

UCH-FC
LIC-B
Q 3

Carneola : 20/04/22

ACIDOS HIDROXAMICOS CICLICOS DE GRAMINEAS: DIS-
TRIBUCION EN LA PLANTA Y EFECTOS SOBRE LA SINTE-
SIS DE ADENOSIN-5'-TRIFOSFATO EN CLOROPLASTOS

TESIS

ENTREGADA A LA

UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y FARMACÉUTICAS

POR

CARLOS BENITO QUEIROLO PALMA

PROFESOR GUÍA: DR. LUIS CORCUERA P.

A mis padres

A G R A D E C I M I E N T O S

Obviamente, mi mayor deuda la he contraído con mi tutor, Dr. Luis Corcuera P., verdadero guía en mis primeras labores científicas.

En mí también se han hecho merecedores de un profundo reconocimiento los Dres. Hermann Niemeyer M. y Carlos Andreo (Rosario, Argentina) por el invaluable apoyo brindado en parte de mi tesis.

Sin duda, muchísimos han contribuido a que alcanzara esta meta, destacándose mi esposa Patricia Córdova y mi gran amigo Juan Davagnino.

I N D I C E D E M A T E R I A S

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS.	xi
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS ESPECIALES.	xiv
RESUMEN	xvi
INTRODUCCION.	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.	2
1. Descubrimiento de ácidos hidroxámicos y com- puestos relacionados	2
2. Métodos para cuantificar DIMBOA y compuestos relacionados en extractos vegetales.	13
3. Propiedades de los ácidos hidroxámicos de gra míneas	19
3.1. Propiedades químicas	
3.1.1. Quelación de cationes.	19
3.1.2. Descomposición en soluciones	20
3.2. Propiedades biológicas	25
3.2.1. Resistencia contra enfermedades.	25
3.2.2. Nutrición mineral.	46
3.2.3. Reacción con herbicidas e insecticidas	51
3.2.4. Otras funciones biológicas	58
3.2.4.1. Mutagenicidad de 1,4-benzoxazinonas hi droxámicas.	58

3.2.4.2. Efectos farmacológicos de benzoxazoli- nonas	59
3.2.4.3. Estimulación por MBOA de la reproduc- ción en <u>Microtus montanus</u>	60

METODOLOGIA

A. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE ACIDOS HI-
DROXAMICOS

1. Purificación de DIMBOA.	64
2. Caracterización de DIMBOA	66
2.1. Espectro ultravioleta	66
2.2. Espectro infrarrojo	68
2.3. Espectro visible del complejo formado por DIMBOA con FeCl ₃	68
2.3.1. Preparación del reactivo de FeCl ₃	68
2.3.2. Obtención del espectro.	70
2.3.3. Determinación del coeficiente de extin- ción molar a 590 nm	70
3. Aislamiento y purificación de DIMBOA-Glc.	72
3.1. Preparación de la columna de SP-Sephadex - Fe(III)	72
3.2. Preparación de la columna de Sephadex G-10.	73
3.3. Descripción de la extracción y purificación típicas	74
3.4. Identificación de algunos picos del perfil de elución obtenido del Sephadex G-10	81
4. Caracterización espectroscópica del DIMBOA - Glc	83
4.1. Espectro ultravioleta	83
4.2. Espectro infrarrojo del DIMBOA-Glc.	85
4.3. Espectro de resonancia magnética nuclear.	87
4.4. Espectro de masas	89

4.5. Espectro visible del complejo formado por DIMBOA-Glc con FeCl ₃	91
4.6. Espectro visible de los productos de reac- ción entre DIMBOA-Glc y antrona	91
4.6.1. Reacción del DIMBOA-Glc con la antrona.	91
4.6.2. Comparación con el espectro de glucosa con antrona	93
5. Cuantificación del DIMBOA-Glc. Curvas de ca- libración	97
5.1. Absorbancia ultravioleta del DIMBOA-Glc en agua saturada con cloroformo.	98
5.2. Espectro visible del DIMBOA-Glc con reacti- vo de FeCl ₃	99
5.3. DIMBOA-Glc y el reactivo de antrona	100
 B. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE Hx EN MAIZ LH Rin- conada.	 102
1. Recuperabilidad en las extracciones	103
1.1. Recuperabilidad en la molienda de los teji- dos	103
1.2. Recuperabilidad según la cantidad de extrac- ciones etéreas.	107
1.3. Recuperabilidad según el tiempo conferido para la hidrólisis del DIMBOA-Glc en los ex- tractos acuosos	110
2. Extracción y medición de Hx	114
 C. EFECTOS DE Hx Y DERIVADOS SOBRE LA FASE LUMI- NICA DE LA FOTOSINTESIS	 117
1. Preparación de cloroplastos clase II.	117
2. Fotofosforilaciones	118
3. Transporte de electrones.	119

4. Actividad ATPásica dependiente del Ca^{++} en <u>clo</u> roplastos clase II.	120
5. Actividad ATPásica dependiente del Ca^{++} en CF_1 soluble	121
5.1. CF_1 activado por calor.	123
5.2. CF_1 activado por tripsina	123
5.3. CF_1 activado por reactivos de Cleland	123
6. Determinación de proteínas.	124
6.1. Método de Lowry modificado.	124
6.2. Método del azul de Coomassie.	125
7. Filtración rápida por centrifugación.	125

RESULTADOS

A. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE Hx EN MAIZ

1. Variaciones en la concentración de Hx de acuer <u>do</u> a la edad de las plántulas	127
2. Cuantificación en distintos órganos del vege- tal. Efecto de la edad y la luminosidad	132
3. Efecto de la temperatura sobre el contenido de Hx.	139
4. Efecto de la disponibilidad hídrica sobre el contenido de Hx	141

B. EFECTOS DE Hx Y DERIVADOS SOBRE LA ETAPA LUMINO NOSA DE LA FOTOSINTESIS

1. Fotofosforilaciones	143
2. Transporte de electrones.	145
3. Actividad ATPásica en cloroplastos clase II	148
4. Actividad ATPásica en CF_1 soluble	148
4.1. ATPasa activada por tripsina o por calor.	148

5. Actividad ATPásica desenmascarada por reactivos de Cleland.	151
5.1. Efecto de la concentración de BOA, MBOA, DIMBOA y DIMBOA-Glc	151
5.2. Dependencia del tiempo de preincubación del CF_1^+ con la DIMBOA.	153
5.3. Reversibilidad de la inhibición por DIMBOA.	154
5.4. Influencia de la concentración del sustrato sobre la inhibición por DIMBOA.	156
5.5. Efecto de la DIMBOA sobre la inhibición alostérica por ADP.	162
6. Efecto del DTE sobre la actividad inhibitoria de la DIMBOA.	165
6.1. Cloroplastos clase II activados por tripsina	165
6.2. Fotofosforilación cíclica	167
6.3. CF_1^+	167
7. Protección del CF_1^+ por yodoacetamida	170
7.1. Cinética de la protección	170
7.2. Inhibición por diferentes concentraciones de DIMBOA.	170
C. CINÉTICAS DE REACCION DE LA DIMBOA CON AMINO-ACIDOS.	174
DISCUSION.	177
A. EFECTOS DE Hx Y BENZOXAZOLINONAS SOBRE LA ETAPA LUMINOSA DE LA FOTOSINTESIS.	177
B. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE Hx EN PLANTULAS DE MAIZ LH Rinconada	187
C. CONCLUSIONES.	192
LISTA DE REFERENCIAS	193

L I S T A D E T A B L A S

Tabla I	:	Organismos afectados por DIMBOA y/o compuestos relacionados.....	26
Tabla II	:	Otros roles adjudicados a 1,4-benzoxazinas y 2-benzoxazolinonas.....	47
Tabla III	:	Correlación entre las absorciones de NMR y los protones del DIMBOA-Glc.....	88
Tabla IV	:	Recuperabilidad de DIMBOA desde los tejidos macerados de maíz.....	106
Tabla V	:	Recuperabilidad de DIMBOA según la cantidad de extracciones etéreas (en proporción 2 : 1 = éter : extracto).....	108
Tabla VI	:	Contenido de Hx en diversas porciones de las plántulas de maíz LH Rinconada...	133
Tabla VII	:	Contenido de Hx en plántulas cultivadas en oscuridad a distintas temperaturas...	140
Tabla VIII	:	Concentraciones de Hx en plántulas cultivadas en oscuridad bajo diferentes condiciones hídricas.....	142
Tabla IX	:	Efecto de la DIMBOA y de su glucósido sobre las actividades ATPásicas del CF ₁ purificado y en cloroplastos clase II de espinaca.....	150

Tabla X	:	Reversibilidad de la inhibición por DIMBOA sobre la actividad del CF_1^+ , con períodos cortos de preincubación.....	157
Tabla XI	:	Parámetros de regresión lineal de las gráficas de Lineweaver-Burk de la Fig. 34.	161

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 : Estructura de 1,4-benzoxazinonas y benzoxazolinonas encontradas en gramíneas..... 3
- Figura 2 : Ejemplos de probables relaciones metabólicas entre 1,4-benzoxazin-3-onas y benzoxazolinonas existentes en extractos de gramíneas..... 6
- Figura 3 : Espectro de absorción por DIMBOA en el rango de luz ultravioleta..... 67
- Figura 4 : Espectro infrarrojo de la DIMBOA..... 69
- Figura 5 : Espectro de DIMBOA con FeCl_3 en el rango de luz visible..... 71
- Figura 6 : Perfiles de elución desde una columna de gel Sephadex G-10..... 77
- Figura 7 : Espectros de absorción del DIMBOA-Glc en el rango de luz ultravioleta..... 84
- Figura 8 : Espectro infrarrojo del DIMBOA-Glc..... 86
- Figura 9 : Espectro de masas del DIMBOA-Glc..... 90
- Figura 10 : Espectros del DIMBOA-Glc en el rango de luz visible con reactivo de FeCl_3 92
- Figura 11 : Espectros del DIMBOA-Glc con reactivo de antrona en el rango de luz visible, a distintos tiempos de reacción..... 94

Figura 12 :	Curva de progreso de la reacción colorimétrica entre el DIMBOA-Glc y el reactivo de antrona.....	96
Figura 13 :	Curvas de calibración de DIMBOA-Glc y de <u>glu</u> cosa con reactivo de antrona.....	101
Figura 14 :	Esquema del experimento de recuperabilidad de DIMBOA en la molienda de los tejidos.	104
Figura 15 :	Hidrólisis enzimática del DIMBOA-Glc en extractos acuosos de maíz LH Rinconada...	112
Figura 16 :	Cambios en la concentración de Hx en plántulas de maíz de edades diferentes, <u>culti</u> vadas en la oscuridad.....	128
Figura 17 :	Variaciones en la concentración de Hx en plántulas de maíz de edades diferentes, <u>culti</u> tivadas a la luz.....	131
Figura 18 :	Inhibición de las fotofosforilaciones <u>cícli</u> ca y no cíclica.....	144
Figura 19 :	Efectos de la DIMBOA sobre el transporte <u>fo</u> tosintético de electrones.....	146
Figura 20 :	Efecto del DIMBOA-Glc sobre el transporte de electrones en cloroplastos.....	147
Figura 21 :	Efecto de la DIMBOA y de su glucósido sobre la hidrólisis de ATP catalizada por el CF_1 activado por tripsina en las <u>membra</u> nas tilacoides de espinaca.....	149
Figrua 22 :	Inhibición por DIMBOA, MBOA, BOA y DIMBOA-Glc de la actividad ATPásica del CF_1^+	152
Figura 23 :	Dependencia del tiempo de preincubación del CF_1^+ con la DIMBOA.....	155

Figura 24 :	Efecto de la DIMBOA sobre la función de saturación del CF_1^+	159
Figura 25 :	Gráficas de Lineweaver-Burk para la inhibición por DIMBOA de la actividad ATPásica del CF_1^+	160
Figura 26 :	Efecto de la DIMBOA sobre la función de saturación del CF_1^+ en ausencia y en presencia de ADP.....	163
Figura 27 :	Prevención por DTE de la inhibición causada por la DIMBOA en CF_1	166
Figura 28 :	Reversión por DTE de la inhibición provocada por DIMBOA sobre la actividad ATPásica del CF_1^+	169
Figura 29 :	Cinética de la protección otorgada por la yodoacetamida contra la inhibición por DIMBOA 5 mM sobre la actividad ATPásica del CF_1^+	171
Figura 30 :	Protección con yodoacetamida contra la inhibición por DIMBOA sobre la actividad ATPásica del CF_1^+	173
Figura 31 :	Efectos de aminoácidos sobre la descomposición de DIMBOA.....	175
Figura 32 :	Distribución de grupos sulfhidrilo en CF_1 ...	180
Figura 33 :	Isómeros de la DIMBOA posibles de hallar en soluciones acuosas.....	182

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS ESPECIALES

A	:	Absorbancia
ADP	:	Adenosin-5'-difosfato
ATP	:	Adenosin-5'-trifosfato
CF ₁	:	Factor de acoplamiento 1 de cloroplastos
CF ₁ ⁺	:	CF ₁ activado por incubación prolongada con tioles
DTE	:	Ditioeritritol
DTT	:	Ditiotreitol
ϵ	:	Coefficiente de extinción molar
EDTA	:	Acido etilendiaminotetracético
GLC	:	Cromatografía gas-líquido
Hx	:	Acidos hidroxámicos
I ₅₀	:	Concentración de un compuesto necesaria para causar un 50 % de inhibición
IR	:	Infrarrojo (espectrometría de)
K	:	Constante de equilibrio de una reacción
K _m	:	Constante de Michaelis
λ	:	Longitud de onda
<u>ln</u>	:	Logaritmo natural
Log	:	Logaritmo en base 10
MR	:	Medio de reacción
MS	:	Espectro(metría) de masas
MV	:	Metil viológeno
NMR	:	Resonancia magnética nuclear (espectrometría de)
P _i	:	Ortofosfato inorgánico
PPO	:	Fotofosforilación
<u>r</u>	:	Coefficiente de correlación
SH	:	Grupo sulfhidrilo
TCA	:	Acido tricloroacético

TF : Tejido fresco
 $t_{1/2}$: Vida media; tiempo requerido para que una concen-
 tración de reactante se reduzca a la mitad
 t° : Temperatura
 UV : Ultravioleta (espectrometría de)
 $V_{m\acute{a}x}$: Velocidad máxima
 YAA : Yodoacetamida
 ~, ≈, ≅ : Aproximadamente

Las siguientes siglas se encuentran definidas en la pág. 3:
 HBOA-Glc, 7-OH HBOA-Glc, HMBOA-Glc, HM₂BOA-Glc, DIBOA-Glc,
 7-OH DIBOA-Glc, DIMBOA-Glc, DIM₂BOA-Glc, HBOA, 7-OH HBOA,
 HMBOA, HM₂BOA, DIBOA, 7-OH DIBOA, DIMBOA, DIM₂BOA, BOA ,
 6-OH BOA, MBOA, M₂BOA y 4,7 M₂BOA-Glc.

