyme would be taking advantage of the higher reactivity of the metal-substrate complex. The metal ion in the enzymic reaction would be assisting the leaving of the pyrophosphate group by neutralization of the negative charge (35).

It has been shown that the substrate $-(M^{2+})_2$ complex is the more reactive species in the non enzymic solvolysis of GPP and NPP catalyzed by metal ions (35, 38).

In the metal catalyzed solvolysis of GPP, the main products are the rearranged tertiary alcohols linalool and α terpineol, plus a small percentage of limonene and acyclic hydrocarbons (35). Thus there is C-O bond fission as in the enzymic reaction, and the most reactive species is GPP $-(Mn^{2+})_2$ (35). Both the rates of GPP solvolysis and of the carbocyclase reaction are function of the concentration of the GPP- $(Mn^{2+})_2$ complex (Fig. 4A, 4B). Esti-

mation of the different GPP- Mg^{2+} species^a) from the data of Croteau for bornyl-POP synthetase (39) shows a good correlation between reaction rate and the concentration of the GPP- $(Mg^{2+})_2$ complex. This may be a general characteristic of carbocyclase reactions.

Allylic monophosphate esters are not substrates of carbocyclase and their non enzymic solvolysis is retarded by Mn^{2+} (14,35). Elimination of the leaving group requires the presence of the allylic bond: the 2-3 saturated analog citronellyl pyrophosphate is not a substrate (14) and its solvolysis is only slightly accelerated by Mn^{2+} (35).

The menthane skeleton is formed by the regiospecific (and probably stereospecific) elimination of a proton from the cyclic terpinyl cation. In nonenzymic solvolysis of linalyl p-nitrobenzoate, protons are preferentially eliminated from C₆ to form terpinolene although a smaller amount of limonene is formed through elimination from C₉ (40). Although both carbon atoms may lose their protons, carbocyclases from different sources form either one or the other hydrocarbon (15,18,19). The enzyme from *C. limonum* eliminates a proton from only one position to form limonene (Fig. 3).

There are no models for the formation of bicyclic monoterpene hydrocarbons in aqueous solution (35,41,42). In the carbocyclase reaction the pinane ring could be formed directly from a neryl like cation, a process which is enthalpically favoured over the formation from a monocyclic molecule (23,43).

Carbocyclases and Prenyltransferases

The mechanism of carbocyclases may be considered the intramolecular counterpart of the 1'-4 alkylation reaction catalyzed by vertebrate prenyltransferases (14,21,44, 45). In this reaction, an allylic pyrophosphate (GPP, DMAPP etc.) and IPP are rigidly bound to the enzyme. The geometry is buttressed by the binding of two Mg^{2+} atoms to the enzyme-substrate complex (21,46). The allylic substrate forms a highly structured carbocation-pyrophosphate

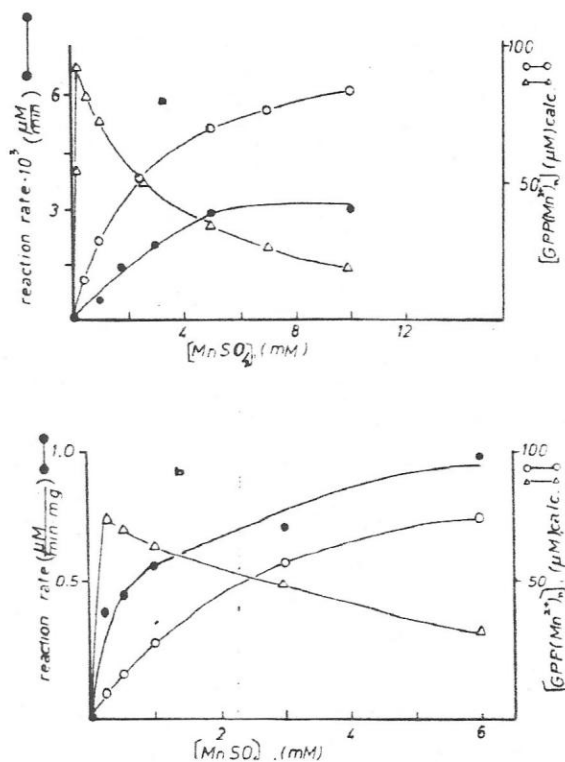


Fig. 4: Effect of manganese on the enzymic and non enzymic reactions of geranylpyrophosphate. A: Mn^{2+} catalyzed solvolysis; B: Carbocyclase reaction; $\bullet - \bullet$: rate of hydrocarbon formation; $\Delta - \Delta$: Concentration of the GPP- Mn^{2+} species; $\circ - \circ$: Concentration of the GPP- $(Mn^{2+})_2$ species.

ion pair. The positive charge on C₁ is attacked by the olefinic bond of IPP with inversion of configuration at the primary carbon (45). A new carbocation with five more carbon atoms is thus formed. The pyrophosphate leaving group being the sole unhindered base may remove the 2 pro-R proton (21,45,46) and thus form the final product (Fig. 5A).

The alkylation catalyzed by carbocyclases (Fig. 5B) resembles the condensation reaction just described, but being intramolecular, it must have some different features. If the substrate is NPP or LPP, then cyclization may proceed through a highly structured ion pair, as in prenylsynthetase. If GPP is the substrate, the ion pair must be rather loose to permit rotation around the C₂-C₃ bond from the anti to the syn conformation (14). In model cyclization reactions, there is inversion of configuration of the prochiral protons at C₁ (47).

Stoichiometry of carbocyclase and of non enzymic solvolysis is of two Mn²⁺ bound per pyrophosphate group, whereas in prenyltransferase the ratio is 2:2. The role of metal in prenyltransferase is to anchor the two condensing moieties (allylic substrate plus IPP) through their pyrophosphate groups. On the other hand the 2:1 stoichiometry in carbocyclase neutralizes more effectively the negative charges of the pyrophosphate leaving group. The end product may be formed specifically only if the base which eliminates the proton has a very precise location. It is difficult to conceive how a "non anchored" base like the leaving pyrophosphate group could take different positions to eliminate a proton from C₉, from C₄ or from C₁₀ to form limonene, α pinene or β pinene respectively (14,15). This process requires an adequately located base at the active site, to make each carbocyclase product specific (14,15).

The hydrophobic microenvironment at the active site may stabilize the ion pair. The longer half life of the intermediate allows the rotation required to form a cyclic product from an E precursor. Non enzymic experiments in non polar or non nucleophilic media (48-51) show the formation of up to 70% of cyclic products from E precursors, as opposed to solvolysis

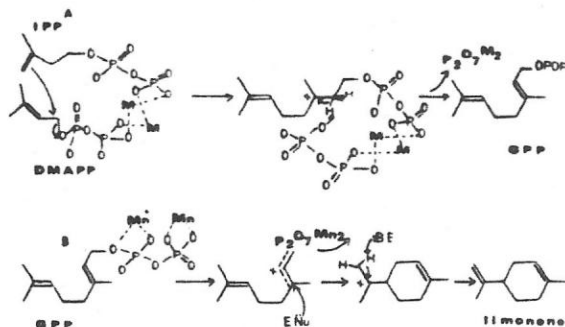


Fig. 5: Comparison of the mechanisms of prenyltransferase (A) and carbocyclase (B).

or rearrangements in dilute acids (27,28, 41).

Comparison of the two mechanisms offers a rationale for further studies on carbocyclases, which are far less accessible to mechanistic research than animal prenyltransferases.

Fate and Functions of Monoterpenes

Monoterpene hydrocarbons are not terminal products, although there is evidence that they do not interconvert (37). Oxygenated functional groups are introduced to form other odoriferous substances such as tymol, verbenol, menthol, thujone etc. (5,11,18,19) (Fig.1). Such substances may have communication functions with potential symbionts or may be deterrents or poisons for predators (5,52). Their metabolic fate is still not well established, although it is known that they are synthesized and broken down (18,53). They may constitute carbon reserves accesible only to the plant itself or to symbiotic organisms. Utilization of monoterpenes by microorganisms (54) may be a link of such a biological cycle (4, 5).

The study of the biosynthesis of "secondary products" offers a common and challenging ground to the organic chemist, the enzymologist and the biologist. In more complicated molecules like the alkaloids "enzyme work is very scarce" (55). One may speculate whether enzymic exploration of the biosynthetic potential of a plant tissue (6,10) cannot lead to the discovery of compounds not yet isolated by the natural products chemist and thus allow us to

harness the ingenuity of the most astounding synthetic chemist: The plant cell.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work cited in this review was financially supported by Departamento de Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile (Proy. B-1127), by PNUD/UNESCO (Proy. 7/82) and by NSF (USA)-CONICYT (Chile). The authors are very indebted to Dr. M. Cecilia Rojas for her interest in this work and for allowing us to quote her unpublished results.

REFERENCES

- OVIDIUS NASON, P. (7) *Metamorphosis* XI, 610.
- SHAKESPEARE, W. (1605) *Hamlet* 1-5-62.
- SCOTT, A.I., *Science* 184: 760-764, 1974.
- SEIGLER, D., PRICE, P.W., *Amer. Nat.* 110:101-104, 1976.
- MANN, I. *Secondary Metabolism*. Oxford, Clarendon Press, 1978.
- HEGNAUER, R. En *Secondary Metabolism and Coevolution* (Luckner, H.A., Mothes, K., Nover, L., Ed.) Nova Acta Leopoldina, Supp. 7. Detische Akademie der Naturforscher, Leopoldina, Halle, 1976, pp. 45-46.
- LAWRENCE, B.M. *A study of monoterpene interrelationship in the genus Mentha with special reference to the origin of pulegone and menthofuran*. Doct. Sci. Thesis, Rijsuniversiteit Te Groningen. Ont. Canada, Print Three Inc. Hamilton, 1978.
- GRANGER, R., PASSET, I., *Phytochemistry* 18: 1683-1691, 1973.
- HEFENDEHL, F.W., *Zeitschr. f. Pflanzphysiol.* 57: 310-316, 1967.
- VELIKI, I.A., *Phytochemistry II*: 1405-1406, 1972.
- LOOMIS, W.D. In *Terpenoids in plants* (Pridham, J.B., Ed.) New York, Academic Press, 1967, pp. 59-82.
- RASMUSSEN R.A., *Environmental Science Technol.* 4: 667-671, 1970.
- BANTHORPE, D.V., CHARLWOOD, B.V. In *Encyclopedia of plant physiology*, New Series (Bell, E.A., Charlwood, B.V., Eds.) Berlin, Springer Verlag, 1980 Vol. 8, pp. 185-220.
- CORI, O., CHAYET, L., PEREZ, L.M., DE LA FUENTE, M., ROJAS, M.C., PORTILLA, G. VIAL, M.V., *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 32: 97-110, 1980.
- CHAYET, L., ROJAS, M.C., CARDEMIL, E., JABALQUINTO, A.M., VICUÑA, J.R., CORI, O., *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 318-327, 1977.
- RUZICKA, L., *Experientia* 9: 357-367, 1953.
- VALENZUELA, P., BEYTIA, E., CORI, O., YUDELEVICH, A., *Arch. Biochem. Biophys.* 113:536-539, 1966.
- LOOMIS, W.D., CROTEAU, R. In *The Biochemistry of Plants* (Stumpf, P.K. Ed.) New York, Academic Press, 1980, Vol. 4, pp. 363-418.
- CROTEAU, R. In *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (Porter, J.W., Spurgeon, S.L. Eds.) New York, John Wiley and Sons, Inc. 1981, pp. 227-282.
- BRUEMMER, J.H. In *Geruch- und Geschmacksstoffe* (Drawert, F., Ed.) Nurnberg, Verlag H. Clark, 1975, pp. 167-174.
- POULTER, C.D., RILLING, H.C. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds* (Porter, J.W., Spurgeon, S.L., Eds.) New York, John Wiley and Sons, Inc., 1981, vol. 1, pp. 162-224.
- CANE, D.E. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds* (Porter, J.W., Spurgeon, S.L. Eds.) New York, John Wiley and Sons, Inc., 1981, Vol. 1, pp. 284-374.
- BUNTON, C.A., CORI, O. *Interciencia* 3: 291-297, 1978.
- BEYTIA, E. VALENZUELA, P., CORI, O. *Arch. Biochem. Biophys.* 129: 346-356, 1969.
- GEORGE-NASCIMENTO, C., CORI, O., *Phytochemistry* 10: 1803-1810, 1971.
- CORI, O., *Arch. Biochem. Biophys.* 135: 416-418, 1969.
- ZEITSCHEL, O., *Chem. Ber.* 39: 1780-1793, 1906.
- VALENZUELA, P., CORI, O., *Tetrahedron Lett.* 3089-3094, 1967.
- ANASTASIS, P., FREER, I., GILMORE, CH., MACKIE, H., OVERTON, K., SWANSON, S., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 268-270, 1982.
- DE LA FUENTE, M., PEREZ, L.M., HASHAGEN, U., CHAYET, L., ROJAS, M.C., PORTILLA, G., CORI, O., *Phytochemistry* 20: 1551-1557, 1981.
- PORTILLA, G., ROJAS, M.C., CHAYET, L., CORI, O., *Arch. Biochem. Biophys.* in press, 1982.
- GAMBLIEL, H., CROTEAU, R., *J. Biol. Chem.* 257: 2335-2342, 1982.
- DE LA FUENTE, M., *Estudio de la biosíntesis in vitro de precursores de hidrocarburos terpénicos*. Tesis de Doctorado Facultad de Ciencias - Universidad de Chile. 1976.
- CORI, O., CHAYET, L., PEREZ, L.M., ROJAS, M.C., PORTILLA, G., HOLUIGUE, L., FERNANDEZ, L.A., *Arch. Biol. Med. Exp.* 14: 129-137, 1981.
- VIAL, M.V., ROJAS, M.C., PORTILLA, G., CHAYET, L., PEREZ, L.M., CORI, O., BUNTON, C.A., *Tetrahedron.* 37: 2351-2357, 1981.
- VON RUDLOFF, E., *Biochem. System. Ecol.* 2: 131-167, 1975.
- VALENZUELA, P., CORI, O., YUDELEVICH, A., *Phytochemistry* 5: 1005-1011, 1966.
- BREMS, D.N., RILLING, H.C., *J. Am. Chem. Soc.* 99: 8351-8352, 1977.
- CROTEAU, R., KARP, F., *Arch. Biochem. Biophys.* 198: 512-522, 1979.
- WINSTEIN, S., VALKANAS, G., WILCOX, C.F., *J. Am. Chem. Soc.* 94: 2286-2290, 1972.
- BUNTON, C.A., CORI, O., HASHEY, D., LERESCHE, J.P., *J. Org. Chem.* 44: 3238-3244, 1979.
- BUNTON, C.A., LERESCHE, J.P., HASHEY, D., *Tetrahedron Lett.* 2431-2434, 1972.
- GASCOIGNE, R.M., *J. Chem. Soc.* 876-881, 1958.
- CROTEAU, R., KARP, F., *Arch. Biochem. Biophys.* 184: 77-86, 1977.
- POPJAK, G., CORNFORTH, J.W., *Biochem. J.* 101: 553-568, 1966.
- POULTER, C.D., RILLING, H.C., *Accounts Chem. Res.* 11: 307-313, 1978.
- KING, C.H.R., POULTER, C.D., *J. Am. Chem. Soc.* 104: 1413-1420, 1982.
- MILLER, J.A., WOOD, H.C.S., *Angew. Chem.* 76: 301, 1964.