R E S U M E N

Diversas gramíneas contienen glucósidos de ácidos hidroxámicos cíclicos, los cuales se hidrolizan a las aglucos correspondientes al macerar los tejidos. Tales ácidos hidroxámicos (Hx) son fitotóxicos e inhiben el crecimiento de patógenos, desconociéndose su modo de acción a nivel molecular. En esta tesis se aisló la DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) y el DIMBOA-Glc (derivado 2-O- β -D-glucosilado), los Hx más abundantes en extractos de maíz. Además, se describen algunos efectos sobre reacciones de transducción de energía acopladas a transporte de electrones, causados por esos Hx, y se estudió la influencia que sobre el complejo CF_1 de espinacas ejerce la DIMBOA, así como la reactividad de este compuesto con aminoácidos.

Se analizó, mediante colorimetría, el contenido de Hx en extractos etéreos de maíz LH Rinconada. Se encontró desde niveles no detectables (< 3 mg/Kg TF) en frutos no germinados hasta sobre un 20 % del peso seco en nomófilos de 5 días. Las hojas presentaron niveles más altos que tallos y raíces. La concentración varió con la edad de las plántulas, alcanzando un nivel máximo a los 3-4 días para luego

disminuir; la cantidad total de Hx aumentó hasta los 8 - 9 días en cultivos a la luz, o hasta más allá de los 12 días en plántulas que crecieron en la oscuridad. La menor disponibilidad de agua y la mayor luminosidad determinaron un aumento en la concentración, no así en el contenido total.

En cloroplastos clase II de espinaca, los Hx inhibieron el transporte de electrones acoplado a la síntesis de ATP y prácticamente no disminuyeron el transporte medido en condiciones basales o de desacoplamiento, concluyéndose que son inhibidores de reacciones de transducción de energía. La DIMBOA también inhibió la fosforilación oxidativa en una suspensión de mitocondrias de corazón de bovino, aunque en una inferior proporción. Lo anterior sugiere un posible modo de acción de los Hx en organismos donde resultan inhibitorios.

La DIMBOA (5 mM) inhibió totalmente las fotofosforilaciones cíclica y no cíclica y la ATPasa en cloroplastos clase II. También inhibió en un 60 % al complejo CF_1 purificado y activado por calor o por digestión con tripsina y en un 50 % al CF_1 activado por incubación prolongada con tioles (CF_1^+). El glucósido también disminuyó estas actividades, pero con una I_{50} más de 4 veces superior a la de la DIMBOA. Este compuesto inhibió la actividad ATPásica del CF_1^+ de 2 maneras: una reversible y prácticamente instantánea y otra irreversible y lenta ($t_{1/2} = 2,8$ h). En estudios sobre el efecto rápido, se encontró que la DIMBOA no actúa

ría en los sitios activos no alostéricos, que la inhibición es revertida parcialmente por tioles, y que la actividad enzimática es protegida en parte por la yodoacetamida. También la inhibición por DIMBOA, tanto de la fotofosforilación cíclica como de la ATPasa ligada a tilacoides y activada por tripsina, fue parcialmente revertida por ditioeritritol. Además, la DIMBOA reacciona con tioles reversible y rápidamente formando compuestos de adición, así como irreversible y lentamente, dando lugar a productos de óxido-reducción. Lo antecedente sugiere que la inhibición del CF_1 por la DIMBOA se debe parcialmente a su reacción con grupos sulfhidrilos de la enzima. Su reactividad con tioles permite inferir que la DIMBOA podría afectar otras enzimas cuya actividad depende de grupos sulfhidrilos.

I N T R O D U C C I O N

Se ha demostrado la existencia de varios ácidos hidroxámicos cíclicos (Hx) en extractos de gramíneas, siendo la DIMBOA el más abundante de ellos. La DIMBOA se encuentra en la planta como un glucósido (DIMBOA-Glc), el cual se hidroliza enzimáticamente al dañarse los tejidos vegetales. Se ha demostrado que la DIMBOA provoca efectos deletéreos en plantas e inhibe diversos agentes causantes de enfermedades en gramíneas, tales como bacterias, hongos e insectos. Por ello se ha propuesto que los Hx de maíz son importantes en la resistencia de la planta a los patógenos.

Los Hx de gramíneas inhiben una amplia gama de organismos, desconociéndose sus efectos fisiológicos y su modo de acción a nivel molecular. En esta tesis se pretende:

a) Aislar DIMBOA y DIMBOA-Glc desde plantas de maíz y estudiar algunos factores que afectan las concentraciones de estos compuestos en las plantas.

b) Determinar un posible modo de acción de la DIMBOA y del DIMBOA-Glc a nivel molecular, estudiando los efectos de estos compuestos sobre la síntesis de ATP en plantas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Descubrimiento de ácidos hidroxámicos y compuestos relacionados

Virtanen y sus asociados describieron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de Fusarium nivale causados por compuestos presentes en extractos de centeno, maíz y trigo (Virtanen y Hietala, 1956; Virtanen et al., 1956a; 1956b; Hietala y Wahlroos, 1956; Virtanen et al., 1957). Estos compuestos fueron identificados como 1,3-benzoxazolin-2-ona (BOA, Fig. 1) y su derivado 6-metoxi-1,3-benzoxazolin-2-ona (MBOA, Fig. 1). Independientemente, Koyama y sus asociados (1955; 1957) informaron la presencia del coixol (MBOA) en gramíneas del género Coix. De 40 géneros de gramíneas examinados, detectaron MBOA sólo en las raíces de Coix. El grupo de Virtanen había detectado benzoxazolinonas también en el follaje de trigo, maíz y centeno. Posteriormente, se encontró que estos compuestos no existían en los tejidos intactos, sino que, a partir de algún precursor, aparecían al moler el material fresco; se supuso entonces que esto ocurría por actividad enzimática (Virtanen y Wahlroos, 1958).

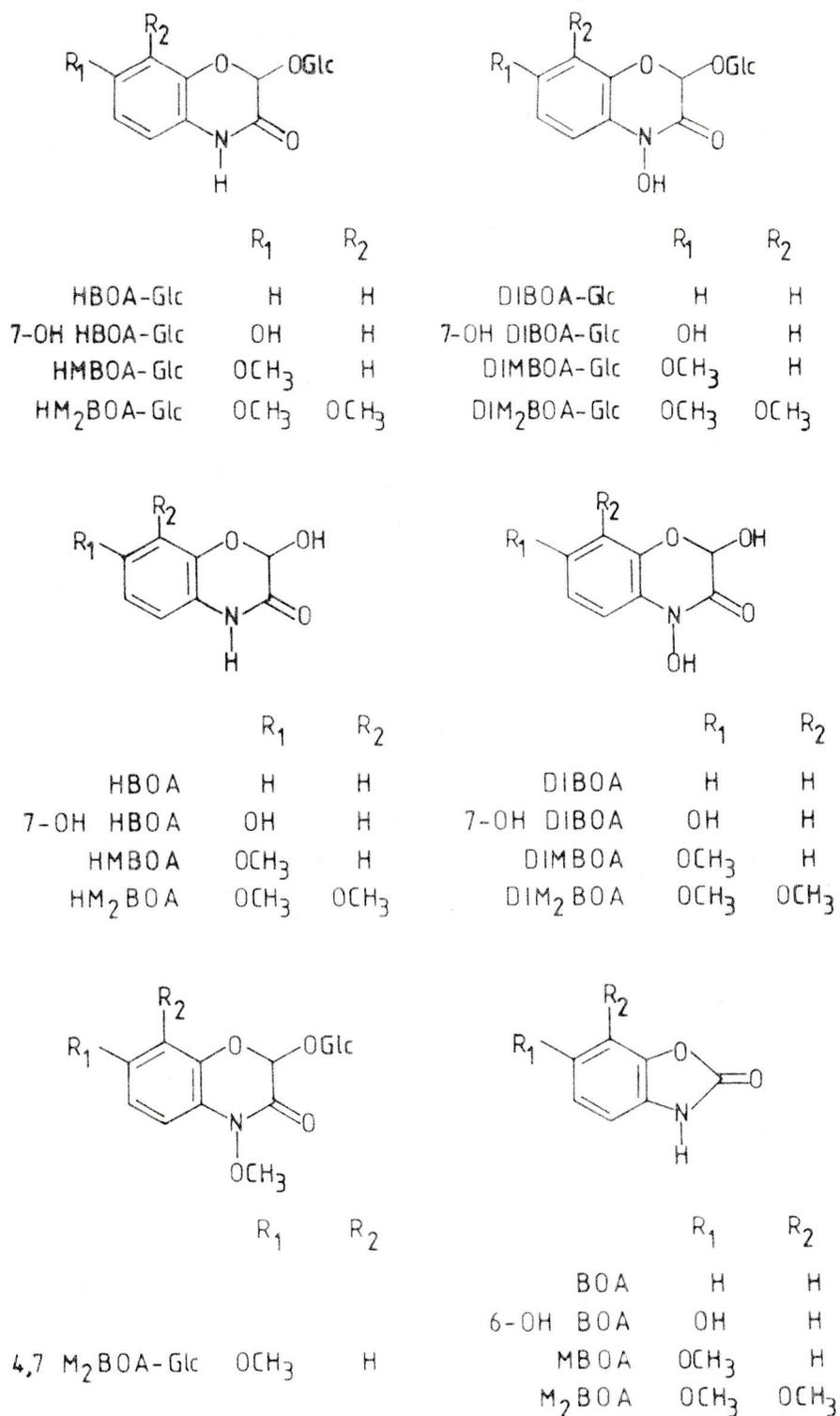


Figura 1. Estructura de 1,4-benzoxazinonas y benzoxazolinonas encontradas en gramíneas (sección 1.).

Pero luego, Virtanen y sus colegas, en trabajos sucesivos hasta 1964, mostraron que las benzoxazolinonas son compuestos de descomposición no enzimática de los ácidos hidroxámicos correspondientes: 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIBOA, Fig. 1) y 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA, Fig. 1); DIBOA y DIMBOA, a su vez, provienen de los respectivos glucósidos (derivados 2-O-β-D-glucosilados: DIBOA-Glc y DIMBOA-Glc, Fig. 1) por hidrólisis enzimática (Wahlroos y Virtanen, 1959; 1964; Virtanen y Hietala, 1959a; 1959b; 1960; Hietala y Virtanen, 1960a; 1960b; 1961; 1962; Virtanen y Wahlroos, 1963).

Se propuso que la DIMBOA libre existe en plantas de maíz (Virtanen y Wahlroos, 1963; Wahlroos y Virtanen, 1964). Estos autores encontraron que en las variedades de maíz dulce y Early Albert no había hidroxamatos no glucosilados en plantas jóvenes (de menos de 2 semanas), pero sí en plantas más viejas (de 1 a 2 meses) con las puntas de sus hojas cloróticas. Al analizar la variedad W 22, ellos encontraron que casi la mitad de la DIMBOA existente en la planta (aproximadamente 700 µg/g TF) estaba en la forma no glucosilada y concluyeron que la concentración de la aglucona libre puede variar considerablemente en distintas variedades. Curiosamente, no encontraron MBOA en los extractos, a pesar que la DIMBOA se descompone a MBOA y ácido fórmico en solventes acuosos. Se puede suponer entonces que la DIMBOA hallada fue producida al efectuar las extracciones, y el corto tiempo de manipulación explicaría el que no encontraran MBOA.

Paralelamente, Beck y sus asociados estudiaron la resistencia de plantas de maíz contra un insecto perforador de esta gramínea, Ostrinia nubilalis (Hübner.), encontrando que un factor de resistencia era MBOA (Beck y Stauffer, 1957; Loomis et al., 1957). Sin embargo, Virtanen y sus colaboradores observaron que no existía la benzoxazolinona en plantas intactas de la misma variedad de maíz usada por Beck et al. (Virtanen y Wahlroos, 1963; Wahlroos y Virtanen, 1964), encontrando sólo el DIMBOA-Glc y la aglucona en el tejido fresco y macerado de esa variedad (W 22).

Más apoyo para la conexión entre precursores glucosídicos, benzoxazinonas y benzoxazolinonas (Fig. 2A), proviene del trabajo de Hamilton y col. (1962), quienes aislaron DIMBOA desde tallos de maíz mediante homogenización en etanol y extracción con éter etílico y caracterizaron el Hx y algunos productos de degradación térmica (MBOA, ácido fórmico y amoníaco). Los datos obtenidos confirman los resultados de Virtanen y sus colaboradores. Posteriormente, Gahagan y Mumma (1967) extrajeron, en un sistema Soxhlet, raíces de maíz maduro con metanol-cloroformo. Mediante cromatografías en columna y en capa fina lograron aislar un derivado reducido del DIMBOA-Glc, cual es el 2-(2-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- β -D-glucopiranosido (HMBOA-Glc; Fig. 1). El producto de reducción del DIMBOA-Glc tenía propiedades cromatográficas, espectrales (UV, IR, NMR y MS) y puntos de fusión iguales a las del compuesto extraído des

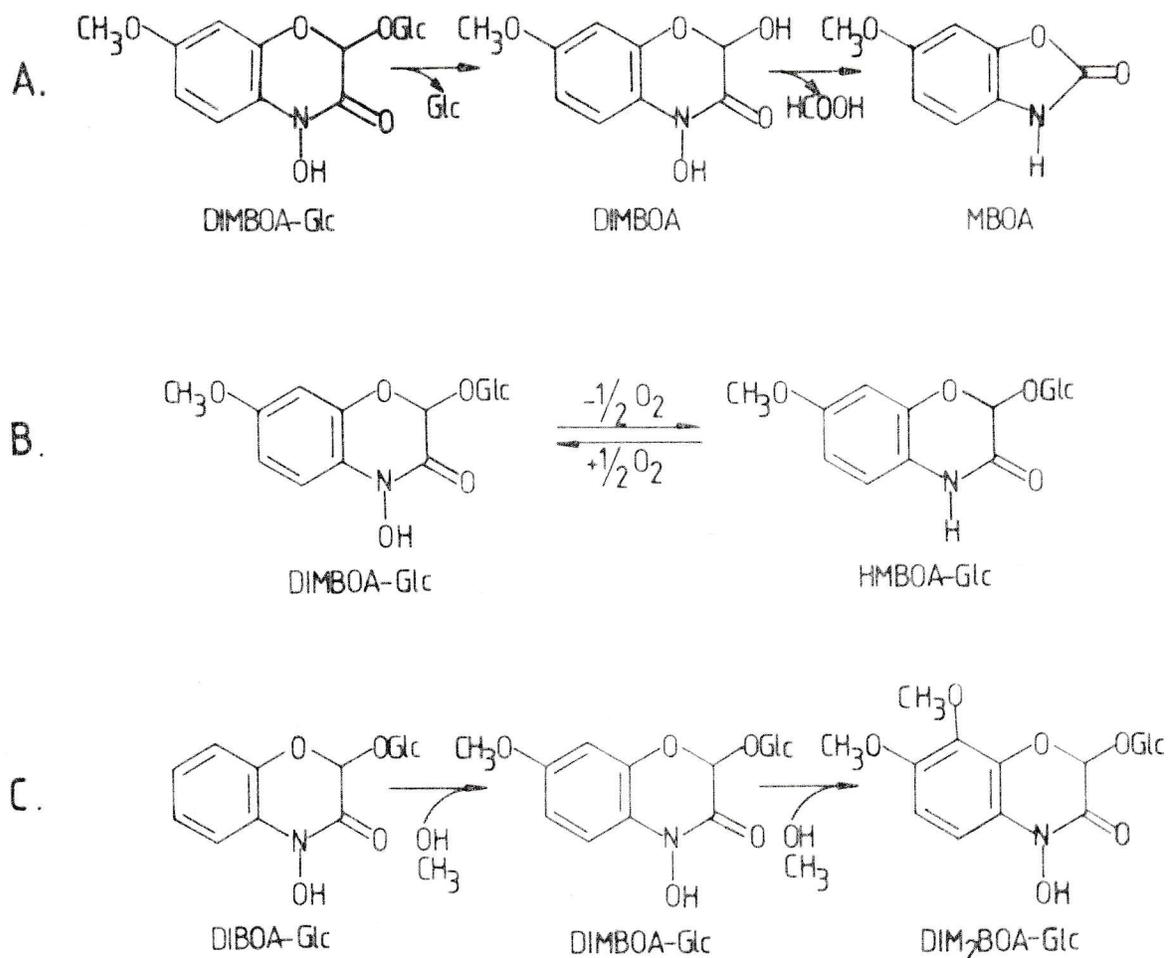


Figura 2. Ejemplos de probables relaciones metabólicas entre 1,4-benzoxazin-3-onas y benzoxazolinonas existentes en extractos de gramíneas.

A. Catabolismo de ácidos hidroxámicos cíclicos al ocurrir la citólisis. Los glucósidos se hidrolizan enzimáticamente y las agluconas se descomponen a benzoxazolinonas de manera espontánea, con cinéticas dependientes del medio (pH, temperatura, solventes, otros compuestos, y otras condiciones). B. Nexos de óxido-reducción entre 1,4-benzoxazinona-glucósidos. Aparentemente, la oxidación ocurre in vivo durante el desarrollo y la reducción acontece en algu

Figura 2. Continuación.

nos estados fisiológicos alterados de la planta (pág. 54), en tanto que in vitro sólo se ha reportado la reducción (Gahagan y Mumma, 1967; Hofman et al., 1970). C. Anabolismo de hidroxamatos cíclicos ocurrido durante el desarrollo. El DIMBOA-Glc es el más abundante en trigo y maíz, en tanto que el DIBOA-Glc lo es en centeno. El DIM₂BOA-Glc es el menos concentrado en las variedades en que se encuentra. El 4,7-M₂BOA-Glc, que no es hidroxamato y probablemente deriva del DIMBOA-Glc, aparece en mayor proporción en raíces de maíz, trigo y Coix, con respecto a los demás glucósidos (Hofman et al., 1970).

de las raíces, comprobando así la identidad del glucósido aislado. Dada la similitud entre el HMBOA-Glc y el DIMBOA-Glc, los autores sugirieron que: i) la forma lactámica puede ser un intermediario en la biosíntesis de la especie hidroxámica, basados también en la proposición de Reimann y Byerrum (1964), cual es que los enlaces C-N se forman antes que ocurra la hidroxilación del N; ii) el que exista el HMBOA-Glc sería indicio que el glucopiranosido también se formaría antes que suceda la hidroxilación del N; iii) el que disminuya la concentración del DIMBOA-Glc a medida que aumenta la edad del individuo, señalaría que un posible catabolito del hidroxamato es el HMBOA-Glc, el cual no sufriría posteriores cambios (en la Fig. 2B se muestra esta relación redox). Tipton et al. (1967) analizaron plántulas de maíz (cv. CI 31 A), encontrando también la lactama HMBOA-Glc, cuya hidrólisis enzimática produjo glucosa más el derivado reducido de la DIMBOA, la 2-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (HMBOA, Fig. 1). Con estos resultados, también sugirieron una relación metabólica redox entre los ácidos hidroxámicos y sus lactamas correspondientes, como fue postulado por Gahagan y Mumma (1967; ver Fig. 2B). Además, Tipton et al. (1967) corroboraron algunos resultados de Virtanen y su grupo al aislar tanto DIMBOA-Glc (desde plantas con sus enzimas inactivadas) como DIMBOA y DIBOA (desde extractos etéreos de plántulas molidas); a la vez, a partir de este último compuesto y mediante su descomposi

ción térmica en agua, lograron obtener BOA. Con esto rati-
ficaron la relación entre precursores y productos sustenta-
da por Virtanen (Fig. 2A). También postularon una relación
metabólica entre el DIBOA-Glc y el DIMBOA-Glc (Fig. 2C),
proponiendo la vía de síntesis DIBOA-Glc \rightarrow 7-OH DIBOA-Glc
 \rightarrow DIMBOA-Glc, pero no pudieron detectar el compuesto fe-
nólico intermediario, el cual fue aislado posteriormente
por Hofman et al. (1971).

Hofman y Hofmanová (1969) congelaron plántulas de maíz
con nitrógeno líquido y, mediante fraccionamientos por fil-
tración en geles, determinaron la presencia de glucósidos
de 1,4-benzoxazinonas en las plantas intactas; no hallaron
agluconas libres. Thompson et al. (1970) obtuvieron el mis-
mo perfil de elución de glucósidos desde Sephadex G-10. Hof-
man y Hofmanová (1969) encontraron DIMBOA-Glc, HMBOA-Glc,
DIBOA-Glc y HBOA-Glc, siendo ésta una nueva forma lactámi-
ca, el 2-(2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- β -D-glucopirano-
sido (Fig. 1). Les pareció que los hidroxamatos con sus lac-
tamas correspondientes (DIMBOA-Glc con HMBOA-Glc y DIBOA-
Glc con HBOA-Glc) constituyen pares redox. Esto es apoyado
porque, al analizar plántulas de maíz, descubrieron que la
suma Hx + lactama permanecía constante, aunque la relación
de Hx/lactama variaba en distintas porciones del vegetal y
con las condiciones fisiológicas del tejido. En todos los
casos la proporción de Hx fue mayor que la de lactamas. De
acuerdo a las sugerencias de Gahagan y Mumma (1967), se pue-

de suponer que la variabilidad de la proporción Hx:lactama podría deberse a las distintas edades de las porciones analizadas y a un proceso catabólico preponderante al agregar el herbicida atrazina. Además, Hofman y Hofmanová (1969) hallaron otros 3 glucósidos (I-, II- y III-Glc) que no identificaron y que, al parecer, dos de ellos (I- y II-Glc) también correspondían a un par redox.

Ese mismo año, Hofman et al. (1969) publicaron la presencia en maíz del 2-(2,7-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- β -D-glucopiranosido (7-OH HBOA-Glc; Fig. 1), cuyas cantidades en la planta son aproximadamente la décima parte de las del DIMBOA-Glc y del HMBOA-Glc. Este compuesto lactámico es uno de los 3 glucósidos desconocidos (I-Glc) previamente aislados (Hofman y Hofmanová, 1969) y tiene propiedades cromatográficas similares al II-Glc, pero el I-Glc no forma complejos coloreados con FeCl_3 , en tanto que el II-Glc da un intenso color azul, lo cual sugiere que ambos son en realidad un par redox natural. El I-Glc (7-OH HBOA-Glc) fue caracterizado por espectrometría UV, IR, NMR y MS), además de otros análisis químicos.

Klun et al. (1970) publicaron la existencia de otra benzoxazolinona en tejidos secos de maíz, cual es la 6,7-dimetoxi-2-benzoxazolinona (M_2BOA , Fig. 1), cuya estructura la comprobaron por síntesis. Mediante espectroscopía de masas obtuvieron evidencias del precursor hidroxámico pertinente, la 2,4-dihidroxi-7,8-dimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIM_2BOA ,

Fig. 1), existente en el homogenizado de plantas frescas; pero no aislaron el compuesto. Por la similitud estructural entre estos metabolitos secundarios y sus análogos previamente descubiertos, Klun et al. (1970) supusieron la misma relación entre la M_2BOA y sus precursores hidroxámicos DIM_2BOA y $DIM_2BOA-Glc$, ejemplificada en la Fig. 2A. Del mismo modo supusieron una relación metabólica entre los glucósidos hidroxámicos (Fig. 2C) basados en que las concentraciones de benzoxazolinonas y sus proporciones relativas variaban en las plántulas, dependiendo de la raza y del estado de crecimiento.

A mediados del mismo año, Hofman et al. (1970) reportaron la existencia de otro derivado glucosídico de 1,4-benzoxazinonas, el 2-(2-hidroxi-4,7-dimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- β -D-glucopiranosido (4,7 $M_2BOA-Glc$, Fig. 1). Encontraron que este derivado no hidroxámico es el mayor componente, del tipo glucósido de benzoxazinas, en raíces de trigo, maíz y Coix, aun cuando no dieron cifras al respecto. El mayor carácter lipofílico de la 4,7- M_2BOA y su reacción negativa con $FeCl_3$ podría explicar el que esta benzoxazina o su glucósido no se hubiesen aislado antes que lo lograra el grupo de Hofman mediante filtración en geles.

Luego, Hofman y Hofmanová (1971) reportaron el aislamiento del $DIM_2BOA-Glc$ (Fig. 1), aunque su caracterización química fue publicada 2 años más tarde (Hofman y Masojidková, 1973). Con esto, corroboraron el hallazgo de Klun et al.

(1970), quienes habían aportado evidencias, por espectrometría de masas, de la existencia de la DIM₂BOA.

También en 1971, el grupo de Hofman ratificó la existencia de un nuevo par redox de 1,4-benzoxazinonas (Ej. en la Fig. 2B), correspondientes al I-Glc y al II-Glc (Hofman et al., 1969), siendo éstos el 7-OH HBOA-Glc (Fig. 1), previamente identificado (Hofman et al., 1969) y el 2-(2,4,7-trihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- β -D-glucopiranosido (7-OH DIBOA-Glc, Fig. 1). Además, mostraron que sus respectivas agluconas láctica e hidroxámica (7-OH HBOA y 7-OH DIBOA, Fig. 1) constituyen también parejas redox (Ej. en Fig. 2B).

Posteriormente, Hofman y Masojidková (1973), junto con la caracterización del DIM₂BOA-Glc (Fig. 1), publicaron el aislamiento, por filtración en geles, del 2-(2-hidroxi-7,8-dimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- β -D-glucopiranosido (HM₂BOA-Glc, Fig. 1), siendo así nuevamente encontrado el par de derivados hidroxámico y láctico de la misma 1,4-benzoxazinona (Ej. en la Fig. 2B), estando siempre la forma oxidada en mayor concentración en la planta.

Ulteriormente, Woodward et al. (1979b) encontraron que generalmente existe una proporcionalidad directa de las concentraciones de HBOA, DIBOA y HMBOA con las de DIMBOA para 15 variedades de maíz analizadas, aunque no observaron tal correlación con DIM₂BOA. Eso apoya los probables nexos metabólicos de pares redox y de metoxilación.