49. GUTSCHE, C.D., MAYCOCK, J.R., CHANG, C.T., *Tetrahedron* 24: 859-876, 1968.
50. MC CORMICK, J.P., BARTON, D.L., *Tetrahedron* 34: 325-330, 1978.
51. STEVENS, K.L., JURD, L., MANNERS, G., *Tetrahedron* 28: 1939-1944, 1972.
52. CHAVARAS, C., *Mundo Científico* 2: 616-628, 1982.
53. SUKHOV, G.V., *Radioisotopes Sci. Res., Proc. Internat. Conf. Paris, 4*: 535-547, 1958.
54. DEVI, J.R., BHATTACHARYA, P.K., *Indian J. Biochem. Biophys.* 14: 288-291, 1977.
55. LEETE, E., In *Biosynthesis, a specialist periodical report* (Bullock, J.D., Ed.) London. The Royal Soc. of Chem., Burlington House, 1976. vol. 4, pp. 97-98.

Hydrolysis of Bismetallic Complexes of Linalyldiphosphate and their Participation in the Biosynthesis of Cyclic Monoterpenes

Gloria Portilla, M. Cecilia Rojas, Evaristo Chiong, and Osvaldo Cori*

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

The allylic diphosphate ester linalyldiphosphate forms mono- and bis-metallic complexes with Mg^{2+} and Mn^{2+} . Complexes of the trianion of the ligand are 50 to 100 times more stable than those of the dianion. Mg^{2+} and Mn^{2+} are bound in the monometallic complex 10^3 and 10^4 times more strongly than in the bismetallic species.

The rate constant of the uncatalysed hydrolysis of linalyldiphosphate at pH 7.0 is $1.2 \times 10^4 s^{-1}$, which is higher than reported values for the primary diphosphates. Mg^{2+} and Mn^{2+} affect its rate of hydrolysis and it is shown that the rate enhancement observed is a function of the concentration of the bismetallic complexes.

The rate of cyclic terpene hydrocarbon biosynthesis catalysed by carbocyclase from *Citrus limonum* also correlates with the concentration of the bismetallic complexes.

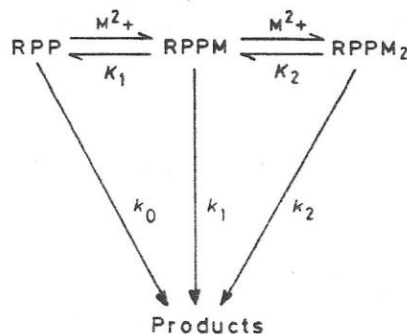
Linalyl monophosphate, which is not a substrate for carbocyclase hydrolyses at a rate proportional to the concentration of the monometallic complex of Mn^{2+} . The neutral charge of this complex, as opposed to the positively charged bismetallic complex of linalyl diphosphate may be an explanation of the absence of utilization of this complex as a substrate.

It appears from the data presented and from previous evidence that bismetallic complexes of allylic diphosphates are the most reactive species in their hydrolysis and the only reactive species in the enzymic cyclization of these precursors of monoterpenes.

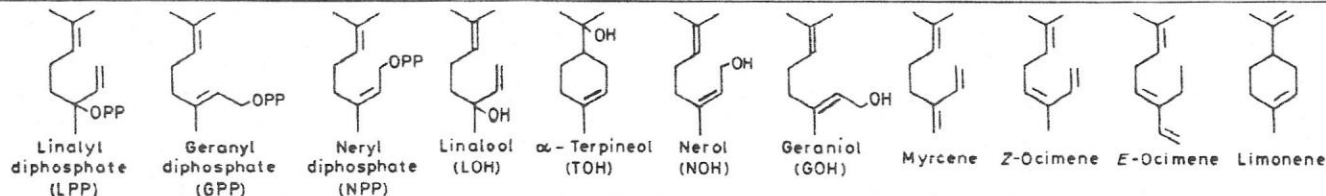
Cyclic monoterpenes such as limonene, α -pinene and β -pinene are formed in plant tissues from geranyldiphosphate (GPP)[†] and neryldiphosphate (NPP) by enzymes called carbocyclases.^{1,2} As opposed to NPP whose structure permits cyclization, direct participation of GPP is not obvious³ due to its *E* conformation.[‡] In view of this steric restriction and as *E-Z* isomerization of GPP has been discarded,⁴ the tertiary isomer, linalyl diphosphate (LPP), has been postulated as a stereochemically plausible intermediate,⁴⁻⁷ and it has been found to be an efficient substrate for carbocyclases.⁸⁻¹⁰ However, evidence for its formation in plant tissues is not conclusive. Thus, although linalool has been obtained in some biosynthetic experiments,^{4,6} this could be an artifact due to the non-enzymic solvolysis catalysed by Mn^{2+} or Mg^{2+} of GPP newly formed through prenyltransferase activity.^{11,12} Furthermore, as opposed to the primary diphosphates GPP and NPP which are formed in plant tissues¹³⁻¹⁵ the role of LPP as a free intermediate in the formation of cyclic hydrocarbons has not been confirmed. When GPP was incubated with carbocyclase from *C. limonum*⁸ or with enzymes from *Salvia*,¹⁶ LPP was not detected in the reaction media, suggesting that LPP if formed, could be a tightly enzyme-bound intermediate.

The mechanism of these cyclizations has been visualized as an intramolecular alkylation of remote double bonds by allylic diphosphate esters¹⁷⁻¹⁹ with allylic carbocations or possibly ion pairs as intermediates.²⁰

The electrophile studied in model reactions has been most frequently the hydronium ion,^{21,22} but it has also been shown that bivalent metals catalyse the solvolysis of NPP or GPP at neutral pH^{11,12} to form cyclic and non-cyclic alcohols and hydrocarbons. It was established that the most reactive complex is the bismetallic complex $RPPM_2^+$, and thus solvolysis may occur according to Scheme 1.



Scheme 1. k_0 , k_1 and k_2 are kinetic constants for the solvolysis of the allylic diphosphate RPP and its mono- and bis-metallic complexes RPPM and RPPM₂ respectively. K_1 and K_2 are dissociation constants for the species involved.



[†] TES = *N*-Tris(hydroxyethyl)-2-aminoethanesulphonic acid; DMAP = dimethylallyl monophosphate; IP = isopentenyl monophosphate; LP = linalyl monophosphate; FP = farnesyl monophosphate; RPP = free allylic diphosphate ($RPPH^{2-} + RPP^{3-}$); RPPM = monometallic complex ($RPPHM + RPPM^-$) of allylic diphosphates; RPPM₂ = bismetallic complex of allylic diphosphate ($RPPM_2^+$); K_1 , K_2 = dissociation constants of the mono- and bis-metallic complex respectively.

[‡] *E* and *Z* isomers shall be referred to as diastereoisomers differing in 'conformation' according to IUPAC specifications (*J. Org. Chem.*, 1970, **35**, 2849).

All carbocyclases require bivalent cations and their true substrates are also the bis-metallic complexes of NPP and GPP.^{23,24}

In several reports enzymic hydrocarbon formation from total LPP is comparable and often better than from GPP or NPP.⁸⁻¹⁰

In order to extend the picture of the enzymic formation of cyclic monoterpenes, it was deemed necessary to compare the participation of bivalent cations in the solvolytic reaction of LPP with its participation in the biosynthetic process. It seemed also important to study the hydrolysis of the monophosphate LP, which is not a substrate and inhibits carbocyclase very ineffectively.¹⁸

The present communication reports dissociation and rate constants of metal complexes of allylic ligands obtained by potentiometric and kinetic procedures and evaluates the possible role of LPP-metal complexes in hydrocarbon biosynthesis by carbocyclases from *Citrus limonum*.

Experimental Procedures

Synthesis of Substrates and Solvolysis.—[1-³H]-LPP, [1-³H]-LP, [1-³H]-NPP, and [1-³H]-GPP (specific activity 1.7 × 10⁷, 3.5 × 10⁷, 12.5 × 10⁷ and 6.7 × 10⁷ d.p.m./μmol respectively) were prepared by phosphorylation of the corresponding labelled alcohols as described previously.^{8,25} Unlabelled LPP was prepared from commercial (±)-linalool (Dragoco). It was first purified from the phosphorylation mixture in a silica gel 60 column with a linear gradient of propanol-ammonia-water from 12:3:0 to 6:3:1 (v/v). Then it was crystallized with LiCl and the precipitate was washed 4 times with acetone and diethyl ether at -20 °C. After this procedure the sparingly soluble LPP-Li salt was resuspended in water, and the Li⁺ exchanged by Na⁺ in Chellex column with distilled water elution. LPP Na was stored at 4 °C in NaOH at pH 10 or as a dried powder at -20 °C. 60 MHz N.m.r. shows the signals expected for LPP.²⁶ The enzymic hydrolysis with *E. Coli* alkaline phosphatase and apyrase yielded only linalool as product, as assayed by g.l.c. The linalool: phosphorus ratio was 2.05. Unlabelled primary substrates were prepared in a similar fashion.