En resumen, es posible suponer que: i) Sólo se encuentran in vivo las 1,4-benzoxazinas glucosiladas, siendo esto avalado por los resultados experimentales de Hofman y Hofmanová (1971), quienes reportaron la ausencia de 1,4-benzoxazinas libres en plantas no dañadas, incluso de la variedad W 22 (Virtanen y Wahlroos, 1963; Wahlroos y Virtanen, 1964). ii) Existirían nexos metabólicos entre los glucósidos con respecto al estado de oxidación del N (Ej. en la Fig. 2B). iii) Habría conexiones metabólicas entre las diferentes benzoxazinonas en relación con la presencia de metoxilos en el anillo bencénico (Ej. en la Fig. 2C).

2. Métodos para cuantificar DIMBOA y compuestos relacionados en extractos vegetales

Como ya se mencionó, se ha reportado como cuantitativa la producción de benzoxazolinonas desde los ácidos hidroxámicos correspondientes. Virtanen y sus asociados así lo supusieron, llegando incluso a calcular el peso molecular de la DIMBOA basados en los espectros del Hx descompuesto y de la MBOA, así como en el ϵ_{590} de la MBOA, obteniendo una masa molecular de 214 daltons para el hidroxamato (Wahlroos y Virtanen, 1959), pero no consideraron que los demás productos de la degradación de la DIMBOA también absorben a 286 nm, dando una absorbancia total mayor que la de MBOA y similar a la equivalente molar con DIMBOA (Woodward et al., 1978a). Posteriormente, Klun et al. (1969; 1970a)

confiable, por cuanto incluye etapas con pérdidas no medidas (diversas extracciones y lavados, paso por carbón desactivado) y el residuo final usado (fracción glucosídica) contiene aún impurezas, las que pueden variar con la edad y tipo de tejido de las plantas. Brandes y Heitefuss (1971), por su lado, cuantificaron DIMBOA-Glc y DIMBOA por fotometría UV (266 y 263 nm, respectivamente), pero tales procedimientos contemplaban diversas etapas, tales como molida de tejidos, extracción con solventes y cromatografías, de las cuales no exhiben datos de reproducibilidad; tampoco dicen el grado de pureza de los compuestos obtenidos, lo cual es importante saber por las posibles interferencias en las lecturas de absorbancia en el UV. En plantas tratadas con luz (6 y 16 h de fotoperíodo) ellos miden la concentración del DIMBOA-Glc y de la aglucona independientemente, inactivando las enzimas de las plántulas por calor en el primer caso, y permitiendo la hidrólisis total en el segundo, de modo que deberían obtener cantidades equimolares de ambos compuestos. Sin embargo, llegan a tener diferencias de alrededor de 20 % de un hidroxamato sobre el otro, y a la inversa.

Para los propósitos de esta tesis, vale la pena escribir acerca de los métodos fotométricos de Hofman y Hofmanová (1969) y de Hamilton (1964a).

Hofman y Hofmanová (1969) reportaron un método espectrofotométrico para la determinación de los glucósidos de ben

zoxazinas. Su procedimiento involucraba: congelamiento de las muestras en nitrógeno líquido, pulverización en un mortero enfriado, extracción con acetona a -40° , evaporación de la acetona bajo vacío, filtración por Sephadex G-10 y cuantificación de los glucósidos por absorción en el UV. Estos investigadores no mencionaron límites de detección, reproducibilidad del método ni informaron de la homogeneidad de los picos eluidos desde la columna.

Hamilton (1964a) determinó glucósidos y agluconas en extractos de maíz por la formación de complejos azules entre los Hx y el FeCl_3 . Esta combinación química le resultó al adicionar 0,1 ml de FeCl_3 0,1 M a extractos de maíz (eluidos desde cromatogramas en papel) en 1,9 ml de etanol 95%: HCl 0,1 N = 1:1 v/v. Los compuestos más reactivos fueron la DIMBOA y su glucósido, con los cuales hizo curvas estándares (resultaron similares) que siguieron la ley de Lambert-Beer entre 100 y 1000 nmoles /ml. Hamilton supuso que las benzoxazinas análogas del centeno (DIBOA y DIBOA-Glc) daban un color equivalente sobre una base molar. Observó interferencias por una sustancia presente en hojas más viejas, probablemente por algún Hx desconocido en ese momento (como el derivado 7,8-dimetoxilado).

Long et al. (1974), usando la técnica de Hamilton, reportaron un coeficiente de extinción molar (ϵ_{570}) de 800 A/cm. Notaron que el complejo era inestable. Obtuvieron un $r = 0,82$ entre su procedimiento y el de Hamilton. Sugiríe

ron el uso de su método en fitomejoramientos, ya que es más rápido y requiere sólo 0,2 a 0,5 g TF/análisis, aunque la forma en que ellos obtienen las muestras (los trocitos de tejido removidos desde las plantas son puestos en tubos de vidrio y luego congelados durante la noche) permitiría algo de hidrólisis de glucósido y la subsecuente descomposición de la aglucona.

Sullivan et al. (1974) modificaron el procedimiento de Hamilton: las muestras de maíz se congelaron, molieron y refrigeraron en éter toda la noche, y el material extraíble en la fase orgánica se cromatografió en placas de capa fina, se eluyó la banda correspondiente a la DIMBOA, se adicionó un reactivo colorimétrico (con el doble del FeCl_3 usado por Hamilton) y se estimó la cantidad de DIMBOA allí presente por la A a 590 nm. Pero Sullivan y sus colaboradores no determinaron las cantidades de DIMBOA o de su glucósido remanentes en el tejido ni las de la MBOA presentes en el extracto.

Corcuera (1974) modificó el reactivo de FeCl_3 de Hamilton. Usó 5 ml de $\text{HCl} \sim 12 \text{ M}$, 50 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ y 500 ml de etanol 95 % v/v. Al agregar este reactivo a tubos con DIMBOA, obtuvo complejos de color azul intenso con $\lambda_{\text{máx}} = 590 \text{ nm}$ y un $\epsilon_{590} = 1.280 \text{ A/cm}$, coeficiente que es un 52 % más alto que el de Long et al. (1974). Tales diferencias en las absortividades podrían explicarse, en parte, por las diferentes proporciones de los componentes de los reactivos, especialmente del FeCl_3 .

Así, se ve que el método de Hamilton, adecuadamente modificado y usando el reactivo de Corcuera, permitiría cuantificaciones rápidas de Hx presentes en plantas y con límites de detección aceptables: 10 nmoles/ml; por GLC es 2,5 nmoles/ml de acuerdo a Corcuera (1974) y a Woodward (1975). Corcuera encontró que con FeCl_3 la ley de Lambert Beer se mantiene al menos hasta 2 unidades de A, a la vez que las cantidades determinadas por este procedimiento colorimétrico corresponden bastante específicamente a ácidos hidroxámicos, dado que por GLC se determinan similares cantidades de éstos, correspondiendo, por ej., en un 80 % a la DIMBOA presente en extractos de maíz hechos con acetato de etilo (Corcuera et al., 1978). Al analizar 15 variedades de maíz tanto por GLC como por el método del FeCl_3 de Corcuera, se obtuvo una expresión empírica que relaciona los nanomoles de hidroxamatos totales por el método del FeCl_3 (Y) y los nanomoles de DIMBOA obtenidos por GLC (X), cual es: $Y = 0,982 \cdot X + 0,265$ (Woodward, 1975; Woodward et al., 1979b). La pendiente de esa recta ($0,982 \pm 0,021$) indica una correspondencia uno a uno entre la DIMBOA determinada por GLC y los hidroxamatos totales cuantificados por el método del cloruro férrico (para plántulas de 12 días de edad). Tres variedades que estuvieron sobre o bajo la línea de regresión en forma notoria presentaron casi nada de DIBOA o DIM_2BOA (bajo) o una cantidad excepcionalmente alta de DIM_2BOA relativa a la de DIMBOA (so

(Dabed et al., 1983); con Mg tiene una constante de estabilidad no detectable por titulación potenciométrica (Dabed et al., 1983).

3.1.2. Descomposición en soluciones

Desde las primeras publicaciones se ha reportado la descomposición espontánea de las 1,4-benzoxazinonas a las 2-benzoxazolinonas correspondientes (Fig. 2A, pág. 6). Virtanen y sus asociados mostraron que la BOA y la MBOA son productos de degradación de la DIBOA y la DIMBOA, respectivamente (Wahlroos y Virtanen, 1959; Virtanen y Hietala, 1959; 1960; Hietala y Virtanen, 1960; Honkanen y Virtanen, 1960a; 1960b; 1961; Virtanen, 1961; Bredenberg et al., 1962; Virtanen y Wahlroos, 1963). También Honkanen y Virtanen (1961), mediante un método radioquímico, mostraron que la DIBOA se descompone a BOA y ácido fórmico y que este ácido proviene del C número 2 de la DIBOA. Luego, Bredenberg et al. (1962) investigaron la descomposición de la DIBOA en tampones acuosos, encontrando que estas reacciones siguen cinéticas de primer orden y son dependientes de la concentración del anión del compuesto; postularon un mecanismo que incluye una desprotonación del OH hidroxámico y apertura del heterociclo, un ataque nucleofílico del O hidroxámico al carbonilo aldehídico, con liberación del formiato y formación de un isocianato, que se ciclaría para dar BOA. Este mecanismo no requiere la participación de otros compuestos. Después, Virtanen y Wahlroos (1963) mos-

traron cinéticas de descomposición de la DIMBOA a MBOA, tanto en etanol 95 % v/v a 40 °, como en etanol al 20% en éter y óxido de aluminio ácido de Woelm a 20 °; en ambos casos perseguían tan sólo demostrar que la MBOA encontrada por el grupo de Beck en sus extractos era un artefacto de manipulación.

En muchos trabajos se ha supuesto que los Hx se degradan cuantitativamente a las benzoxazolinonas pertinentes (pág. 13). Sin embargo, ya en 1959, Wahlroos y Virtanen habían encontrado que la aglucona, disuelta en amoníaco al 25 % en agua, se transformaba sólo parcialmente a MBOA. Además, Hietala y Virtanen (1960) observaron cualitativamente que la producción relativa de BOA disminuía al aumentar la concentración de DIBOA. Luego, en 1962, Hamilton et al. encontraron que, mediante la descomposición térmica de la DIMBOA en solución acuosa, no lograban obtener la cantidad de productos esperados.

Tipton et al. (1971), estudiando la catálisis por DIMBOA de la hidrólisis de simazina, encontraron que el Hx prácticamente no se descomponía en soluciones acuosas (simazina 1 mM y DIMBOA 2 mM) durante 15 días a 37 °. Sin embargo, tales aseveraciones fueron basadas en que ellos no vieron productos de descomposición de la aglucona en placas finas de silica gel y, a juzgar por la apariencia de estas placas, la cantidad de DIMBOA no disminuía con el transcurso de la reacción.

Queriendo determinar concentraciones de DIMBOA basados en la producción de MBOA por GLC, Tang et al. (1975) intentaron corregir sus resultados no sólo por las pérdidas de MBOA ocurridas en su procedimiento, sino también por su probable producción no estequiométrica. Para esto, descomponían DIMBOA y la MBOA obtenida la usaban como estándar en sus análisis para la aglucona, pero ellos no degradaron DIMBOA para estándares en la presencia de los mismos solutos y en el mismo pH y temperatura en que se descomponían las muestras incógnitas. Variaciones de estas condiciones también son fuentes de error, pues se comprobó que la velocidad de tal reacción degradativa depende, además de la temperatura, del pH (Woodward et al., 1978a; Niemeyer et al., 1982) y de la composición del medio en que se encuentre la DIMBOA (Woodward et al., 1978a).

La velocidad de desaparición del hidroxamato es alta en relación con el tiempo requerido en algunos procedimientos usados para demostrar la actividad biológica de la DIMBOA (Corcuera et al., 1978; Couture et al., 1971; Dawe, 1973; Klun et al., 1967; Long et al., 1977; Woodward et al., 1978a). El período de semidescomposición de la DIMBOA cambia a medida que se altera el pH (Woodward et al., 1978a). La DIMBOA se descompone por la acción de la luz, especialmente la ultravioleta ($\lambda = 230 - 315$ nm; Arcaya et al., 1978). Debido a lo anterior, los resultados de experimentos de inhibición del crecimiento poblacional de diversos

organismos deben ser corregidos (Woodward et al., 1978b), tanto aquéllos de duración similar o mayor que la vida media de descomposición como aquéllos en que se cuantifican los productos y se correlacionan cuantitativamente con los precursores. Más aún, resultados de Bravo, H. R. (comunicación personal) indican que la MBOA también es inestable en soluciones acuosas, aunque su vida media de descomposición es más de 7 veces superior a la de la DIMBOA (determinada a pH 3 y 53 °), y que se obtienen diferentes rendimientos de MBOA en distintos solventes. Además, la MBOA también presenta degradación fotoquímica (Arcaya et al., 1978).

Por otro lado, Smissman et al. (1972) sintetizaron varios análogos de la DIBOA y estudiaron la cinética y los productos de su degradación; con base en sus resultados, ellos propusieron un mecanismo para la reacción de descomposición sustancialmente diferente del propuesto por Brendenberg et al. (1962). El grupo de Smissman sostiene que el agua participaría en la reacción degradativa en la etapa determinante, según la siguiente secuencia de reacciones parciales: i) apertura del hemiacetal; ii) formación de un hemiacetal por ataque nucleofílico del O fenólico al carbonilo cetónico (con formación de un anillo de 5 miembros); iii) ataque del agua al aldehído en posición 2; iv) salida de un H⁺ desde un OH del C número 2 saliente; v) salida de ácido fórmico desde la posición 2 y del OH en

en posición 4, con formación del tautómero de MBOA; y vi) tautomerización para formar MBOA. De este modo, el agua sería esencial en la descomposición de la DIMBOA.