[1-³H]-LPP and [1-³H]-LP hydrolysis was performed in glass-stoppered tubes at 30 and 40 °C respectively in a total volume of 1 ml of 0.1M TES-HCl buffer pH 7.0. Incubations were carried out in the presence of variable concentrations of MnSO₄ or MgSO₄. Unless otherwise stated, [³H]-LPP and [³H]-LP concentrations were 15 × 10⁻⁶M or 38 × 10⁻⁶M respectively.

The reaction was stopped by cooling the tubes to 0 °C and vigorous shaking with light petroleum (b.p. 40–60 °C; 2 ml). This procedure extracts more than 99% of hydrocarbons and alcohols.¹ Radioactivity of this hexane phase was measured by conventional β-scintillation spectrometry and the products were analysed by radio-g.l.c.⁸

Determination of Rate and Dissociation Constants.—(a) *Potentiometric measurements.* The pK_a of allylic phosphates and the K_{diss.} of the monometallic complexes RPPHM, RPPM⁻, RPHM⁺, RPM were determined by potentiometric titration at 25 °C in 0.1M KCl and under nitrogen. The amount of substrate hydrolysed was controlled and in the range 3–10% at the end of the experiment. K_{diss.} Of the metallic complexes were calculated from pH differences in the titration curves of LPP obtained in the absence and in the presence of equimolar concentrations of metal. A rise of pH above 7.0 in the presence of Mn²⁺ must be avoided, since hydroxocomplexes interfere with the titration.²⁷

An apparent K_{diss.} (K₁) for pH 7.0 was calculated with K_{diss.} values (K_{RPPM}, K_{RPPHM}) obtained for the different ionic species of the complexes, according to equations (1) and (2).

$$K_1 = \frac{([RPPH^{2-}] + [RPP^{3-}])([M^{2+}])}{[RPPHM] + [RPPM^-]} \quad (1)$$

$$K_1 = \frac{[H^+]/K_a + 1}{K_{RPPM} + \frac{K_{RPPHM}[H^+]}{K_a}} \quad (2)$$

Dissociation constants were compared in some cases with those obtained by hydroxyquinoline titration.²⁸

(b) *Kinetic determinations.*—The observed rate constants k_w are expressed as k_w = k₀ [LPP] + k₁ [LPPM] + k₂ [LPPM₂]. The rate constant k₁ was determined at metal concentrations where all substrate was complexed as the monometallic species.

The kinetic rate constant k₂ for the bismetallic complexes LPPM₂ and the dissociation constant K₂ were obtained by computer simulation of the rate data according to equation (3)²⁴ which may be linearized to equation (4).

$$k_w = \frac{k_1 K_2 + k_2 [M^{2+}]}{K_2 + [M^{2+}]} \quad (3)$$

$$(k_w - k_1) = \frac{(k_2 - k_1) \cdot [M^{2+}]}{K_2 + [M^{2+}]} \quad (4)$$

The contribution of free LPP to the observed rate can be neglected due to the low value of K₁, which makes free LPP negligible even at low metal concentrations.

Enzymic Assay.—LPP carbocyclase was assayed in 0.1M TES (pH 7.0) at 30 °C, in the presence of variable concentrations of [1-³H]-LPP and of Mn²⁺ or Mg²⁺. Incubations were carried out for 3 to 5 min to avoid non-enzymic solvolysis of the substrate, in the presence of 0.1 units of partially purified carbocyclase, obtained from the flavedo of *Citrus limonum*.²³ One unit is defined as the amount of enzyme which forms 1 nmol of terpene hydrocarbons per minute at saturating concentrations of substrate.

The reaction was stopped by cooling the tubes to 0 °C and the aqueous phase was extracted with hexane. Radioactive hydrocarbons were determined in this fraction by scintillation spectrometry after adsorption of the radioactive alcohols on silicic acid.¹

All enzymic initial rates were determined under conditions in which less than 5% of the substrate had been transformed to total products (LOH, LP, and hydrocarbons). This minimizes substrate drainage by phosphatase.

Results and Discussion

Ionization Constants.—The pK_a value of LPPH²⁻ as determined by potentiometric titration in 0.1M KCl was 6.75. It extrapolated to 6.85 at zero ionic strength. As reported for adenosine phosphate esters,²⁹ the pK_a of LPPH²⁻ levels off to 6.2 at 0.6M ionic strength. The pK_a for the primary diphosphates NPP and GPP were also determined and compared with the values for other prenyl phosphates (Table 1). The results show that the organic moiety has little influence on the ionization of the uncomplexed phosphate and diphosphate groups. Metal binding increases the acidity of the last ionizable proton and also introduces marked differences in the pK_a values of the complexes of isomeric diphosphates. Mn²⁺ has a greater affect than Mg²⁺.

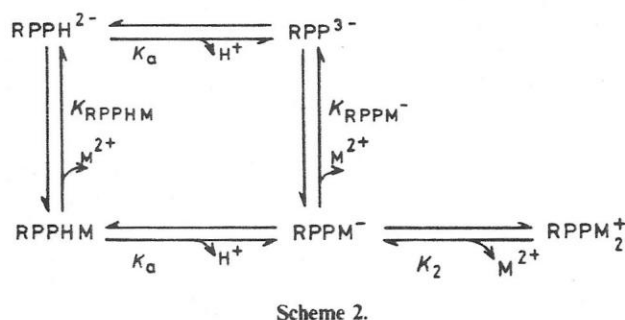
Dissociation Constants.—Scheme 2 represents the binding of bivalent cations to differently protonated ligand species. The

Table 1. Acid dissociation constants (25 °C, 0.1M KCl) of $RPPH^{2-}$: $RPPH^{2-} \rightleftharpoons RPP^{3-} + H^+$ and $RPPHM$: $RPPHM \rightleftharpoons RPPM^- + H^+$

	pK_a		
		Mg^{2+}	Mn^{2+}
LPP	6.75	5.01	4.7
GPP	6.55	5.8	4.4
NPP	6.35	4.6	3.6
LP	6.75		5.7
IP ^a	6.8		
DMAP ^a	6.5		

^a From B. K. Tidd, *J. Chem. Soc. B*, 1971, 1168.**Table 2.** Dissociation constants for $RPPHM$, $RPPM^-$ and RPM

$RPPM^{2+}$	$K_{RPPHM} \times 10^5/M$	$K_{RPPM^-} \times 10^5/M$
$LPPMg^{2+}$	470	8.5
$LPPMn^{2+}$	370	3.3
$GPPMg^{2+}$	2000	36
$GPPMn^{2+}$	570	4.1
$NPPMg^{2+}$	910	17.5
$NPPMn^{2+}$	1110	1.9
$LPMn^{2+}$	9100	910



values of the dissociation constants of $RPPHM$ to the dianion $RPPH^{2-}$ and $RPPM^-$ to the trianion RPP^{3-} are presented in Table 2. As would be expected, binding of metals by the unprotonated ligands is 50 to 500 times stronger than that of the protonated species. This is within the range reported for ADP complexes.²⁷

The binding of Mn^{2+} to LP is 27 times weaker than to LPP. There was no evidence for the formation of an $LPMg$ complex within the sensitivity of the potentiometric or hydroxyquinoline methods.

In order to compare the dissociation constants K_2 of the bismetallc complexes obtained kinetically at pH 7.0 with the dissociation constants of the monometallc complexes, it was necessary to correct the pH independent values of Table 2. This was done *via* equation (2) (Experimental procedures) and the values thus obtained for pH 7.0 are shown in Table 3. From the pK_a values (Table 1) it may be estimated that at this pH *ca.* 36% of the ligand exists in the form of the dianion $RPPH^{2-}$, which binds only weakly to metal. For this reason, the values of K_1 shown in Table 3 are higher than the dissociation constants of $RPPM^-$ shown in Table 2.

In all cases studied, the dissociation constants of the Mg^{2+} complexes were higher than those of the Mn^{2+} complexes and the bismetallc complexes were much more dissociated than the monometallc complexes.

Uncatalysed Solvolysis of LPP.— $[1-^3H]$ -LPP hydrolysed spontaneously at pH 7.0 and 30 °C with a rate constant $k_0 =$

Table 3. Apparent dissociation constants at pH 7.0

	$K_1 \times 10^5/M$	K_2/M
$LPPMg^{2+}$	13	5
$LPPMn^{2+}$	5.2	0.25
$GPPMg^{2+}$	48 ^a	1.6×10^{-2b}
$GPPMn^{2+}$	5.5 ^a	1.5×10^{-3b}
$NPPMg^{2+}$	21 ^a	0.2
$NPPMn^{2+}$	2.3	0.9
$LPMn^{2+}$	1350	

^a These values for GPP agree with those determined by titration with 8-hydroxyquinoline (ref. 28). ^b From refs. 11 and 24.

Table 4. Rate constants for the hydrolysis of free and complexed allylic phosphate and diphosphate esters. All the kinetic data were obtained at 40 °C and those corresponding to LPP at 30 °C due to the higher reactivity of the latter.

	k_0/s^{-1}	k_1/s^{-1}	k_2/s^{-1}
$LPPMg^{2+}$	1.2×10^{-4}	4.3×10^{-5}	7.7×10^{-4}
$LPPMn^{2+}$	1.2×10^{-4}	1.1×10^{-4}	7.3×10^{-4}
$GPPMg^{2+}$	3.4×10^{-7a}	5.5×10^{-7a}	2.6×10^{-6a}
$GPPMn^{2+}$	3.4×10^{-7a}	3.4×10^{-7a}	1.5×10^{-5a}
$NPPMg^{2+}$	1.0×10^{-6}	1.9×10^{-6a}	1×10^{-5a}
$NPPMn^{2+}$	1.0×10^{-6}	1.2×10^{-5a}	2.1×10^{-4a}
$LPMn^{2+}$	6.3×10^{-6}	1.7×10^{-5}	

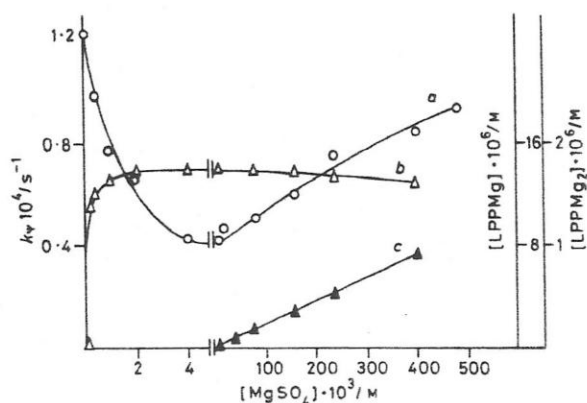
^a From refs. 11 and 24

Figure 1. Relationship between the concentration of Mg^{2+} complexes of LPP and the rate of hydrolysis: $[LPP] = 14.4 \times 10^{-6}M$; 30 °C; a rate constant, k_v ○—○, b $[LPPMg]$ △—△, and c $[LPPMg_2]$ ▲—▲

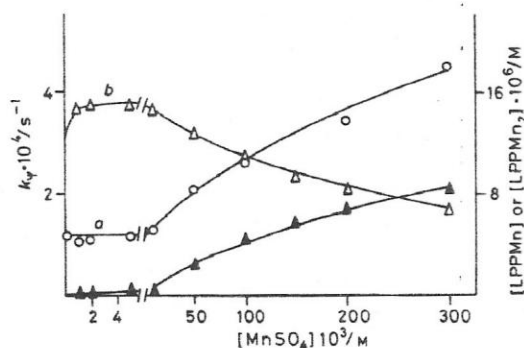


Figure 2. Relationship between the concentration of Mn^{2+} complexes of LPP and the rate of hydrolysis: $[LPP] = 15 \times 10^{-6}M$; 30 °C; a rate constant, k_v ○—○, b $[LPPMn]$ △—△, and c $[LPPMn_2]$ ▲—▲

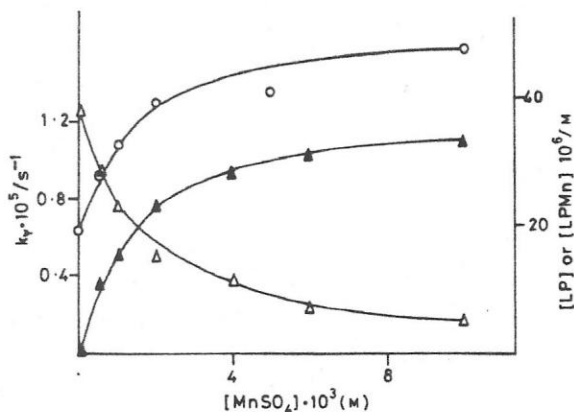


Figure 3. Effect of Mn^{2+} on LP hydrolysis: $[\text{LP}]_{\text{TOT}} = 38 \times 10^{-6} \text{M}$; 40°C : rate constant, k_v ○—○, $[\text{LP}]$ △—△, and $[\text{LPMn}]$ ▲—▲

$1.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ which exceeded the rate constant for its primary isomer GPP by a factor of 500.¹¹

Effect of Mg^{2+} and Mn^{2+} on the Solvolysis of LPP.—The addition of Mg^{2+} or Mn^{2+} modified in different ways the rate of solvolysis of LPP. This is shown in Figures 1 and 2 (left-hand ordinates, curves *a*). The concentration of the mono- and bi-metallic species LPPM and LPPM₂ (right-hand ordinates curves *b* and *c*), were calculated from the apparent dissociation constants listed on Table 3. At Mg^{2+} concentrations close to 4 mM, the LPPMg complex is the predominant species (Figure 1, curve *b*). Its solvolysis rate constant $k_1 = 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ corresponded to the minimum value of k_v of curve *a*. Above 10 mM Mg^{2+} the rate increased with the concentration of the LPPMg₂ (curve *c*).

The LPPMn complex hydrolysed at the same rate as free LPP and it was thus not detected kinetically (Figure 2). Changes in Mn^{2+} concentration between 0 and 5 mM had no effect on LPP hydrolysis although at the latter concentration all the substrate is present as the monometallic species. Rising concentrations of LPPMn₂ was paralleled by an increase in the rate of solvolysis.

Kinetic constants for the solvolysis of free LPP, GPP and NPP and their metallic complexes with Mg^{2+} and Mn^{2+} are summarized in Table 4. The constant for the bismetallic complexes of all three ligands are higher than those for the monometallic complexes, but LPP differs from the primary diphosphates since the rate constants for the monometallic species are lower for LPPM than for the uncomplexed substrate.

Solvolysis of LP.—The effect of metal ions on the hydrolysis of LP was different from their effect on the hydrolysis of LPP. The addition of Mg^{2+} does not alter the rate of reaction of LP. This agrees with the lack of interaction between this ligand and Mg^{2+} . Manganese formed a complex with LP which was 2.7 times more reactive than the free substrate (Figure 3, Table 4). The rate of reaction correlated with the concentration of the complex calculated from K_1 . Since this constant was obtained by potentiometric titration at equimolar concentrations of Mn^{2+} and ligand it reflects the dissociation of LPMn. There is no kinetic evidence for the participation of a bismetallic complex of LP, whose formation would be structurally very unlikely.

The results described, complete the picture for the metal-catalysed hydrolysis of allylic phosphate esters. In this reaction the nature of the leaving group has an influence on the rate, in contrast with the acid catalysed process.²¹

Product Distribution.—LPP and LP were transformed into a mixture of alcohols and hydrocarbons at pH 7.0 in both the

presence and absence of added Mg^{2+} or Mn^{2+} ions (Table 5). Under uncatalysed conditions, substitution products exceeded elimination products by a factor of 4, and non-cyclic products predominated. This differs from the acid-catalysed solvolysis of these substrates where alcohols exceed hydrocarbons by a factor of ca. 40 (Table 5).

In the uncatalysed process at pH 7.0 the amount of cyclic products almost doubled the amount reported for acid hydrolysis, the Mn^{2+} further increased this proportion (Table 5). The amount of hydrocarbons formed from LPP at pH 7.0 (22.0%) was much higher than the percentage formed from NPP of GPP which were 7 and 6% respectively.²⁴

The more stable tertiary ion pair has a longer half-life and thus elimination becomes more significant.

The solvolysis products of LPMn, on the other hand were very similar to those obtained in the absence of metal (Table 5). This points to a greater stabilization of the linalyl cation by the uncharged PPMn₂ leaving group as opposed to $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^-$ or P-Mn⁻. Stabilization of the ion pair due to the different polarity of the leaving group as well as to interactions of metal with double bonds would permit the necessary conformational changes to form cyclic products as well as to prevent water from adding to the cationic moiety of the ion pair.

The results described in this communication and those reported for the metal-catalysed solvolysis of GPP and NPP^{11,24} show a dissociation between the effect of metal on rate of reaction and product distribution. The effect of Mn^{2+} observed on the rate of solvolysis of LPP is smaller than for the primary substrates. The ratios of k_2/k_0 are 6.0, 44 and 233 for LPP, GPP and NPP respectively.^{11,24} On the other hand, the effect of Mn^{2+} on products is similar for the three substrates, and Mn^{2+} favours the formation of the cyclic hydrocarbon limonene as compared with the acid-catalysed reaction by a factor which ranges from 4 for NPP to 18 for GPP and LPP. This could be explained by an interaction of the C-6 double bond with the metal³⁰ leading to a stabilization of intermediates and to the formation of cyclic hydrocarbons.

Metal Specificity of LPP Carbocyclase.—Carbocyclases catalyse the formation of limonene and α - and β -pinene from various non-cyclic allylic diphosphates in the presence of bivalent cations.^{1,2,8}

Reaction rate was compared with the concentration of LPPM and LPPM₂ calculated from K_1 and K_2 at different LPP and metal concentrations. Figures 4 and 5 show that LPPM₂ is the complex utilized by carbocyclase, since the observed enzymic reaction rate correlates only with the concentration of this species.

Rate data obtained for variable LPP concentrations at 3 mM Mn^{2+} and rate data shown in Figure 4 are plotted as a function of the calculated bismetallic complex LPPMn₂. All the data fit a single hyperbolic curve from which the K_m value was obtained. Free metal and LPPMn concentrations are very different for both sets of data suggesting that under these conditions these species are not utilized as substrates nor bound by carbocyclase.

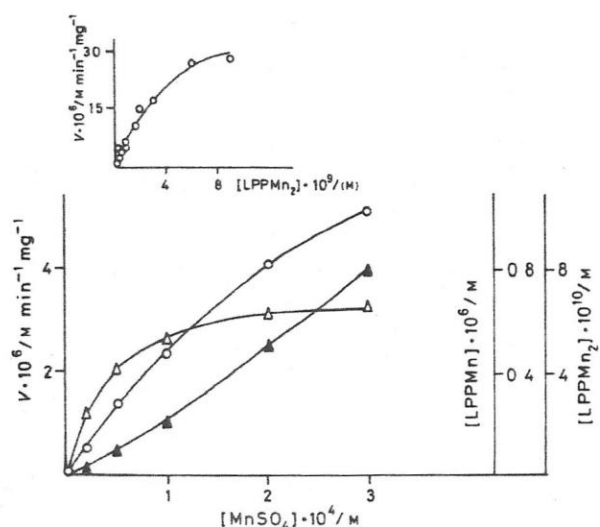
Table 6 shows that the efficiency of carbocyclase (V_{max}/K_m) was highest for the LPPMn₂ complex. LPPMg₂ was utilized with a much lower catalytic efficiency.

The differences in enzymic efficiency between RPPM₂ complexes and total substrate are very large for NPP and LPP (120/1.3 and 11800/81 respectively). On the other hand, it differed only by a factor of 2 for GPP (Table 6). This may be due to the lower K_2 value for the latter substrate, which is mainly in the form of GPPMn₂ in the assay conditions, whereas the more dissociated NPPM₂ and LPPM₂ are present in a much lower proportion.

It is worth stressing that whereas catalytic efficiency (V_{max}/K_m) for GPP is larger than for NPP when referred to

Table 5. Product distribution in LPP and LP hydrolysis

	LPP				LP		
	pH 7.0			pH 0.4 ^a	pH 7.0		
	Uncatalysed	Mg ²⁺	Mn ²⁺		Uncatalysed	Mn ²⁺	pH 0.4 ^a
LOH	37.1	44.9	27.8	59.7	44	41	63.4
TOH	38	41.2	49	23.0	28	36	17.7
GOH	1.9		0.6	11.3	2.5	2.4	11.6
NOH	1.8		0.4	3.3	5.7	4.4	3.9
Myrcene	11	13.8	5.7	0.6	9.8	8.8	0.7
Limonene	1.6		6.2	0.34	1		0.6
(Z) + (E)-Ocimenes	8.6		10.3	1.2	8.7	7.9	1.5
% Alcohols	79	86	77	97.3	80.2	83.8	96.6
% Hydrocarbons	21.3	13.8	22	2.3	19.5	16.7	3.3
% Cyclic products	39.6	41.2	55	23.3	29	36	18.3

^a From ref. 21.**Figure 4.** Relationship between the concentration of Mn²⁺ complexes of LPP and the rate of LPP carbocyclase reaction: [LPP] = 0.77 × 10⁻⁶M; enzymic reaction rate O—O; [LPPMn] Δ—Δ; [LPPMn₂] ▲—▲. Insert: reaction rate as a function of the calculated concentration of the bimetallic complex LPPMn₂. Rate data obtained at variable LPP concentrations are included.

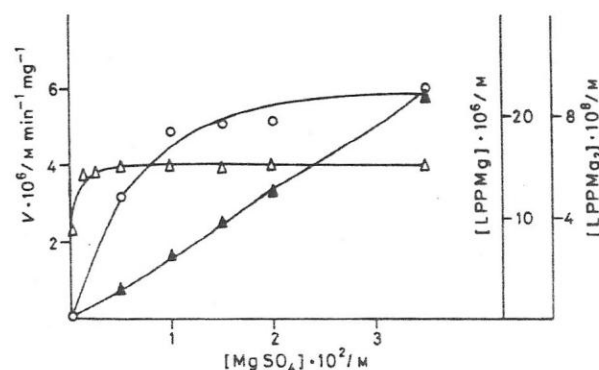
total substrate, the enzyme is more efficient with the NPPM²⁺ complexes than with their *E* isomers. This may have some relevance as to the physiological role of the two isomers *in vivo*.²⁴

It is interesting to point out the extremely low value of K_m of carbocyclase for the LPPMn₂ complex (2.75 × 10⁻⁹M). This very high affinity may be an explanation for the lack of experimental evidence of its formation as a free intermediate from GPPMn₂ to cyclic hydrocarbons.

The data presented show that carbocyclase from *Citrus limonum* utilizes LPP in the form of a bimetallic complex. This stoichiometry seems to be the rule for the enzymic cyclizations and non-enzymic solvolysis reactions of allylic diphosphates. It may also be calculated that bornylpyrophosphate synthetase and α -pinenocyclase from *Salvia officinalis* utilize the same complex.^{2,5} This stoichiometry probably favours the stabilization of an ionic intermediate with an uncharged M₂P₂O₇ leaving group more plausibly than a diphosphate anion. In addition to this higher reactivity of the bimetallic complex, the low K_m of this species points to a tight binding to the enzyme. It could be visualized to occur through adequately positioned

Table 6. Kinetic parameters for RPPM₂ and RPP_{TOT} in the carbocyclase reaction

	K_m/M	$10^6 V_{max}/M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	$V_{max}/K_m / \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$
LPPMn ₂	2.75 × 10 ⁻⁹	32.5	11.800
LPPMg ₂	4.8 × 10 ⁻⁸	7.6	160
NPPMn ₂	1.08 × 10 ⁻⁸	1.3	120
GPPMn ₂	1.4 × 10 ⁻⁶	7.0	5
LPP _{TOT} (Mn ²⁺)	4 × 10 ⁻⁷	32.5	81
NPP _{TOT} (Mn ²⁺)	1 × 10 ⁻⁶	1.3	1.3
GPP _{TOT} (Mn ²⁺)	2.9 × 10 ⁻⁶	7.0	2.4

**Figure 5.** Relationship between the concentration of Mg²⁺ complexes of LPP and the rate of LPP carbocyclase reaction: [LPP] = 15 × 10⁻⁶M; enzymic reaction rate O—O, [LPPMg] Δ—Δ, and [LPPMg₂] ▲—▲

electron donor groups like SH or methionine²³ co-ordinating with both metal atoms. These groups of the enzyme could not efficiently bind the free substrates.