Posteriormente, Niemeier et al. (1982) y Bravo et al. (1983) aportaron datos que sugieren que el mecanismo de Bredenberg es correcto, puesto que: i) obtienen MBOA a partir del Hx en solventes no acuosos; ii) los valores de las constantes cinéticas observadas en agua a diversos pH son consistentes con ese modo de degradación; iii) la constante observada en agua a pH 3 cae en la recta - $\text{Log } K_{\text{obs}}$ Vs. donicidad, obtenida con diversos solventes no acuosos; iv) la velocidad de descomposición en solventes no acuosos no varía al agregar agua al solvente. Estos resultados avalan la hipótesis que el agua sólo actúa como solvente en la degradación de la DIMBOA, y no como catalizador o reaccionante, según lo propuesto por Smissman et al. (1962).

En resumen, es generalmente aceptado que: i) en las plantas intactas se encuentran los glucósidos de los ácidos hidroxámicos cíclicos y de las lactamas; ii) al romperse los tejidos, los glucósidos quedan en contacto con alguna β -glucosidasa que cataliza sus hidrólisis, liberándose glucosa y las agluconas respectivas; iii) las agluconas hidroxámicas se descomponen a las benzoxazolinonas correspondientes.

3.2. Propiedades biológicas

Los ácidos hidroxámicos de gramíneas y sus compuestos relacionados fueron tempranamente estudiados como factores de resistencia a enfermedades de plantas, y se ha propuesto que participan en otras funciones de la planta, como por ejemplo: nutrición mineral (especialmente del Fe), desintoxicación por herbicidas, mutagenicidad, estimulación de la reproducción en roedores, y otras. Un resumen de estas propiedades se muestra en las Tablas I y II (pág. 47) y a continuación se proporcionan algunos detalles al respecto.

3.2.1. Resistencia contra enfermedades

Al mediar la década de 1950, se descubrieron algunas 2-benzoxazolinonas (BOA y MBOA), las que se consideraron como factores de resistencia contra enfermedades de plantas, por cuanto inhibían el crecimiento de hongos o insectos (Virtanen y Hietala, 1955; Virtanen et al., 1956a; 1956b; 1957; Beck y Stauffer, 1957; Loomis et al., 1957). Pero luego, Virtanen y su grupo observaron que otros extractos de gramíneas producían tal efecto aun cuando en ellos casi no había 2-benzoxazolinonas (Virtanen y Wahlroos, 1958), mostrando posteriormente que los ácidos hidroxámicos cíclicos eran los factores inhibitorios primarios (Wahlroos y Virtanen, 1959a; 1959b; 1964; Virtanen y Hietala, 1959; Honkanen y Virtanen, 1960c; Virtanen, 1961; Virtanen y Wahlroos, 1963).

Tabla I. Organismos afectados por DIMBOA y/o compuestos relacionados.

ORGANISMOS	FRACCION O COMPUESTO ENSAYADO	REFERENCIAS
A. HONGOS		
<u>Aspergillus niger</u>	MBOA, BOA	Virtanen et al., 1957
<u>Cercospora herpotrichoides</u>	Trigo tratado con sima- zina o monolinurona	Brandes y Heitefuss, 1971
<u>Diplodia zeae</u>	Material soluble en éter (maíz) Extractos acuosos de maíz MBOA	Johann y Dickson, 1945 Beck y Stauffer, 1957
<u>Erysiphe graminis</u>	Trigo tratado con sima- zina o monolinurona	Whitney y Mortimore, 1959b; Loomis et al., 1957
<u>Fusarium moniliforme</u>	Extractos etéreos de maíz MBOA	Brandes y Heitefuss, 1971 Whitney y Mortimore, 1959a; 1962
<u>Fusarium nivale</u>	MBOA, BOA DIBOA	Whitney y Mortimore, 1959b Virtanen et al., 1957
<u>Fusarium spp.</u>	DIMBOA, DIMBOA-Glc DIBOA-Glc MBOA	Honkanen y Virtanen, 1960a; Virtanen y Hietala, 1959b Wahlroos y Virtanen, 1959b Virtanen y Hietala, 1959b Beck y Smisssman, 1961

Tabla I. Continuación.

<u>Gibberella zeae</u>	Fracciones crudas de maíz	Barnes, 1959; Whitney y Mortimore, 1959a; Whitney y Mortimore, 1962
	MBOA	Barnes, 1960 Molot, 1965
<u>Helminthosporium maydis</u>	MBOA, DIMBOA, BOA, DIBOA	Dawe, 1973
<u>Helminthosporium turcicum</u>	DIMBOA	Couture et al., 1971; Long et al., 1975; 1978
<u>Mucor sp.</u>	MBOA	Molot, 1965
<u>Penicillium chrysogenum</u>	MBOA, BOA	Virtanen et al., 1957
	MBOA, BOA	Beck y Smisson, 1961
	Extractos acuosos de maíz	Beck y Stauffer, 1957
	MBOA	Loomis et al., 1957
<u>Penicillium roquefortii</u>	MBOA, BOA	Virtanen et al., 1957
<u>Phoma herbarum</u>	DIMBOA-Glc, DIMBOA, MBOA	Brandes y Heitefuss, 1971
<u>Puccinia graminis</u>	DIMBOA, MBOA, BOA	Elnaghy y Linko, 1962; Elnaghy y Show, 1966; Knott y Kumar, 1972
<u>Pyrenochaeta terrestris</u>	MBOA	Whitney y Mortimore, 1959b
<u>Rhizopus stolonifera</u>	Extractos acuosos de maíz	Beck y Stauffer, 1957
<u>Sclerotinia trifoliorum</u>	MBOA, BOA	Virtanen et al., 1957
<u>Torulopsis utilis</u>	MBOA, BOA	Virtanen et al., 1957

Tabla I. Continuación.

B. BACTERIAS

<u>Erwinia carotovora</u> ,	Extractos acuosos de maíz	Hartman, 1971
<u>E. Chrysanthemi</u> ,	DIMBOA, MBOA, plantas de	Corcuera, 1974;
<u>E. stewartii</u>	maíz	Corcuera et al., 1978; Woodward et al., 1978b; Lacy et al., 1979
<u>Escherichia coli</u>	MBOA, BOA	Virtanen et al., 1957
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	MBOA, BOA	Virtanen et al., 1957
<u>Salmonella typhimurium</u>	DIMBOA, DIBOA	Hashimoto et al., 1979
<u>Staphylococcus aureus</u>	MBOA	Beck y Stauffer, 1957; Virtanen et al., 1957

C. INSECTOS

<u>Blatella germanica</u>	Extractos acuosos de maíz	Beck y Stauffer, 1957
<u>Prodenia cridania</u>	Extractos acuosos de maíz	Beck y Stauffer, 1957
<u>Galleria mellonella</u>	MBOA	Beck y Smissman, 1961
<u>Ostrinia nubilalis</u>	MBOA	Beck y Stauffer, 1957; Loomis et al., 1957; Smissman et al., 1957
	MBOA, BOA	Beck y Smissman, 1961; Klun y Brindley, 1966
	DIMBOA	Klun et al., 1967
	Plantas de maíz	Klun y Robinson, 1969; Klun et al., 1970
<u>Rhopalosiphum maydis</u>	DIMBOA	Long et al., 1977; Corcuera et al., 1982

Tabla I. Continuación.

<u>Metopolophium dirhodum</u>	DIMBOA, MBOA, plantas y hojas de cereales	Argandoña et al., 1980
<u>Shizaphis graminum</u>	DIMBOA, plantas de cereales	Corcuera et al., 1982
D. PLANTAS		
<u>Triticum compactum</u>	DIMBOA, plantas de trigo	Argandoña et al., 1981
<u>Triticum durum</u>	DIMBOA, DIMBOA-Glc, plantas de cereales	Corcuera et al., 1982
<u>Avena sp.</u>	Extractos de trigo con DIMBOA, MBOA, BOA	Elnaghy y Linko, 1962
<u>Hordeum distichum</u>	MBOA, BOA	Elnaghy y Linko, 1962
	BOA	Virtanen et al., 1957
	DIMBOA	Argandoña, V. H., com. pers.

Es así que el grupo de Virtanen examinó la existencia de posibles sustancias antifúngicas en plantas de la familia Gramineae, encontrando que al menos en una etapa temprana del desarrollo, hay concentraciones suficientes como para inhibir el crecimiento de ciertos organismos en el vegetal. Así, Virtanen y Hietala (1955) y Virtanen et al. (1956a; 1956b; 1957) estudiaron inicialmente el efecto de la BOA y la MBOA sobre algunos hongos (Fusarium nivale, Sclerotinia trifoliorum, Aspergillus niger, Penicillium roquefortii, Mucor sp. y Torulopsis utilis) y bacterias (Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens y Escherichia coli) y hallaron que todos estos microbios eran inhi- bidos en un rango de 0,3 a 1 mg/ml de sustrato. Luego, Honkanen y Virtanen (1960c) estudiaron el efecto antimicrobiano de diversos derivados artificiales de 1,4-benzoxazinas, incluida la DIBOA, encontrando que ésta inhibía el crecimiento de F. nivale, S. aureus, P. fluorescens y E. coli (1,7 mg/ml de sustrato ejercía un efecto total). Además, la DIBOA tenía una actividad intermedia entre los derivados con los C números 2 y 3 oxidados (los menos in- hibitorios) y los compuestos con esos átomos reducidos (los más activos). Virtanen y sus asociados también encontraron que: i) el OH hidroxámico es importante en la actividad an- timicrobiana (Honkanen y Virtanen, 1960c); ii) el metoxilo en el anillo bencénico no influye significativamente en el efecto inhibitorio de la benzoxazolinona sobre el cre-

cimiento microbiano (Wahlroos y Virtanen, 1959b). Como corroboración de esto último, también hallaron que la DIMBOA se comportaba de modo similar al de la DIBOA, actuando ambas principalmente como fungistáticos sobre F. nivale a concentraciones cercanas a 0,1 mg/ml de sustrato, en que el efecto es casi total (Wahlroos y Virtanen, 1959b; Honkaniemi y Virtanen, 1960c). El hecho que se determinara que el se moho fuera inhibido por las agluconas en el mismo rango de concentraciones que las benzoxazolinonas (Wahlroos y Virtanen, 1959b), puede deberse al largo tiempo usado para los ensayos (varios días), por lo cual en realidad estaría viéndose, en gran medida, el efecto de los productos de degradación (BOA o MBOA). Por otra parte, en el laboratorio de Virtanen, se encontró que el hongo F. nivale era poco afectado por los glucósidos de DIBOA (Virtanen y Hietala, 1959b) y de DIMBOA (6 mg/ml de sustrato causaba 50 % de inhibición; Wahlroos y Virtanen, 1959b).

En esos mismos años, otros grupos mostraron que las benzoxazolinonas inhiben diversos organismos, incluyendo hongos, bacterias e insectos. Beck y Smismann (1961) estudiaron las propiedades inhibitorias del crecimiento de más de 50 análogos químicos de la BOA, usando larvas del insecto perforador del maíz Ostrinia nubilalis y cultivos de Penicillium chrysogenum como organismos de prueba; mostraron que la concentración que inhibía en un 50 % el crecimiento (I_{50}) era aproximadamente 2 mM para BOA y MBOA, tan

to de las larvas como de las colonias fúngicas. Aunque tal inhibición fue relativamente baja respecto de los demás compuestos ensayados, la I_{50} de la MBOA (pero no la de la BOA) está dentro del rango de concentraciones existentes en extractos de algunas variedades de gramíneas resistentes (Klun y Robinson, 1969).

Elnaghy y Linko (1962) cuantificaron el DIMBOA-Glc por espectrometría ultravioleta (aunque no dan los valores de concentración) y encontraron una correlación entre la concentración del glucósido en diversas variedades de trigo y la resistencia de estas plantas contra el hongo causante de la roya en el tallo, Fuccinia graminis. Hallaron que el DIMBOA-Glc no inhibía el desarrollo del parásito en hojas cortadas y cultivadas en medio acuoso, pero no lo probaron directamente sobre el hongo cultivado. Inversamente, inoculaciones de uredosporas en cañas de maíz no alteraban significativamente las concentraciones de la fracción de DIMBOA-Glc. La DIMBOA (4 mM) prevenía casi completamente el crecimiento del patógeno en hojas cultivadas, causando simultáneamente una fitotoxicidad considerable. Con BOA y MBOA obtuvieron resultados similares, tanto en cultivos de hojas escindidas como en plantas enteras. En ensayos de germinación de las uredosporas fúngicas encontraron que éstas eran también inhibidas por DIMBOA y MBOA, aunque no dicen las concentraciones usadas. También hallaron que el contenido de glucósido disminuía marcadamente

en las áreas necróticas amarillas de trigo resistente infectado por el hongo, lo cual los llevó a sugerir un rompimiento enzimático del DIMBOA-Glc a la aglucona ante el daño de la célula hospedera. Consecuentemente, ellos postularon que la resistencia del trigo a la roya del tallo depende, al menos parcialmente: i) de la liberación enzimática de DIMBOA ante la infección incipiente del hongo; ii) de la muerte de las células hospedantes debido a la fitotoxicidad de esta aglucona; y iii) subsecuentemente, del retardo en la germinación de las uredosporas y en el crecimiento micelar. Cabría agregar que los efectos ii) y iii) son debidos no sólo a los hidroxamatos libres, sino también a las benzoxazolinonas formadas ulteriormente.