An equivalent interpretation might be that LP-Mn, the monometallic complex, is not utilized as a substrate by these enzymes, although it is chemically more reactive than the uncomplexed species.

A study of metal-catalysed solvolysis of allylic phosphates and diphosphates suggests a rationale for an understanding of carbocyclase mechanisms.

Acknowledgements

This work was submitted by M. E. Chiong as partial fulfillment of the requirements for the title of Químico—Farmacéutico, Universidad de Chile.

This work was partially financed by Grants from D.I.B., Universidad de Chile and FONDECYT, Chile. Mr. Victor Calvo, Facultad de Odontología, Universidad de Chile participated in the early phases of this work.

We thank Dr. M. de la Luz Cárdenas (Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) and Dr. Luz M. Pérez (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile) for valuable suggestions in preparing the manuscript.

References

- 1 L. Chayet, C. Rojas, E. Cardemil, A. M. Jabalquinto, and O. Cori, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, **180**, 318.
- 2 R. Croteau and F. Karp, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, **176**, 734; H. Gambliel and R. Croteau, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 740.
- 3 O. Cori, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, **135**, 416; R. Croteau and F. Karp, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, **198**, 512; R. Croteau, M. Felton, and R. C. Ronald, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, **200**, 534.
- 4 C. George-Nascimento and O. Cori, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 1803.
- 5 J. A. Attaway, A. P. Piereinger, and L. J. Barabos, *Phytochemistry*, 1967, **6**, 25.
- 6 V. M. Potty and J. H. Bruemmer, *Phytochem.*, 1970, **9**, 1229.
- 7 D. E. Cane, A. Saito, M. Felton, J. Shaskus, and R. Croteau, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 5831.
- 8 G. Portilla, M. C. Rojas, L. Chayet, and O. Cori, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, **218**, 614.
- 9 D. V. Banthorpe, P. N. Christon, C. R. Pink, and D. G. Watson, *Phytochem.*, 1983, **22**, 2465.
- 10 R. Croteau and F. Karp, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, **179**, 257.
- 11 M. V. Vial, C. Rojas, G. Portilla, L. Chayet, L. M. Pérez, and O. Cori, *Tetrahedron*, 1981, **37**, 2351.
- 12 D. N. Brems and H. Rilling, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 8351.
- 13 D. Banthorpe, D. Long, and C. Pinck, *Phytochem.*, 1983, **22**, 2459.
- 14 L. M. Pérez, R. Lozada, and O. Cori, *Phytochem.*, 1983, **22**, 431.
- 15 E. Beytia, P. Valenzuela, and O. Cori, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, **129**, 346.
- 16 H. Gambliel and R. Croteau, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 2335.
- 17 C. A. Bunton, J. P. Leresche, and D. Hachey, *Tetrahedron Lett.*, 1972, **24**, 2431.
- 18 O. Cori, L. Chayet, M. De la Fuente, L. A. Fernández, U. Hashagen, L. M. Pérez, G. Portilla, M. C. Rojas, G. Sánchez, and M. V. Vial, *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, 1980, **32**, 97.
- 19 C. D. Poulter and C. R. King, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 1420; V. Jo, Davisson, R. T. Neal, and C. D. Poulter, *ibid.*, 1985, **107**, 5277.
- 20 C. D. Poulter and C. R. King, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 1422.
- 21 F. Cramer and W. Rittersdorf, *Tetrahedron*, 1967, 3015.
- 22 P. Valenzuela and O. Cori, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **32**, 3089.
- 23 M. C. Rojas, L. Chayet, G. Portilla, and O. Cori, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, **222**, 389; O. Cori, G. Portilla, and L. Chayet, *Arch. Biol. Med. Exp.*, 1982, **15**, 357.
- 24 L. Chayet, M. C. Rojas, O. Cori, D. McKenzie, and C. A. Bunton, *Bioorg. Chem.*, 1984, **12**, 329.
- 25 O. Cori and M. C. Rojas, *Methods Enzymol.*, 1984, **110** A, 406.
- 26 Bates *et al.*, in 'NMR Data Tables for Organic Compounds,' ed. Frank Bovey, John Wiley and Sons, New York 1967, vol. I., p. 292 and 608.
- 27 M. H. Taqui Khan and A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 3037; M. H. Taqui Khan and A. E. Martell, *J. Phys. Chem.*, 1962, **66**, 10.
- 28 K. Burton, *Biochem. J.*, 1959, **71**, 388.
- 29 R. Phillips, P. George, and R. Tutman, *Biochemistry*, 1963, **2**, 501.
- 30 R. Benn and A. Rufinske, *Organometallics*, 1985, **4**, 209.

Received 3rd June 1986; Paper 6/1106

Solvolysis of metal complexes of prenyl diphosphates. Its role in monoterpene biosynthesis.

Solvólisis de complejos metálicos de prenil difosfatos.
Su rol en la biosíntesis de monoterpenos.

GLORIA PORTILLA

Laboratorio de Bio-Organica *Profesor Osvaldo Cori*.
Departamento de Química. Facultad de Ciencias Universidad de Chile
Casilla 653 - Santiago - Chile

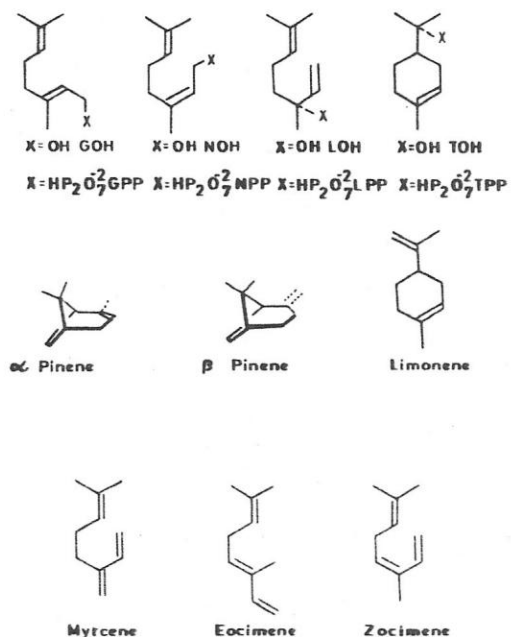
Solvolysis of $[1-^3\text{H}]$ GPP and $[1-^3\text{H}]$ NPP in sodium dodecyl sulfate is enhanced in the presence of Mn^{2+} . Elimination products, hydrocarbons, are favoured as compared with those obtained in water.

In some reactions of the metabolism of terpenes, solvolysis is a competitive process. Evidence is given that alcohols and hydrocarbons formed through a solvolytic reaction could interfere both in the qualitative and quantitative determination of the biosynthetic products.

INTRODUCTION

A wide variety of terpenic compounds constituents of essential oils, are found in the plant kingdom. Among them the major and simpler, with the exception of isoprene C_5H_8 , are monoterpenes (C_{10}). It is possible to find several functional groups such as hydrocarbons $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, alcohols $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{OH}$, aldehydes, ketones, esters, ethers either cyclic or open chain.

The pattern of biosynthesis of these compounds was hypothetically rationalized on the basis of the known chemical structures and reactions well before any biochemical studies were available (1). They would arise through cyclization of nerol, or alternatively of linalool, being the proposed pathways, with some exceptions (2), verified by latter work. Although it must be considered that the amount of monoterpene in a plant in a determined phase of biological cycle is genetically determined (3, 4) and that an enzyme is involved, this enzyme is only catalyzing a chemically feasible reaction. Thus, α - and β -pinene (Scheme I) occur in almost all *Pinus* species while limonene is the major compound in *Citrus limonum* and *Citrus sinensis* (5). On the other hand citronellal is predominant in



Scheme I

Eucalyptus citriodora and 1,8 cineole in *Eucalyptus globulus labilis* (6).

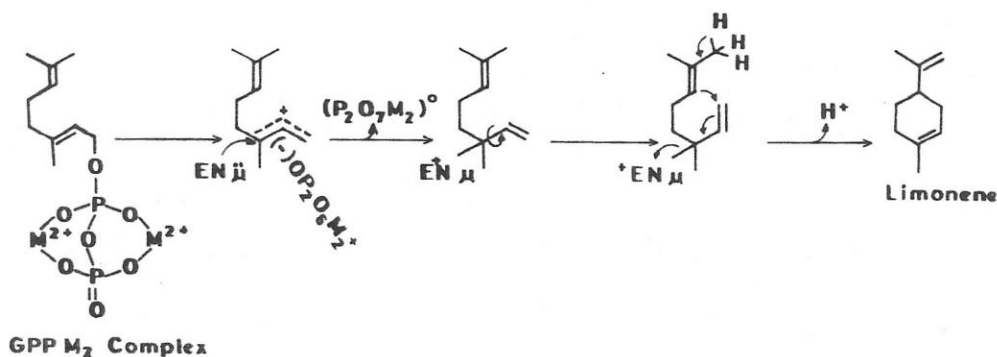
On the basis of the first biosynthetic experiments, neryl diphosphate, NPP, was accepted as the more likely direct precursor for the biosynthesis of cyclic monoterpenoids (7-11). Chemical experiments were in line with those results (12, 13).

Expressing adequately my admiration and affection for and my indebtedness to Osvaldo Cori I find beyond my abilities. He alone can know its extent. Thanks Osvaldo.

During the last fifteen years, however, it has been shown that geranyl diphosphate, GPP, is as good, or even a better substrate than NPP (14-16). Isomerization between them has been excluded (8, 17-19) and no free intermediates have been isolated (20, 21). Conversion of isopentenyl diphosphate, IPP, into GPP, NPP, or higher isoprenoids, is evidenced by the presence of prenyl transferases (22, 23). Cell free extracts from *Citrus sinensis* or *Pinus radiata* seem to have stereospecific prenyl transferases which could generate these two isomers and the corresponding C_{15} isomers (24, 25).

The E conformation of GPP around the C_2-C_3 double bond does not have the appropriate structure for cyclization. The formation of the cyclohexanoid ring from an acyclic precursor requires proximity between C_1-C_6 to form the new bond.

To rationalize this steric problem, a reaction sequence in which the E isomer must be transformed to a suitable intermediate for cyclization was implied (8, 26). A new version is in Scheme II. It must first react with the enzyme with concomitant C-O fission to afford an ionic species or a bound linalyl intermediate. An enzyme bound linalyl structure would permit rotation around the C_2-C_3 bond which enables the GPP precursor to attain the appropriate conformation for cyclization. Carbocyclases from *Citrus limonum* have been described that require bivalent metals which would contribute to this process. Nucleophiles such as cysteine and methionine would stabilize either the ion pair or the linalyl structure (27). LPP is efficiently converted to cyclic compounds either in *Citrus*, *Mentha* or *Salvia* species (21, 28-30).



Scheme II

Biosynthesis of a cyclic hydrocarbon from GPP through an ion pair or a linalyl structure.

Evidence for this stage of terpene metabolism comes from a study of the chemical reactivities of GPP, NPP and of the tertiary derivative LPP. (30-32). Some additional properties of these compounds are here reported.

Experimental procedures

Tritium-labeled $[1-^3H]$ GPP, $[1-^3H]$ NPP and $[1-^3H]$ LPP were prepared by phosphorylation of the corresponding labelled prenyls (33). Sodium dodecyl sulfate, SDS, was recrystallized three times from ethanol. The hydrolysis of the substrates in the presence of Mn^{2+} was performed either in

water or in SDS in glass stoppered tubes in 3×10^{-3} M TES buffer pH 7 or 6.7 at 30° , containing the metal ion at the corresponding pH. The reactions were stopped by adding NaCl, thus disrupting the micelle and vigorous stirring with 2 ml hexane extracted the organic products. The product concentration was estimated as has been described (14, 31).

Carbocyclase was partially purified from the flavedo of *Citrus limonum* and assayed to obtain initial reaction rates for 3.5 min at 30° in 50×10^{-3} M TES buffer pH 7 in a final volume of 1 ml (sp. act, 2-7 nmol/min/mg). Hydrocarbons were separated from prenyls by absorbing the latter on silicic

acid, and were identified by G.L.C. coupled to a gas phase Geiger counter on Apiezon L and $\beta\beta'$ -oxydipropionitrile columns (33).