Posteriormente, BeMiller y Pappelis (1965a) cuantificaron indirectamente y de modo no muy confiable (ver pág. 14) el contenido de DIMBOA-Glc en el tejido medular internodal de las cañas de maíz (4 variedades) y lo relacionaron con la resistencia a la putrefacción del tallo causada por el hongo Diplodia zeae. Postularon una resistencia a la penetración del hongo en la caña con base en el contenido de DIMBOA-Glc en la médula, a pesar que ellos mismo habían encontrado previamente una concentración de la fracción de MBOA 50 % mayor en la corteza que en la médula y habían relacionado cuantitativamente las fracciones de MBOA con el contenido de DIMBOA-Glc (BeMiller y Pappelis, 1965b).

Por otro lado, Klun y Robinson (1969), mediante dilución isotópica, determinaron las concentraciones de BOA y de MBOA en tejidos secos de 5 variedades de maíz, en diversos estados del desarrollo, y las relacionaron estequiométricamente 1:1 con el contenido de DIBOA y DIMBOA en los tejidos (ver pág. 13). Por inspección visual determinaron los grados de resistencia de las plantas contra larvas del insecto perforador del maíz, Ostrinia nubilalis, observando que aquellas variedades que mantenían altas concentraciones en sus diferentes estados del desarrollo eran resistentes al insecto. También encontraron una resistencia intermedia en la variedad B 49 (cuyos extractos presentan altos niveles de MBOA durante el estado de la polinización), atribuyendo tal efecto a la DIMBOA que se liberaría enzimáticamente (ante el ataque de las larvas al comer los tejidos). Otras 2 variedades contenían bajas concentraciones de DIMBOA y fueron susceptibles al insecto. Sin embargo, los bajos niveles de DIMBOA presentes en las variedades resistentes B 52 y CI 31 A durante la polinización indican que este compuesto no es un factor en la defensa expresada por estas razas en tal estado del desarrollo, indicando que habría otros agentes que provocarían tal resistencia (Klun y Robinson, 1969), aun cuando ésta es cualitativamente inferior a la ocasionada por DIMBOA.

Posteriormente, Klun et al. (1970) usaron un grupo dialélico de 11 razas de maíz para estudiar la concentración

de DIMBOA (midiendo MBOA por dilución isotópica) en las hojas jóvenes y la resistencia contra la primera infestación por O. nubilalis; encontraron coeficientes de correlación estadísticamente significativos, tanto para el caso de las variedades puras ($r = - 0,89$) como para los cruzamientos simples ($r = - 0,74$). Estos resultados y otros obtenidos en el mismo estudio les proveyeron mayores evidencias para decir que la DIMBOA es un factor químico en la resistencia del maíz contra las larvas perforadoras.

Luego, Brandes y Heitefuss (1970) observaron que en plantas de trigo tratadas con los herbicidas simazina o monolinurona se reducía la incidencia de la enfermedad causada por los hongos Erysiphe graminis y Cercospora herpotrichoides, mostrando, entre otros motivos, que después de la aplicación de cualquiera de ambos herbicidas, la concentración del DIMBOA-Glc aumentaba en 1/3, en tanto que la de DIMBOA se incrementaba alrededor de la mitad; pero sus procedimientos para cuantificar permiten poca precisión (ver pág. 15). Además, vieron que la MBOA y la DIMBOA actuaron como fungistáticos sobre Phoma herbarum (siendo la benzoxazolinona la más activa), en tanto que el DIMBOA-Glc no ejerce efecto alguno.

Por otra parte, Hofman y Hofmanová (1971) colocaron plántulas de maíz de 3 cm de largo en discos de vidrio con papel filtro sumergido en 5 mm de una solución al 0,1 % de una mezcla de agluconas, las que fueron previamente

disueltas en etanol (dicen unas pocas gotas) y diluidas con agua. Después de 24 h, el crecimiento de las plántulas se detuvo completamente y en 5 días ellas murieron. No hicieron controles con etanol solo diluido en agua y tampoco probaron los glucósidos. Además, hojas de cebada (Hordeum distichum; no posee hidroxamatos cíclicos naturalmente) colocadas en soluciones de DIMBOA incorporaron esta aglucona, la cual habría causado clorosis en esos órganos (Argandoña, V. H., com. pers.). Todas estas manifestaciones de fitotoxicidad se apreciaron con concentraciones de Hx libres (o benzoxazolinonas) inferiores a las factibles de encontrar en extractos de gramíneas. Además, Virtanen et al. (1957) encontraron que la BOA previene la germinación de carióspsides de avena en una concentración de alrededor de 0,5-1 mg/fruto, aunque esta concentración es alta en comparación a las posibles de encontrar en plantas, que no excederían de 0,035 mg BOA/fruto o de 0,18 mg MBOA/fruto. Estos resultados aportan también evidencias acerca de: i) la no existencia de benzoxazinas libres ni de benzoxazolinonas en las plantas vivas (Hofman y Hofmanová, 1971), excepto en las zonas dañadas del vegetal (Elnaghy y Linko, 1962); ii) que parte de la resistencia de gramíneas contra microorganismos infectantes se debería al aislamiento de éstos en zonas necróticas de la planta y posterior inhibición del desarrollo microbiano por deficiencias nutricionales (Elnaghy y Linko, 1962).

Considerando que la DIMBOA no sufre una descomposición con una estequiometría definida en soluciones acuosas (Woodward et al., 1978a), se mostró que es la DIMBOA el mayor componente activo en aquellos extractos de maíz que son inhibitorios contra especies del género Erwinia causantes de la pudrición blanda en el maíz (Corcuera et al., 1978). Además, en cultivos bacterianos: i) al determinar la actividad antimicrobiana con DIMBOA degradada (por 1, 2, 3 o 10 vidas medias) adicionada al medio, se detectó relativamente poca inhibición (Woodward et al., 1978a); ii) la MBOA no retardó la fase de latencia (aun cuando disminuyó la velocidad del crecimiento exponencial bacteriano, actuando en concentraciones 5 veces más alta que en el caso del Hx); iii) no se vieron efectos sinérgicos entre MBOA y DIMBOA. Por ello, es factible descartar la posible inhibición por los productos de degradación de la aglucona, en que la MBOA es el mayoritario (Woodward et al., 1978b).

La actividad inhibitoria de la DIMBOA sobre Erwinia carotovora (no patógena al maíz) y E. chrysanthemi (patógena) es afectada por diversos factores (Woodward et al., 1978b), tales como: i) la población inicial de células: a mayor inóculo, menor efecto provocado por la aglucona; ii) la temperatura: los autores, para predecir la inhibición del Hx sobre esos microbios, presentaron una fórmula teórica en que se consideraron parámetros de la inestabilidad química de la aglucona y de la concentración umbral de

ésta que permite el crecimiento bacteriano; sin embargo, tal modelo no resultó suficiente para dar cuenta de los datos observados (Corcuera et al., 1978; Woodward et al., 1978b); iii) el pH del medio: estos últimos investigadores vieron que, al realizar ensayos a pH 5,5, la E. carotovora fue más inhibida que a pH 6,75, supuestamente debido a la mayor estabilidad de la aglucona al pH inferior. Sin embargo, la E. chrysanthemi fue sustancialmente menos inhibida al pH más bajo, cuya razón sería relevante a la patogenicidad de esta especie, ya que el pH del jugo de plantas de maíz molidas es cercano a 5,5. Woodward et al. (1978b) dicen no poder explicar la intrigante propiedad de la DIMBOA de ser capaz de inhibir células bacterianas después de desaparecer del medio. Concluyen que es posible que exista algún producto de descomposición inhibitorio que no pudieron detectar. No estudiaron el efecto de la temperatura sobre el umbral de inhibición. Tampoco analizaron la incorporación a las células, tanto del Hx como de la MBOA.

Lacy et al. (1979) estudiaron 68 cepas de Erwinia. Midieron la susceptibilidad hacia la DIMBOA por difusión en agar; incluyeron 34 razas de E. chrysanthemi aisladas desde maíz (EC_z), 25 de E. chrysanthemi aisladas desde otros hospederos (EC_o) y 9 de E. carotovora (EC). De las variedades de EC_z , el 80 % fueron relativamente resistentes contra la DIMBOA, en tanto que el 96 % de las EC_o y

el 89 % de las EC resultaron relativamente susceptibles. Basados en esto, adujeron que la relación entre el hospedero original y la resistencia contra la DIMBOA puede reflejar una respuesta del patógeno hacia el hábitat dentro de una planta de maíz; y como el 80 % de las cepas de EC_Z fueron resistentes al Hx, dedujeron que este compuesto es, probablemente, un agente que ejerce una presión selectiva sobre las razas patógenas al maíz, pero a algún nivel distinto del de la resistencia primaria del hospedero. Esto último lo avalan notando que, en plantas de maíz (relacionadas genéticamente) inoculadas con cepas de EC_Z resistentes y susceptibles a DIMBOA, en general no hubo diferencias significativas en cuanto a % de plantas infectadas, proporción de plantas resistentes y dosis efectiva media. Más aún, al menos 7 razas de EC_O susceptibles hacia la aglucona fueron moderadamente patógenas en plantas de maíz con DIMBOA (variedad W 117^{Ht}). También habría apoyo parcial por el descubrimiento de Klun y Robinson (1969), en que dos variedades de maíz con bajos niveles de DIMBOA fueron resistentes al ataque del insecto Ostrinia nubilalis.

Sin embargo, las conclusiones de Lacy et al. (1979) no son muy seguras por cuanto en sus ensayos no consideraron: i) pérdidas de la actividad inhibitoria de la aglucona (Corcuera et al., 1978; Woodward et al., 1978b); ii) el probable efecto negativo de algunos productos de degradación del Hx (como MBOA) sobre algunas variedades de Er-

winia, que podrían resultar tan inhibidas por la aglucona como por la benzoxazolinona (Wahlroos y Virtanen, 1959b; Elnaghy y Linko, 1962); iii) la incorporación del Hx a las células bacterianas; iv) la concentración de la DIMBOA en los tejidos inoculados; v) el efecto del pH sobre las 68 razas analizadas. A pesar de lo anterior, el probable rol de los Hx como agentes selectivos es avalado en parte por Corcuera et al. (1982; ver pág. 42).

Ulteriormente, se ha estudiado el rol que juegan los ácidos hidroxámicos en la resistencia de algunos cereales contra áfidos. Realizando ensayos con hembras ápteras, se ha propuesto que:

a) Los ácidos hidroxámicos existentes en la planta actúan como factores protectores contra Metopolophium dirhodum (Argandoña et al., 1980). Como apoyo de esta sugerencia, estos autores mostraron que: i) la tasa diaria del crecimiento poblacional del insecto se hace menor en gramíneas con concentraciones de Hx cada vez más altas (se estudiaron 4 especies); ii) la concentración de Hx en gramíneas se correlaciona con la resistencia al áfido, tanto para los ácidos encontrados naturalmente ($r = - 0,96$) como para el caso de la incorporación de DIMBOA en hojas escindidas de cebada ($r = - 0,94$); iii) la DIMBOA en concentraciones similares a las existentes en plantas resistentes, resulta deletérea para ninfas alimentadas con dietas artificiales. También estos autores observaron que la MBOA

causa una mortalidad baja sobre pulgonas juveniles alimentadas artificialmente durante 24 h ($I_{50} > 25$ mM), efecto que es menos de un 7 % del ocasionado por la DIMBOA ($I_{50} \cong 2,5$ mM) con lo cual muestran que es insignificante la contribución de este producto de descomposición a los resultados obtenidos en los bioensayos con DIMBOA.

Por otra parte, los autores encontraron que la tasa del crecimiento poblacional aparece más afectada por la DIMBOA incorporada en hojas cortadas de cebada que por la concentración de ácidos hidroxámicos en las plantas intactas, siendo el efecto 8,5 veces mayor en el primer caso. A este respecto no dan explicaciones y, aunque no lo señalan, posiblemente se debe a que midieron sólo los Hx que quedaban en los nomófilos al final del experimento, sin considerar que antes pudo haber mayores concentraciones, dada su cualidad de degradarse. Más aún, Argandoña et al. (1980) cultivaron hojas (infestadas con áfidos) durante 6 días en soluciones acuosas de DIMBOA a pH 5 y 25 ° (vida media de DIMBOA = 3,5 días; Woodward et al., 1978a), en las cuales alrededor de un 70 % de la aglucona se habría descompuesto, originándose MBOA y otros productos que también pudieron haber contribuido a la inhibición.