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical properties of allylic diphosphate:

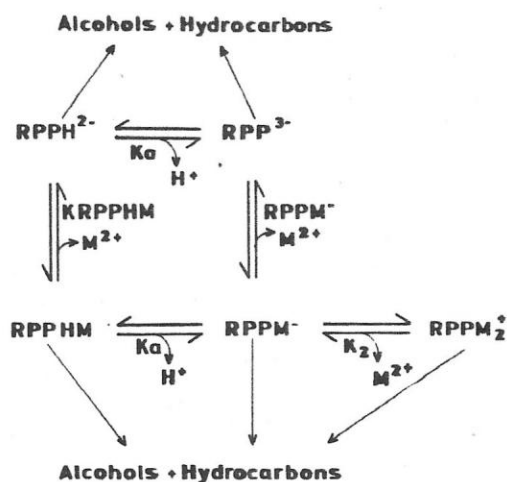
Some of the significant chemical properties of GPP, NPP and LPP are centered on their diphosphate groups and on their allylic character. Allylic esters hydrolyze with C-O bond cleavage by an apparent acid-catalyzed S_N1 mechanism (12, 13). The pK_a value of $GPPH^{2-}$ in 0.1 M KCl is 6.55 and pK_a values of NPP and LPP are in the same range (30). Solutions of these esters are markedly unstable at $pH < 7$, the rate of hydrolysis being pH dependent (30, 32). The dianion is the major component at this pH.

The tertiary allylic diphosphate, LPP, is much more labile at neutral pH than the primary isomers. Its rate constant, $k_0 = 1.2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ at 30° and pH 7, which means that LPP is 67% hydrolyzed in 90 min.

As has been described for farnesyl diphosphate and chrysanthemyl diphosphate (34, 35) bivalent cations such as Mg^{2+} and Mn^{2+} enhance the hydrolysis of these allylic esters at pH 7 with C-O fission. Although monometallic and bismetallic species are formed, the actual reacting species is the bismetallic complex $RPPM_2$ (30-32).

From the pK_a values of $RPPH^{2-}$ it may be estimated that at pH 7 ca. 36% of the esters are in the form of the dianion $RPPH^{2-}$, which binds only weakly to the metal ion. The trianion RPP^{3-} makes an important contribution to the total binding to form the monometallic species. Scheme III includes the reactive species formed on adding bivalent metal ions.

The apparent dissociation constant for $GPP-Mn_2$, $K_{diss} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$, is lower by two orders of magnitude than the respective constants for NPP and LPP. Thus, while GPP predominantly exists as a bismetallic complex, NPP and LPP exist as mono and bismetallic species over a wide range of metal concentration, probably due



Scheme III

Binding of bivalent cations to differently protonated ligand species.

to steric factors which hinder the binding of a second metal ion (36). Considering that an anionic surfactant effectively does not bind negative substrates, such as RPP^{3-} , $RPPH^{2-}$ and $RPPM^-$ but could bind the neutral $RPPHM$ or the bismetallic $RPPM_2$, the solvolysis of these species in SDS was studied.

The dependence of the rate constant of solvolysis of NPP on $[Mn^{2+}]$ in water and in the presence of $30 \times 10^{-3} \text{ M}$ SDS is shown in Fig. 1. In the absence of metal ion the rate constant is the same either in the presence of SDS or in water, but as $[Mn^{2+}]$ increases, the rate constant increases

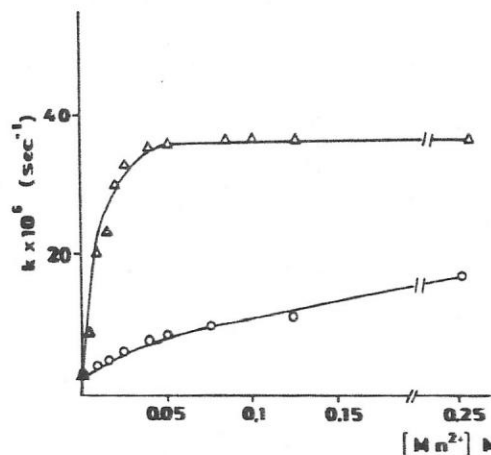


Fig. 1: Mn^{2+} -catalyzed solvolysis of NPP in water O-O and in SDS $30 \times 10^{-3} \text{ M}$ Δ - Δ ; $[NPP] = 2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$.

but only reaches a limiting value in the presence of SDS.

The metallic cation binds very strongly to micellar SDS which will favour formation of neutral or cationic complexes with a prenyl diphosphate, the latter being responsible for the plateau observed. Although GPP behaves similarly to NPP in the absence of metal, with increasing Mn^{2+} concentration saturation is reached in both water and SDS (Fig. 2). If the micelle is only concentrating the components one would expect to reach the same limiting rate constant at high $[Mn^{2+}]$. Therefore it is necessary to explain this kinetic difference.

Table I shows the product distribution obtained in these experiments. For GPP the products are qualitatively and quantitatively essentially the same in the presence and absence of SDS but the percentage of cyclic alcohols and hydrocarbons is greater than from acid catalyzed solvolysis (12-13).

Nevertheless, in SDS for NPP there is a remarkable enhancement of the cyclic hydrocarbons limonene and terpinolene, as compared with reaction in water. From reported data (30) it is possible to calculate that at pH 6.7 $K_{diss} NPPMn = 2.7 \times 10^{-5} M$ and $K_{diss} NPPMn_2 = 0.9 M$. So, in water and at $[Mn^{2+}] = 0.25 M$, only 28% of the substrate is as bismetallic complex, and the

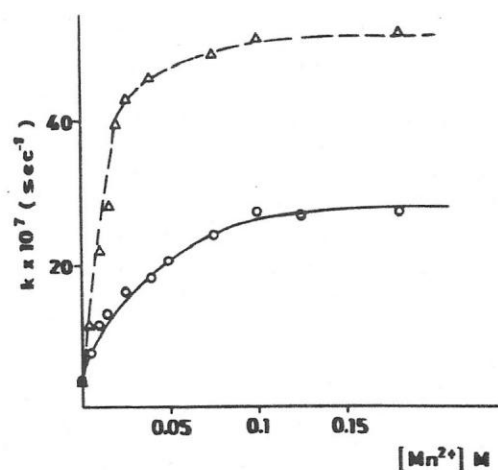


Fig. 2: Mn^{2+} - catalyzed solvolysis of GPP in water O-O and in SDS $30 \times 10^{-3} M$ $\Delta-\Delta$; $[GPP] = 6 \times 10^{-6} M$.

rest is as monometallic complex. In water the products are derived largely from the monometallic species and do not differ considerably from those obtained at acidic or neutral pH. The products obtained in the presence of SDS probably come largely from the bismetallic complex which would favour hydrocarbon formation. In the bismetallic complex the two metal ions are, certainly, diminishing the negative charge of the leaving diphosphate group but, it is possible that at the same time this group may be protecting the cation from water attack and assisting the elimination.

TABLE I

Solvolysis Products of Geranyl and Neryl Diphosphate*

	GPP - water	Mn^{2+} SDS	NPP - water	Mn^{2+} SDS
Alcohols	96	95.2	94.6	75
Hydrocarbons	4	4.5	6.3	23.3
Linalool	72.5	70	16.5	14.3
Terpineol	3.4	3.2	65.8	62
Nerol	-	-	10.3	-
Geraniol	20	22	2	-
Myrcene	1.8	2.1	-	-
Ocymenes	1.1	0.7	-	-
Limonene	0.8	1.0	4.2	17.7
Terpinolene	0.2	0.7	2.1	5.6

* At 25° , $Tes 3 \times 10^{-3} M$ pH 6.7
 $[GPP] = 11 \times 10^{-6} M$ and $[Mn^{2+}] = 40 \times 10^{-3} M$.
 $[NPP] = 14 \times 10^{-6} M$ and $[Mn^{2+}] = 25 \times 10^{-2} M$.
 $[SDS] = 30 \times 10^{-3} M$.

Solvolysis of LPP and its role in the biosynthetic process

The possible intermediacy of linalyl diphosphate in the biosynthesis of cyclic monoterpenes was suggested on the basis of seasonal fluctuation of linalool in *Citrus* species (37). There are several reports of linalool formation from mevalonic acid, or from IPP or GPP (8, 28, 38, 39), but there is also evidence against its participation. A linalyl derivative is formed from [4-¹⁴C] IPP by enzymes from *Citrus sinensis* (8) and from [1-¹⁴C, 1-³H] GPP by enzymes from *Mentha spicata* (39). As shown above and elsewhere (13, 36) the major product of solvolysis of GPP in the presence of bivalent metal ions is linalool. Thus the observed linalool in the biosynthetic process could have been a solvolysis product.

Together with the study of the biosynthesis of cyclic hydrocarbons from LPP in a partially purified enzyme from *Citrus limonum*, we studied the chemical reactivity of LPP in the presence of Mn²⁺ (30). LPP increases its rate of solvolysis 6 fold at 30° in the bimetallic complex ($k_{LPPMn_2} = 7.2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$) which is the true substrate of carbocyclase.

A serious difficulty is presented if this reactivity of LPP is not properly considered. Fig. 3 shows the relationship between the concentration of LPP and the rate of hydrocarbon formation in the reaction catalyzed by carbocyclase, and in its absence. As the substrate concentration increases, the enzymatic reaction rate

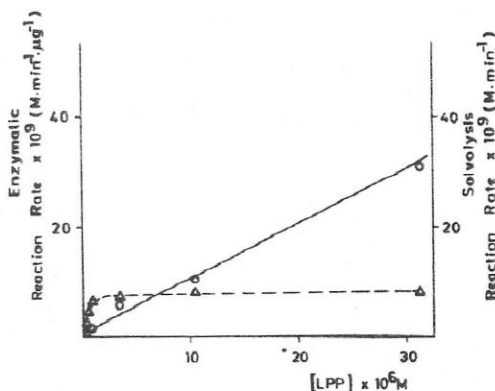


Fig. 3: Effect of the concentration of LPP over the rate of LPP carbocyclase reaction $\Delta-\Delta$ and the rate of solvolysis of LPP O-O. $[Mn^{2+}] = 9 \times 10^{-4} \text{ M}$.

reaches a typical saturation value, and the non enzymatic reaction rate continues to increase.

The formation of hydrocarbons at two different points of the plot is shown in Fig. 4. At $[LPP] = 0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (Fig. 4(A)), α and β -pinene, limonene and γ -terpinene are obtained whereas, at $[LPP] = 31.8 \times 10^{-6} \text{ M}$ (Fig. 4(B)) there are, in addition, myrcene and ocimenes, the latter coming from solvolysis of LPP (Fig. 4C). Similar artefacts could be obtained if the reaction is prolonged beyond 10 min or if the enzymatic activity is too low. It is possible that these "unusual effects" were not perceived in the experiments performed with enzymes from *Salvia officinalis* (29).

Although the preferential incorporation sequence LPP>GPP>NPP into some cyclic monoterpenes in cell-free extracts is an

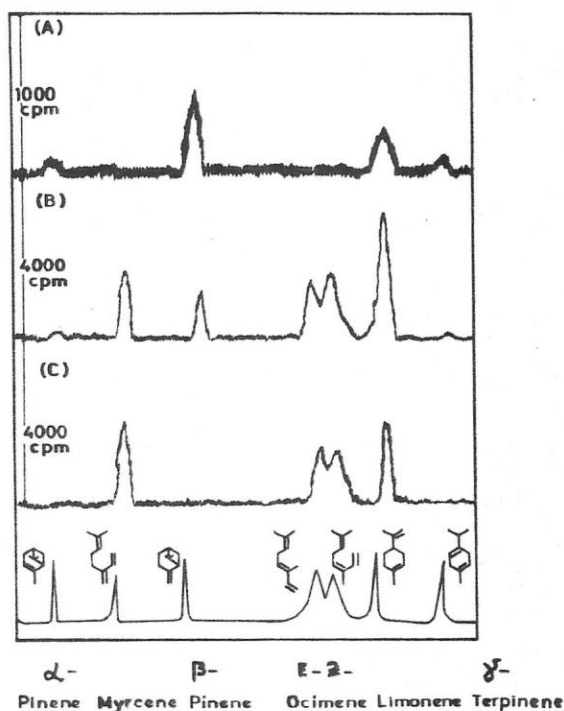


Fig. 4: Hydrocarbon formation from [1-³H] GPP by carbocyclase from *Citrus limonum* and by non enzymatic solvolysis at 3,5 min and 30°. The upper tracings indicate response of the radioactivity monitored by means of an attached gas-phase Geiger counter, whereas the smooth lower tracings indicate response to coinjected standards detected by GLC.