Por otra parte, es factible suponer que el crecimiento de la población de insectos fue más influido en el caso de la incorporación de DIMBOA no sólo por la acción directa del Hx (y de la MBOA), sino también por la

falta de nutrientes en los nomófilos de la cebada (debida a efectos nocivos de los inhibidores sobre esos órganos) y quizá por la presencia de otros catabolitos tóxicos (como algunos subproductos de descomposición de la aglucona).

b) La distribución poblacional en gramíneas del áfido Schizaphis graminum sobre hojas de diferentes edades, es regulada por el contenido de ácidos hidroxámicos (Argandoña et al., 1981). Para apoyar esto, ellos acopiaron las siguientes evidencias: i) en ensayos realizados con plantas de cebada y trigo (de 63 días de edad) infestadas al azar con áfidos, observaron una correlación lineal inversa entre el ln de la población final sobre cada una de las 3 hojas más jóvenes, y su concentración de Hx; ii) la DIMBOA causó una disminución en la sobrevivencia de ninfas alimentadas con dietas artificiales (I_{50} : 1,9 mM a las 24 h y 0,3 mM a las 48 h).

c) Se requiere la hidrólisis del glucósido durante la infección para que se manifieste la resistencia a los áfidos (Corcuera et al., 1982). Para sustentar esta hipótesis, los autores mostraron que, al alimentar ninfas de S. graminum con dietas artificiales, DIMBOA 1 mM redujo el número de áfidos a un 13 %, mientras que el DIMBOA-Glc lo hizo sólo a un 88 %. Además, ellos observaron que: i) existe una correlación negativa entre la concentración de Hx en extractos vegetales y la resistencia de cebada, varios cultivos de trigo, triticale y maíz contra Metopolophium dirho-

dum y S. graminum; ii) la DIMBOA afectó de manera diferente la sobrevivencia de ninfas de 3 especies alimentadas con dietas artificiales durante 48 h; la mortalidad fue mayor en S. graminum ($I_{50} \approx 0,4$ mM), intermedia en M. dirhodum ($I_{50} \approx 1,3$ mM) y poco notoria en Rhopalosiphum maidis (< 10 % con 2 mM). Con esto, y sabiendo que el maíz (gramínea con mayor concentración de Hx) es menos resistente a R. maidis que a otras especies de pulgones (ver i), los autores postularon que la susceptibilidad diferencial de los áfidos hacia los ácidos hidroxámicos puede determinar su preferencia por diversos hospederos; iii) en ensayos efectuados con ninfas de S. graminum nutridas con dietas artificiales, se obtiene una correlación lineal negativa entre el Log del índice reproductivo del pulgón y la concentración de DIMBOA (0 a 0,1 mM). Con esto, los autores concluyeron que el Hx decrece la tasa de reproducción a bajas concentraciones y llega a ser letal con otras superiores. Luego, con concentraciones intermedias se tendrían ambos efectos, como aparentemente ocurrió en el experimento de distribución de S. graminum en diferentes hojas de trigo (Argandoña et al., 1981).

Por otra parte, Corcuera et al. (1982) manifestaron desconocer el tipo de acción que ejercen los Hx sobre los áfidos. Mencionan que tales compuestos pueden actuar como repelentes o por toxicidad directa. Durante el desarrollo de esta tesis, en su laboratorio se han acumulado

evidencias de que tanto el DIMBOA-Glc como la aglucona agtúan mediante ambos mecanismos, siendo más tóxica esta última.

En resumen, podría decirse que en las plantas in-tactas están los glucósidos de ácidos hidroxámicos (poco efectivos como antipatógenos), pero se hidrolizarían ante una infección (Elnaghy y Linko, 1962) o cuando las célu-las mueren (BeMiller y Pappelis, 1965a), liberándose las agluconas (activas como antipatógenos), a lo que seguiría la muerte de las células afectadas debido a la fitotoxici-dad de los hidroxamatos libres (Hofman y Hofmanová, 1971; Elnaghy y Linko, 1962; Argandoña, V. H., com. pers.). Con esta necrosis celular se retardaría el crecimiento pobla-cional de los fitopatógenos no sólo por deficiencia nutri-cional en la zona infectada (caso de hongos y bacterias), sino también por los efectos repelentes (caso de insectos) y/o inhibitorios de las agluconas (caso de hongos, bacte-rias e insectos). Subsecuentemente, también las benzoxazo-linonas formadas al descomponerse las agluconas podrían e-jercer efectos negativos sobre los fitopatógenos.

En general, hasta ahora en esta tesis se ha entre-gado un cúmulo de evidencias tendientes a demostrar que en ciertas gramíneas existen factores químicos que les otor-gan resistencia contra diferentes agentes patógenos (Ta-bla I). Sin embargo, muchos trabajos (de los aquí analiza-dos y de otros mencionados en la Tabla I) son incomple -

tos en cuanto a determinar el rol que tales Hx juegan en la defensa vegetal, ya que no cumplen completamente con ciertos criterios básicos, como los esbozados de manera diversa por Salgado (1980). Tales importantes criterios consisten en establecer que el compuesto estudiado (y no otro(s), como algún(os) producto(s) catabólico(s)):

- 1º Disminuye la población del patógeno potencial y/o impide, retarda o reduce su crecimiento poblacional, ya sea porque provoca mortalidad en el organismo atacante, o porque lo repele, o porque hace decrecer su tasa de reproducción y/o de desarrollo.
- 2º Existe o se forma en las plantas resistentes en las concentraciones necesarias para provocar los efectos mencionados precedentemente, en los lugares donde ocurre el ataque (sean órganos, tejidos o células) y en el momento en que la resistencia se manifiesta.
- 3º No existe ni se forma en los vegetales susceptibles, en las concentraciones, lugares y momentos apropiados para provocar los efectos negativos señalados.
- 4º Confiere protección a las plantas susceptibles cuando es incorporado a ellas.

Aun cuando en particular en ninguno de los trabajos precedentemente analizados se demuestra la validez de todos los principios ya señalados, éstos se cumplen para la DIMBOA según puede deducirse del conjunto de tales investigaciones, aunque faltaría demostrar la presen

cia del Hx en los tejidos y células donde ocurre el ataque por los patógenos.

También los Hx han atraído la atención de los investigadores hacia su probable desempeño en otros papeles de la organización y funcionamiento vegetales (ver más adelante y Tabla II), casos en los cuales deben cumplirse criterios equivalentes a los precedentes.

3.2.2. Nutrición mineral

En la naturaleza se conocen compuestos con 1, 2 o 3 grupos hidroxámicos por molécula. Los trihidroxamatos forman, con el ión férrico, complejos estables llamados siderocromos o sideróforos (como las ferrioxaminas y los ferricromos), de los que se piensa juegan un rol en el metabolismo de los iones metálicos en microorganismos, donde se ha estudiado extensamente el transporte de fierro (ver revisiones por Neilands, 1967; 1981; Emery, 1971 y Lankford, 1973). Se ha considerado importante las altas constantes de estabilidad ($K \cong 10^{30}$) de los complejos férricos para que los siderocromos funcionen como transportadores de fierro. Sin embargo, ácidos mono- y di-hidroxámicos también forman fuertes complejos ($K \cong 10^{20}$) con átomos de fierro trivalente, involucrándoselos también en el metabolismo del metal y otras funciones en microorganismos (ver pág. 58), como es el caso de las micobactinas P y T (Wheater y Snow, 1966) y del esquizoquineno (Davis et al., 1971). Neilands (1967) muestra una extensa lista de

Tabla II. Otros roles adjudicados a 1,4-benzoxazinas y 2-benzoxazolinonas.

ROL ASIGNADO	FRACCION O COM- PUESTO ENSAYADO	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
A. Nutrición mineral	DIMBOA, DIMBOA-Glc	Determinación de constantes de estabilidad con Fe(III)	Tipton y Buell, 1970
	DIMBOA	No detección en xilema	Argandoña, V. H. y Luza, J. G., com. pers.
		No transporta Fe en xilema	Corcuera, L. J., com. pers.
		Determinación de constantes de estabilidad con Cu(II)	Hiriart et al., 1978
		Id. con Cu, Zn, Ca, Mn, Ni, Mg	Dabed et al., 1983
B. Protección contra herbicidas e insecticidas	DIBOA, DIBOA-Glc, DIMBOA, DIMBOA-Glc	Hidroxilación de simazina <u>in vitro</u>	Roth y Knüsli, 1961
	BOA, MBOA	No afectan la simazina <u>in vitro</u>	Roth y Knüsli, 1961
	Raíces escindidas de gramíneas	Hidroxilación de simazina	Hamilton, 1964a
	Plantas de gramíneas	Resistencia diferencial a la atrazina	Hamilton, 1964a
	Plantas de maíz mutante con bajos niveles de DIMBOA	Extractos acetónicos degradan muy poca simazina	Hamilton, 1964b
		Plantas toleran menos la atrazina	Hamilton, 1964b
	HMBOA-Glc, DIMBOA-Glc	Aumenta proporción relativa de lactamas en plantas tratadas con atrazina	Hofman y Hofmanová, 1969

Tabla II. Continuación.

4,7 M ₂ BOA-Glc	Reducción a HMBOA-Glc en plantas tratadas con atrazina	Hofman et al., 1970
Raíces de maíz	Hidroxilación atrazina	Thompson et al., 1970
Plantas de trigo	Aumento de DIMBOA y de DIMBOA-Glc al aplicar atrazina	Brandes y Heitefuss, 1971
DIMBOA	Actúa catalizando la reacción simazina → OH-simazina	Tipton et al., 1971
Homogenizados de maíz, DIMBOA	Degradación del insecticida Diazinon, <u>in vitro</u>	Ioannou et al., 1980
C. i) Mutagenicidad	Causan mutaciones en <u>Salmonella typhimurium</u>	Hashimoto et al., 1979
ii) Relajación muscular	Provoca relajación muscular central anticonvulsionante en ratas y ratones	Gomita et al., 1981
BOA sustituidas en la posición 3 (y/o 5 y/o 6)	Producen relajación muscular, Pérdida de actividad motora, menor tasa respiratoria y depresión	Sam et al., 1968
iii) Estimulación de la reproducción	Gatilla la reproducción en <u>Microtus montanus</u>	Berger et al., 1981
	Estimula la actividad reproductiva en <u>M. montanus</u> y en ratones	Sanders et al., 1981

ácidos hidroxámicos producidos por microbios. Se supone que los compuestos mencionados son secretados por los microorganismos al medio ambiente, uniéndose al Fe y, por ende, solubilizándolo, para luego ser absorbidos los complejos por las células.

Una vez en el interior celular, para que el fierro sea transferido a otros componentes celulares (como proteínas hémicas y no hémicas), el metal debería ser reducido a Fe(II) (Neilands, 1981). En algunas plantas (no en maíz) se han hallado también polihidroxamatos, suponiéndose que también podrían jugar roles similares (absorción y/o metabolismo del fierro; Page, 1966), aunque se adjudica al ácido cítrico el papel preponderante en la absorción y en el transporte del metal en vegetales vasculares (Tiffin, 1966; Clark et al., 1973; Läuchli, 1972).

Tipton y Buell (1970) encontraron altas constantes de estabilidad entre el Fe(III) y la DIMBOA ($K = 10^{21}$) y el DIMBOA-Glc ($K = 10^{19}$). Aunque estas afinidades son varios órdenes de magnitud menores que las de desferrisideróforos ($K = 10^{30}$), son a la vez muy superiores a las del ácido cítrico ($K = 10^{12}$). Con base en esto y en las concentraciones de Hx encontradas en plantas jóvenes de maíz (10^{-5} a 10^{-3} M), Tipton y Buell propusieron que una alta proporción del ión férrico debe estar en forma de complejo con los ácidos hidroxámicos. Sin embargo, Argandoña, V. H. y Luza, J. (com. pers.) no encontraron Hx en exudados

xilemáticos, siendo el límite de detección con reactivo de FeCl_3 < 3 mg Hx/lit exudado. Suponiendo este valor como concentración máxima y conociendo las concentraciones de ácidos orgánicos y de Fe en la savia cruda, así como las constantes de formación (K) de la DIMBOA y del ácido cítrico con el fierro, se encontró, mediante un programa computacional apropiado, que prácticamente todo el Fe estaría quelado por ácidos orgánicos en el xilema (Corcuera, L.J., com. pers.). O sea, los ácidos hidroxámicos cíclicos no estarían involucrados en el transporte longitudinal del Fe.

Por otra parte, la DIMBOA también forma complejos con Cu(II) (Hiriart et al., 1978; Dabed et al., 1983) y otros cationes (Dabed et al., 1983; pág. 19). Así, considerando las concentraciones de Cu(II), Zn(II), Ca(II), Mn(II), Fe(III), ác. málico, ác. cítrico y DIMBOA en las plantas completas, además de las respectivas K y del pH de los homogenizados de maíz (5,5), se determinó, mediante un programa de computación idóneo, que de cada catión habría más complejoado por DIMBOA que por los ácidos cítrico y málico en conjunto (Dabed et al., 1983). Esto llevó a sugerir a estos investigadores que la DIMBOA y otros ácidos hidroxámicos relacionados de gramíneas podrían participar en la nutrición mineral de la planta como agentes quelantes, aunque reconocen que es preciso determinar su concentración, así como la de ácidos orgánicos y de cationes, y el pH en los diferentes compartimientos de la planta a los niveles

tisular y celular. Más aún, debe considerarse que en el vegetal intacto existe el glucósido de la DIMBOA, cuya K es 2 órdenes de magnitud menor que la de la aglucona por el Fe^{+3} (Tipton y Buell, 1970). No se han determinado las constantes de estabilidad entre el DIMBOA-Glc y otros cationes, aunque probablemente no haya diferencias mayores, dado que el sitio funcional es el grupo hidroxámico, que en el glucósido sólo podría estar parcialmente impedido por efectos estéricos.

3.2.3. Reacción con herbicidas e insecticidas

Roth y Knüsli (1961) encontraron que, in vitro, los ácidos DIMBOA, DIBOA y sus glucósidos, eliminan las cualidades tóxicas del herbicida simazina, en tanto que las benzoxazolinonas MBOA y BOA no lo hacen; estos autores sugirieron entonces que las agluconas y los glucósidos hidroxámicos juegan un rol en el fenómeno de resistencia de algunas especies de plantas contra la simazina y compuestos fitotóxicos relacionados.