(A) Carbocyclase reaction at $[LPP] = 0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$

(B) Carbocyclase reaction at $[LPP] = 30 \times 10^{-6} \text{ M}$

(C) Non enzymatic solvolysis at $[LPP] = 30 \times 10^{-6} \text{ M}$

argument for the role of LPP as a precursor, the evidence is not conclusive. On the one hand LPP may be a good alternative substrate, and on the other, LOH that in some occasions has been detected in vitro, may emerge from solvolysis of GPP and not necessarily from LPP.

The nature of the direct precursor of the LOH biosynthesized by some higher plants is not known. Should GPP be the precursor then, besides an isomerization to LPP with subsequent hydrolysis by phosphatases (cleavage of O-P), there may be other explanations of its formation: attack by water at the allylic center of GPP with departure of the diphosphate group as in an S_N2' reaction or through a cationic or ion pair mechanism.

Abbreviations used: (See Scheme I)

GPP	: Geranyl diphosphate	$C_{10} \Delta^2 E, \Delta^6$
NPP	: Neryl diphosphate	$C_{10} \Delta^2 Z, \Delta^6$
LPP	: Linalyl diphosphate	$C_{10} \Delta^1, \Delta^6$
RPP	: Free allylic diphosphate	
RPPM	: Monometallic complex of allylic diphosphates	
RPPM ₂	: Bismetalllic complex of allylic diphosphates	
GOH	: Geraniol	
NOH	: Nerol	
LOH	: Linalool	
TOH	: α -Terpineol	
SDS	: Sodium dodecyl sulfate	
TES	: N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid.	

ACKNOWLEDGMENTS

The work described was financed by FONDECYT, Chile and Departamento Técnico de Investigación. Universidad de Chile. The author is very indebted to Professor C.A. Bunton (University of California, Santa Bárbara) for his interest and criticism of some experiments.

REFERENCES

1. RUZCICKA, L.; ESCHENMOSER, A. and HEUSER, H. (1953) *Experientia* 9: 357.
2. BANTHORPE, D.V. and CHARLWOOD, B.V. (1980) In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series (Bell, E.A. and Charlwood, B.V., eds.) Vol. 8 pp. 185-220. Springer.
3. HEFENDEHL, F.W.; MURRAY, M.J. (1976) *LLoydia* 39: 39.
4. LAWRENCE, B.M. (1978) Doctoral Thesis Rijksuniversiteit te Groningen. Print Three, Hamilton, Ontario, Canada.
5. KEFFORD, J.F. and CHANDLER, B.V. (1970) In the Chemical Constituents of Citrus Fruits, *Advances in Food Research*. Supplement 2. (Chichester C.O., Mraz E.M. and Stewart G.F., eds) pp. 93. Academic Press, London.
6. JAJAM, J. (1974-1976) *Anales Fac. Cienc. Quim. U. Chile*. 26-28: 115.
7. LOOMIS, W.D. (1967) In *Terpenoids in Plants* (Pridham, J.B., ed.) pp. 59-82. Academic Press, New York.
8. GEORGE-MASCIMENTO, C. and Cori, O. (1971) *Phytochemistry* 10: 1803.
9. BANTHORPE, D.V., EKUNDAYO, O. and ROWAN, M.G. (1978) *Phytochemistry* 17: 1111.
10. BANTHORPE, D.V., LE PATOUREL, G.N.J. and FRANCIS, M.J.O. (1972) *Biochem. J.* 130: 1045.
11. CROTEAU, R. and KARP, F. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179: 257.
12. VALENZUELA, P. and CORI, O. (1967) *Tetrahedron Letters* 2431.
13. CRAMER, F. and RITTERSDORF, W. (1967) *Tetrahedron* 23: 3015.
14. CHAYET, L., ROJAS, C., CARDEMIL, E., JABALQUINTO, A.M. and CORI, O. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 318.
15. CROTEAU, R. and KARP, F. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 198: 512.
16. CROTEAU, R.; FELTON, M. and RONALD, R.C. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 200: 534.
17. POULOSE, A.J. and CROTEAU, R. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 400.
18. BANTHORPE, D.V., BUCKNALL, G.A.; DOONAN, H.J.; DOONAN, S. and ROWAN, M.G. (1976) *Phytochemistry* 15: 91.
19. CORI, O.; CHAYET, L.; PEREZ, L.M.; DE LA FUENTE, M.; ROJAS, M.C.; PORTILLA, G. and VIAL, M.V. (1980) *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 32: 97.
20. CROTEAU, R. (1981) In "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds" (Porter J.W., and Spurgeon, S.L. eds.) Vol. 1 p. 225 Wiley, N.Y.
21. PORTILLA, G.; ROJAS, C.; CHAYET, L. and CORI, O. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 614.
22. BLOCK, M.A., JOYARD, J. and DOUCE, R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* 631: 210.
23. CORI, O. (1983) *Phytochem.* 22: 331.
24. DE LA FUENTE, M.; PEREZ, L.M.; HASHAGEN, U.; CHAYET, L.; ROJAS, M.C.; PORTILLA, G. and CORI, O. (1981) *Phytochem.* 20: 1551.
25. PEREZ, L.M.; LOZADA, R. and CORI, O. (1983) *Phytochemistry*, 22: 431.
26. BUNTON, C.A. and CORI, O. (1978) *Interciencia* 3: (5), 291.
27. CORI, O.; CHAYET, L.; PEREZ, L.M.; ROJAS, M.C.; PORTILLA, G.; HOLUIGUE, L. and FERNANDEZ, L.A. (1981) *Arch. Med. Biol. Exp.* 14: 129.
28. SUGA, T.; SHISHIBORI, T. and MORINAKA, H. (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 167.
29. GAMBIEL, H. and CROTEAU, R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 2335.
30. PORTILLA, G.; ROJAS, M.C.; CHIONG, E. and CORI, O. (1987) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1479.
31. VIAL, M.V.; ROJAS, M.C.; PORTILLA, G.; CHAYET, L.; PEREZ L.M.; CORI, O. and BUNTON, C.A. (1981) *Tetrahedron* 37: 2351.

32. CHAYET, L.; ROJAS, M.C. and CORI, O. (1984) *Biorg. Chem.* 12: 329.
33. CORI, O. and ROJAS, C. (1984) *Methods Enzymol.* 110A: 406.
34. GEORGE-NASCIMENTO, C.; PONT-LEZICA, R. and CORI, O. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45: 119.
35. BREMS, D.N. and RILLING, H.J. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99: 8351.
36. PORTILLA, G. and CORI, O. (1988) *Rev. Lat. Quim.* In Press.
37. ATTAWAY, J.A. and BUSLING, B.S. (1969) *Phytochemistry.* 8: 1671.
38. POTTY, V.H. and BRUEMMER, J.H. (1970) *Phytochemistry.* 9: 1001.
39. SUGA, T.; HIRATA, T.; AOKI, T. and SHISHIBORI, T. (1986) *Phytochemistry.* 25: 2769.

DISSOCIATION OF GERANYL AND LINALYL DIPHOSPHATE SPECIFIC
CARBOCYCLASES FROM CITRUS LIMONUM*

Gloria Portilla and M. Cecilia Rojas
Lab. Prof. O. Cori. Depto. de Química. Facultad de Ciencias
Universidad de Chile. Santiago, Chile

Received October 20, 1988

SUMMARY: Three monoterpene carbocyclases differing in their molecular weights were detected in a Citrus limonum enzymatic preparation by gel filtration on Sephadex G-100. Two of them utilize the primary substrates geranyl and neryl diphosphates and have molecular weights of 75,000 and 56,000 respectively. The third is a 45,000 carbocyclase absolutely specific for linalyl diphosphate, the tertiary isomer of monoterpene precursors. Radioinactivation of the same sample gave a value of 56,000 for the size of the minimal catalytic unit of geranyl, neryl and linalyl diphosphate carbocyclase activities.

INTRODUCTION

Cyclic monoterpene hydrocarbons are important constituents of the essential oils synthesized by higher plants and it has been established that their biosynthetic precursors are the open chain neryl and geranyl diphosphates, NPP and GPP, in the form of their dimeric complexes (1, 2). The tertiary isomer linalyl diphosphate, LPP, is also efficiently converted into cyclic hydrocarbons when supplied to these enzymatic preparations (3, 4). This compound has been postulated to be either an intermediate or an alternative substrate in cyclic monoterpene biosynthesis. Several studies in partially purified preparations (3-6) have clearly demonstrated that LPP is not a free intermediate in GPP cyclization, however the formation of a linalyl derivative in the active site of the enzymes cannot be discarded.

Our enzyme preparation obtained from the flavedo of Citrus limonum forms β -pinene, and lesser amounts of α -pinene, limonene and

We dedicate this paper to Professor Osvaldo Cori, whose decease was on April, first, 1987. We express our admiration for his integrity and courage as a University man. His death is a deep loss to science and to those of us who knew him personally as a fine and creative human being.

0158-5231/89/010173-08\$01.00/0

Copyright © 1989 by Academic Press Australia.
All rights of reproduction in any form reserved.

γ -terpinene from GPP, NPP or LPP. (1, 3). We have designated these enzymatic activities as carbocyclase without specifying if they are one or several enzymes.

The aim of this work was to look for molecular weight differences in these activities, as an approach to elucidate the number of enzymes involved in GPP, NPP and LPP utilization. Experiments were done employing two alternative methods: Sephadex Filtration and radiation inactivation. The latter offers the advantage of being useful even with partially purified samples; it is based on the loss of enzymatic activity due to exposure of the sample to various doses of gamma rays and gives the target size of the minimal functional unit necessary for catalytic activity (12). Kempner has performed an evaluation of the method for at least 40 enzymes and found a good agreement between target and other molecular weight estimates (13).

EXPERIMENTAL

Enzymatic Reaction

Monoterpene carbocyclase was obtained from the flavedo of *Citrus limonum* and was partially purified by polyethylene glycol 4,000 precipitation and anion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25 (1, 14). Protein concentrations were determined using the method described by Bradford (15).

Activity was determined incubating 3 to 20 μ g of protein at 30°C in 1 ml of the following medium: 0.1 M TES-NaOH buffer pH 7.0; 3×10^{-3} M $MnSO_4$ and one of the tritiated diphosphates: $[1-^3H]$ GPP 20 μ M, $[1-^3H]$ NPP 10 μ M or $[1-^3H]$ LPP 4 μ M. The reaction was quenched by cooling at 0°C and the products were quantified in the hexane phase by liquid scintillation spectrometry (14). Identification of the hydrocarbons was performed by radio-GLC (14).

Specific activity was defined as nanomoles of hydrocarbons formed per milliliter per minute and per milligram of protein. $[1-^3H]$ GPP, $[1-^3H]$ NPP and $[1-^3H]$ LPP were synthesized (14) with specific radioactivities of 30.5; 56.8 and 7.7 Ci.mol⁻¹ respectively.

Gel Filtration on Sephadex G-100

Freeze-dried, DEAE-Sephadex purified carbocyclase (1, 14) was dissolved in water and dialyzed against 50 mM Tris HCl pH 7.0, 50 mM KCl, 2 mM EDTA and 0.1 mM dithiothreitol. 10 mg of protein were applied to a DEAE-Sephadex A-25 column (18.5 cm x 1 cm) and chromatographed under the same conditions described elsewhere (1).

Fractions with carbocyclase activity eluted between 150 and 190 mM KCl, and were concentrated on a PM-10 Amicon membrane up to 0.72 mg of protein per ml.

An aliquot of this sample (0.5 ml) was applied to a Sephadex G-100 column (0.8x77 cm) previously equilibrated with 5×10^{-2} M Tris HCl buffer pH 7.0, containing 5×10^{-2} M KCl, 2×10^{-3} M EDTA and 10^{-3} M dithiothreitol.

Radiation Inactivation

Preparation of the samples: 200 μg of protein coming from DEAE-Sephadex (1, 14) was lyophilized in small glass tubes and sealed in vacuo. After variable exposure times to radiation they were opened and water added up to 0.53 mg of protein per ml. The assay was performed with 6.4 μg of protein. As control, the enzyme was maintained under the same conditions but without irradiation. Carboxylase is stable at least 14 days but it is very sensitive to the presence of air in either the control or the irradiated samples.

Radiation Inactivation Procedure: The tubes were irradiated at room temperature in a ^{60}Co source delivering 10^5 Rad/hr. Calibration of the radiation dose is continuously monitored by Comisión Chilena de Energía Nuclear using standard test methods for absorbed radiation dose in the Fricke dosimeter (16).

Data Presentation and Calculation

Classical target theory was applied to inactivation data to obtain a molecular target size (12). The loss of enzymatic activity due to radioinactivation is described by $A = A_0 e^{-kD}$ where A = total activity at a certain dose of irradiation. A_0 = activity at zero dose. k is function of the target size. This analysis gives a linear relationship between log of the remaining activity and irradiation dose. Experimental determination of molecular weights depends only on the rate of irradiation dose and was calculated from the formula of Kempner and Macey (13). i.e. $M.W. = 6.4 \times 10^{11} / D_{37}$ (rads), where D_{37} is dose of absorbed radiation required to reduce the enzymatic activity to 37% of that found in the unexposed controls.

RESULTS AND DISCUSSION

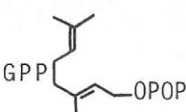
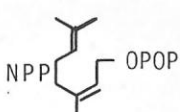
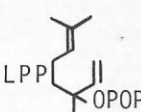


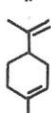
Dissociation of LPP and GPP carboxylases by Sephadex G-100 Filtration

The DEAE-Sephadex fraction obtained from the flavonoid of Citrus limonum as described in the Experimental section, catalyses the cyclization of GPP, NPP or LPP to monoterpene hydrocarbons (Table I). The preparation was submitted to fractionation by gel permeation on Sephadex G-100 and the column fractions were assayed separately with these three substrates. A slight dissociation between the enzymatic activities measured with the primary and tertiary substrates was obtained. Carboxylase activities and total proteins were contained in a broad peak covering almost all the filtration range of the column, thus evidencing strong protein-protein interaction in the sample.

The enzyme was further purified before the filtration procedure in order to reduce these associations and to improve the separation of tertiary and primary carboxylase activities. This

TABLE I

Carbocyclase specific activities ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) with different substrates^a)

Product	Substrate		
	GPP 	NPP 	LPP 
α -pinene 	0.27 (6%)	0.065 (5%)	0.4 (6%)
β -pinene 	3.87 (86%)	1.04 (80%)	0.54 (8%)
Limonene 	0.36 (8%)	0.2 (15%)	5.36 (80%)

^a It is shown in parentheses the percentage of each product.

was achieved through rechromatography on DEAE-Sephadex under the same conditions described above (see Experimental). Fractions containing carbocyclase were concentrated and applied to a Sephadex G-100 column. The elution pattern of carbocyclase activity measured with the three substrates is shown in Fig. 1. LPP carbocyclase activity elutes clearly dissociated from NPP and GPP carbocyclase activities, corroborating the preliminary results obtained with a less purified preparation. Although the peaks are overlapped, the separation is enough to give fractions that contain LPP carbocyclase activity but lack NPP and GPP carbocyclase. While only 15% of total GPP and NPP carbocyclase units are recovered, the LPP carbocyclase activity shows a 200% activation. The sample applied to the column shows that the GPP and LPP carbocyclase activities were of the same order of magnitude (Table I), while the LPP activity that emerges from the columns is about eighty times higher than the GPP activity.

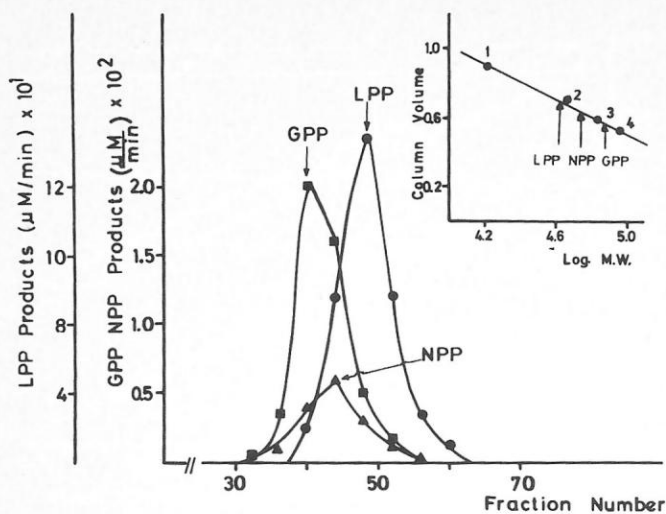


Fig. 1: Molecular weight determination of GPP, NPP and LPP carbocyclase by Sephadex G-100 Filtration. Total enzymatic activity from GPP (■—■), NPP (▲—▲) and LPP (●—●) in each fraction is plotted against the fraction number. Chromatography and assay conditions are described under Experimental. The volume of each fraction was 0.5 ml.

Insert: Elution of standard proteins 1-myoglobine M.W. = 17,000 2-ovoalbumine M.W. = 45,000, 3-serumalbumin M.W. = 66,500, 4-Yeast hexokinase M.W. = 90,000. The elution of GPP, NPP and LPP carbocyclase is indicated by arrows.

Molecular weights obtained for GPP, NPP and LPP carbocyclases were 75,000; 56,000 and 45,000 respectively, values interpolated from the calibration curve performed with standard proteins (insert Fig. 1).

The dissociation and difference in stability indicate the existence of three proteins with carbocyclase activity that differ markedly in their molecular weights and substrate specificities.

Effect of Radiation on Enzymatic Activity

Inactivation of carbocyclase occurred as a simple exponential function of radiation dose. Fig. 2 shows that the logarithm of the remaining activity is a linear function of the radiation dose where the fitted line is from least squares analysis. Molecular weights of $56,000 \pm 3,000$; $57,000 \pm 2,800$ and $56,000 \pm 1,300$ were determined from D_{37} values for GPP, NPP and LPP carbocyclase respectively.

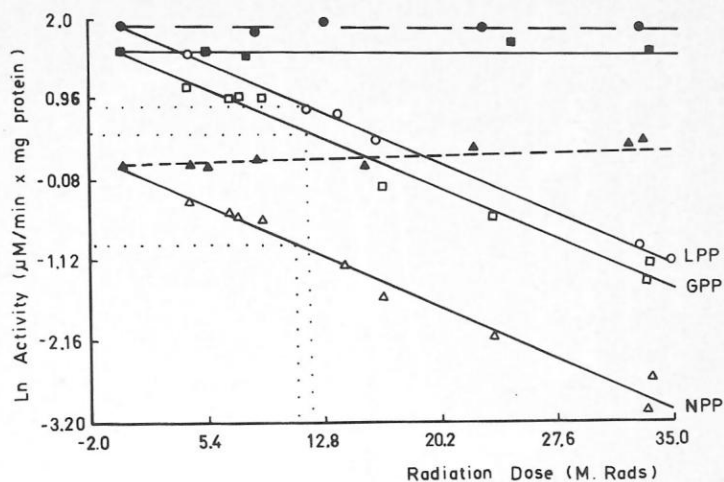


Fig. 2: Radiation inactivation of GPP, NPP and LPP carbocyclase as a function of irradiation dose. After variable exposure doses samples were assayed for GPP (\square — \square), NPP (Δ — Δ) and LPP (\circ — \circ) activities. Non irradiated controls retained full activity (solid symbols). The molecular weight was calculated using the established relationship $M.W. = 6,4 \times 10^{11} / D_{37}$. The values obtained from these data were $56,000 \pm 3,000$ dalton ($D_{37} = 11.5$ Mrad); $57,400 \pm 2,800$ dalton ($D_{37} = 11.15$ Mrad) and $56,000 \pm 1,300$ dalton ($D_{37} = 11.5$ Mrad).

These values are the same within experimental error and does not provide evidence for the larger form of the GPP carbocyclase as detected by gel filtration.

The identity and relative amounts of the products formed by the enzyme preparation during the radiation experiment were determined. Table I shows the specific activity of the enzymes and the percentage of products formed initially at zero radiation. While the preparation forms predominantly β -pinene when assayed with GPP or NPP as substrates, it forms predominantly limone with LPP as substrate. Under the assumption that a larger enzyme is more likely to be inactivated at lower doses of radiation and this could be revealed by the absence of one product, analysis was done at different times of radiation exposure until 5% of the initial activity remained. The ratio of the three hydrocarbons was constant, indicating that all the active enzymes had the same target size. Additionally, K_m

values were determined with preparations that had undergone 50% inactivation. The remaining enzyme had the same K_m values as the initial enzyme (1, 2, 17). The maintenance of the ratio of the products and K_m values indicates that there is no partially damaged target and that the only activity remaining, after radiation exposure, is due to enzyme molecules which have escaped ionization, and which are therefore fully active.

The molecular weight determination by the two methods employed yielded different estimates for the GPP activity. While gel filtration by Sephadex yielded a molecular weight of 75,000, the radioinactivation technique resulted in an estimate of 56,000. A possible explanation for this discrepancy is to propose that the enzyme has a minimal catalytic subunit of 56,000 that can bind a regulatory subunit to form a larger species.

Finally, the detection of a monoterpene carbocyclase absolutely specific for LPP (Fig. 1) opens a question concerning the role of this enzyme and of LPP in monoterpene metabolism. Linalyl diphosphate has not been isolated from plant tissues nor has it been demonstrated as a normal precursor or intermediate in monoterpene biosynthesis. Even when LOH is accumulated in some plants (18) the high hydrolytic reactivity of LPP at pH values lower than 8 (17) makes extremely difficult its isolation from plant extracts that normally present pH values around 6.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are very indebted to Comisión Chilena de Energía Nuclear where the irradiation of the samples was done; to Dr. B. Weiss for assistance in computational analysis and to Mr. Gonzalo Pérez who generously furnished Citrus limonum fruits from selected trees.

This work was supported by FONDECYT CHILE (Proyecto N° 30) and Departamento Técnico de Investigación, U. de Chile (Proyecto Q-2818).

REFERENCES

1. Rojas, M.C., Chayet, L., Portilla, G., and Cori, O. (1983). Arch. Biochem. Biophys. 222, 389-396.
2. Chayet, L., Rojas, M.C., and Cori, O. (1984). Bioorg. Chem. 12, 329-338.
3. Portilla, G., Rojas, M.C., Chayet, L., and Cori, O. (1982). Arch. Biochem. Biophys. 218, 614-618.
4. Gambliel, H., and Croteau, R. (1982). J. Biol. Chem. 257, 2335-2342.
5. Croteau, R., Felton, M., and Ronald, R. (1980). Arch. Biochem. Biophys. 200, 534-546.
6. Banthorpe, D.V., Christou, P.N., Pink, C.R. and Watson, D.G. (1983). Phytochem. 22, 2465-2468.
7. Hanover, J.W. (1966). Heredity 21, 73-84.
8. Hefendehl, H.W. (1967). Z. Pflanzenphysiol. 57, 310-316.
9. Von Rudloff, E. (1975). Biochem. Syst. Ecol. 2, 131-167.
10. Baradat, P.L., Bernard-Dagan, C., Fillon, C.H., Marpeau, A., and Pauly, G. (1972). Ann. Sci. Forest. 29, 307-334.
11. Chayet, L., Rojas, M.C., Cardemil, E., Jabalquinto, A.M., Vicuña, R. and Cori, O. (1977). Arch. Biochem. Biophys. 180, 318-327.
12. Pollard, E.C. (1953). Adv. Biol. Med. Phys. 3, 153-189.
13. Kempner, E.S., Schlegel, W. (1979). Anal. Biochem. 92, 2-10.
14. Cori, O., and Rojas, M.C. (1984). Methods in Enzymology Vol. 110A, 406-417.
15. Bradford, M. (1976). Anal. Biochem. 72, 248-254.
16. Fricke, M., and Hart, E.J. (1966). In Radiation Dosimetry (Attix F.M., and Roesck, W.C. eds.). Vol. 11, 167-239 Academic Press, New York.
17. Portilla, G., Rojas, M.C., Chiong, E., and Cori, O. (1987). J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1479.
18. Tange, K. (1981). Bull. Chem. Soc. Jpn., 54, 2763-2769.