Al respecto, Hamilton (1964a) presentó una breve revisión bibliográfica, la que puede extractarse como sigue: los herbicidas del tipo 2-cloro-4,6-dialquilamino-s-triazina son extensamente utilizados para controlar malezas en cultivos de maíz, caña de azúcar, sorgo y algunos otros; los dos derivados más ampliamente usados son la 2-cloro-4,6-bis(etilamino)-s-triazina (simazina) y la 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina (atrazina), siendo más

selectivo el primero. El maíz no es dañado por aplicaciones de hasta 10 veces la cantidad requerida para controlar las malezas anuales, pero en general, otros cereales son susceptibles. La simazina es degradada no enzimáticamente por extractos y plántulas de maíz, involucrándose a la DIMBOA como catalizador de tal degradación, en que el mayor producto es el derivado 2-hidroxi-4,6-bis(etilamino)-s-triazina (hidroxisimazina, que es no fitotóxica). Hamilton (1964a) encontró que: i) el contenido de benzoxazolinonas estaba directamente relacionado con la capacidad de raíces separadas para formar hidroxisimazina (OH-simazina) y algunos otros metabolitos menores; ii) las raíces que no contenían hidroxamatos (avena, cebada, sorgo Kafer 60) no formaron OH-simazina, aunque Hamilton detectó otros productos menores; iii) sin embargo, la tolerancia de varias especies de Gramineae a la atrazina no se relacionó directamente con la capacidad de sus raíces escindidas para metabolizar [^{14}C]-simazina. En efecto plantas de trigo y centeno (con Hx), cebada y avena (sin Hx) murieron luego de una semana de exposición a atrazina 0,5 ppm en la solución de cultivo, en tanto que las de maíz y Coix lachrymans-jobi fueron inhibidas en su crecimiento pero no presentaron otros síntomas luego de un mes de estar expuestas a 5 o 10 ppm de atrazina, y plantas de sorgo Kafer 60 (sin Hx) y Dwarf Yellow Milo (DYM; con Hx) tuvieron una resistencia intermedia. De modo que Hamilton concluyó que, aun

cuando las benzoxazinonas pueden jugar una parte en la tolerancia del sorgo DYM, Coix y maíz, y su ausencia explicar la susceptibilidad de avena y cebada, parece que otros factores son importantes en este aspecto, puesto que el sorgo Kafer 60 es resistente (no tiene Hx y sus raíces no convierten simazina a OH-simazina). El autor también apoyó la existencia de tales otros factores aduciendo que el trigo y el centeno son intolerantes hacia la atrazina, aunque sus raíces degradan simazina, pero él no consideró que las variedades de trigo y centeno usadas tienen menores concentraciones de Hx y degradan menos simazina que el maíz y el Coix, lo cual podría explicar la susceptibilidad de aquellas especies hacia la atrazina. Hamilton tampoco hizo ensayos con atrazina sobre raíces (de plantas con y sin Hx) ni experimentos directos de reacción entre las benzoxazinonas y los herbicidas, pero mostró que suspensiones acuosas de extractos acetónicos de maíz mutante, con su contenido de DIMBOA reducido 8 a 10 veces, formaron poca OH-simazina a partir del herbicida correspondiente, a la vez que las plantas mutantes resultaron menos tolerantes a la atrazina que las normales (Hamilton, 1964b).

Thompson et al. (1970) encontraron que en las hojas y tallos ocurría otro importante mecanismo de desintoxicación por unión de la atrazina a los sulfhidrilos de α -glutamilcisteína y/o glutatión, formando conjugados peptídicos probablemente de manera enzimática. No hallaron OH-a__

trazina. Por otro lado, ellos observaron que en extractos acetónicos de las raíces del maíz prácticamente toda la atrazina absorbida aparecía en la forma del derivado hidroxilado, y que la velocidad de hidroxilación disminuía con la t° , en forma similar a la desintoxicación por formación de los conjugados peptídicos. De modo que también podría pensarse que tal hidroxilación es enzimática, pero se conoce que la velocidad de las reacciones químicas en general normalmente disminuye con $< t^{\circ}$. Además, estos investigadores obtuvieron una correlación entre el contenido de glucósidos de benzoxazinonas (que incluye DIMBOA-Glc y DIBOA-Glc) y la tasa de hidroxilación de la atrazina. De manera que la desintoxicación en las raíces (formación de OH-atrazina) no necesariamente es enzimática, ya que puede deberse a que los ácidos hidroxámicos se reducen y la atrazina se oxida por simple interacción entre estos compuestos en la planta viva. Un experimento equivalente fue realizado previamente in vitro por Roth y Knüsli (1961), y algunas otras evidencias se obtienen de las observaciones mencionadas en el próximo párrafo.

Hofman y Hofmanová (1969) observaron que en maíz, bajo la influencia de la atrazina en la fase terminal de su acción, hay un incremento distintivo de HMBOA-Glc con respecto a la forma hidroxámica (DIMBOA-Glc) y que si el herbicida se adiciona en cantidades suficientemente gran-

des al maíz como para actuar rápidamente, la suma DIMBOA-Glc más HMBOA-Glc permanece constante. Después, Hofman et al. (1970) vieron que cuando se aplica atrazina sobre plántulas de maíz, hay una disminución en la concentración del 4,7 M₂BOA-Glc (del cual muestran también que puede reducirse a HMBOA-Glc), en tanto que ellos mismos observaron previamente que se incrementa la concentración de la lactama 7-OH HBOA-Glc ante el mismo tratamiento (Hofman et al., 1969). Es probable que el 4,7 M₂BOA-Glc tenga un importante papel en la tolerancia de las plantas en las que no se detectó Hx (sorgo Kafer 60) e incluso en las que existen Hx (sorgo DYM, Coix y maíz); ese compuesto no hidroxámico es mayoritario en raíces de trigo, maíz y Coix (Hofman et al., 1970).

Resultados un tanto contrapuestos a los del grupo de Hofman (inciso precedente) fueron obtenidos por Brandes y Heitefuss (1971), quienes reportaron aumentos en la concentración de DIMBOA-Glc y de aglucona (1/3 y 1/2, respectivamente) en plantas de trigo tratadas con simazina o monolinurona (otro herbicida), aunque sus técnicas para cuantificar tales Hx involucran muchas etapas previas a la medición (por UV), logrando con ello un grado de imprecisión difícil de establecer desde su trabajo (pág. 15).

Por otra parte, Tipton et al. (1971) sustentan la hipótesis que la DIMBOA actúa catalíticamente en la hidrólisis de simazina en soluciones acuosas (conversión a OH-

simazina). Por inspección visual en placas finas no observaron descomposición de DIMBOA 2 mM en agua con simazina 1 mM durante 15 días a 37 ° (pág. 21). Con este resultado no se preocuparon de cuantificar DIMBOA en los demás experimentos, luego de llevar a cabo diversas reacciones con simazina a 37 ° por 4 h, en que la vida media de degradación del Hx es ≈ 15 h a pH 5,0 y ≈ 2 h a pH 6,5 (Woodward et al., 1978a). Esos autores también señalan que la catálisis es llevada a cabo más bien por el ácido hidroxámico que por el anión hidroxamato, con base en que a pH 5 observaron una más alta tasa de hidroxilación del herbicida que a pH 6,5; no lo hicieron a los pH 8 o 9, en que habría mucho mayor proporción del anión (pues su $pK_a = 6,95$). Además, conociendo la diferente tasa de descomposición de la aglucona, bien se puede pensar que al pH mayor se hidroxiló menos simazina porque la DIMBOA se descompuso mínimo 8 veces más rápido; de hecho, la diferencia en tal descomposición entre los pH 5 y 6,5 es similar a la diferencia entre las concentraciones de aglucona usadas (2 y 0,2 mM). Por otro lado, también cabe la posibilidad de explicar las diferencias observadas, al menos en parte, por el efecto directo de la acidez sobre la simazina en el medio de reacción: la DIMBOA (2 mM), al descomponerse, tiende a bajar el pH de las soluciones en que se encuentra, especialmente si los amortiguadores están diluidos (1 mM), como algunos usados por estos autores.

También Tipton et al. (1971) mostraron evidencias sobre las cuales suponen que son agregados moleculares de la DIMBOA los que catalizan la "hidrólisis" de simazina. Pero, con respecto a la degradación del Hx en soluciones acuosas, es difícil que los resultados de Tipton et al. (1971) puedan ser validados, en vista de lo contrapuesto con datos previos y posteriores. Más todavía, ellos obtuvieron porcentajes de recuperabilidad entre 80 y 70 %, lo que confiere mucha variabilidad a sus resultados.

Así, aún no está del todo clara la forma en que las benzoxazinas juegan su papel en el anulamiento de la intoxicación por herbicidas en gramíneas, especialmente in vivo. Las evidencias acumuladas hasta el momento son buenos indicios de que los hidroxamatos de gramíneas cumplen ese rol, al menos parcialmente.

Por otro lado, Ioannou et al. (1980) mostraron que, in vitro, tanto homogenizados de maíz como la DIMBOA purificada catalizan la degradación del insecticida Diazinon {0,0-dietil-0-[6-metil-2-(1-metiletil)]-4-pirimidinil-fósforotioato}, actividad que depende del pH (concordante con lo encontrado por Tipton et al., 1971) y del tiempo de incubación (dada la inestabilidad del Hx), así como de la edad y de la porción usada de la planta y de la fracción subcelular, en el caso de los homogenizados. Sin embargo, ya sea la validez de tales experimentos o su significado no han sido estudiados in vivo.

En la Tabla II.B. (pág. 47) se muestra un resumen de las publicaciones comentadas en esta sección.

3.2.4. Otras funciones biológicas

Diversos ácidos hidroxámicos que existen en la naturaleza juegan también papeles diferentes de los 3 precedentemente analizados (alelopatías, nutrición mineral y degradación de herbicidas). Por ejemplo, actúan como factores de crecimiento, antibióticos, antagonistas de antibióticos, agentes de división celular, inhibidores de tumores (Neillands, 1967), aunque no se conoce si tales efectos están relacionados a un simple evento fisiológico fundamental, e incluso en ningún caso es posible dar cuenta de esta acción a nivel molecular. En el caso de los ácidos hidroxámicos de gramíneas y compuestos relacionados, se han publicado también otros estudios con respecto a efectos ejercidos sobre seres vivos (distintos de los tres anteriormente tratados), tales como los que a continuación se estudian (ver Tabla II.C., pág. 48).

3.2.4.1. Mutagenicidad de 1,4-benzoxazinonas hidroxámicas.

Hashimoto et al. (1979) reportaron el efecto mutagénico de DIMBOA, DIBOA y otras 4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-onas sobre Salmonella typhimurium. Para ello, incubaban las bacterias con los compuestos a ensayar (20 min, 37 °) antes de agregar agar fundido y luego contaban las colonias revertantes auxotróficas para histidina. Encontraron que: i) la DIBOA y la DIMBOA se comportaban como mutágenos, apare

ciendo el primero más activo; ambos compuestos mostraron también efectos bactericidas, por lo cual es probable que la potencia mutagénica de ambos agentes sea aún superior; ii) también poseían actividad los derivados con un grupo 2-metoxi o con grupos 2,2- dimetil, independientemente de las sustituciones en el anillo bencénico. Con base en lo anterior, Hashimoto et al. (1979) supusieron que se requeriría la presencia del grupo 2-hidroxi o del 7-metoxi para la actividad mutagénica. Sin embargo, no encontraron mutagenicidad con el derivado 2,7-dimetoxilado, del que se esperaba una actividad similar a la del 7-metoxilado; además, observaron que la DIMBOA (que tiene el grupo 7-metoxi) fue menos activa que la DIBOA. Este fenómeno podría deberse a un enmascaramiento por el efecto bactericida de los Hx, pero los autores no dieron explicaciones a este respecto. Habría sido interesante determinar la incorporación de los compuestos bioensayados a la célula o, mejor aún, al material genético; se podría explicar, v. gr., la nula mutagenicidad de los demás derivados con base en que no ingresaron a las bacterias, o que entraron y fueron catabolizados antes de actuar.

3.2.4.2. Efectos farmacológicos de benzoxazolinonas. Sam et al. (1968) mostraron la acción de 3-X BOA (BOA sustituida en la posición 3) como un agente relajante muscular en ratones. Ellos señalan investigaciones previas en que se muestra que la BOA y varias 3-X BOA producen inmovili-

zación en peces, a la vez que diversas 3-X BOA antagonizan los estados de electroshock máximo y presentan actividad analgésica. Gomita et al. (1981) realizaron una serie de estudios sobre efectos conductuales y electroencefalográficos en ratas, comparando el coixol (MBOA) con la clorzoxazona (5-cloro-2,3-benzoxazolin-2-ona = 5-Cl BOA). Con base en los fenómenos observados, ellos concluyeron que la MBOA tiene propiedades farmacológicas cualitativamente similares a las de la 5-Cl BOA y actúa como un relajante muscular central con efectos anticonvulsionantes. Por el carácter de su trabajo, no estudiaron otros aspectos, como la posibilidad que las ratas ingieran MBOA naturalmente en las dosis utilizadas y de su absorción a través del sistema digestivo. Pero tampoco experimentaron con otras dosis y/o con tiempos más largos de exposición ni analizaron posibles efectos sobre los animales de compuestos relacionados a la MBOA, como sus precursores en gramíneas (DIMBOA, DIMBOA-Glc).

3.2.4.3. Estimulación por MBOA de la reproducción en Microtus montanus. Sanders et al. (1981) exhibieron varias evidencias tendientes a demostrar que la MBOA estimula la actividad reproductiva en el ratón acuático M. montanus. Paralelamente, Berger et al. (1981), con base en los resultados obtenidos y en otros previos, proponen que esa benzoxazolinona, que suponen existe en el recurso alimenticio vegetal, actúa como una señal para gatillar el es -

fuerzo reproductivo de M. montanus. Sanders et al. (1981) creen que este mamífero responde ante indicadores químicos presentes en sus alimentos, iniciando su esfuerzo reproductivo ante alto consumo de MBOA y terminándolo ante la aparición de ácidos cinámicos, presentes en gramíneas maduras y que funcionarían como señal del deterioro del recurso alimenticio. Sin embargo, estos autores nada dijeron cuantitativamente acerca de : i) cantidades de vegetales que los individuos de M. montanus debían ingerir para obtener las dosis de MBOA usadas; ii) la existencia del DIMBOA-Glc y la ausencia de la MBOA en la planta verde intacta; iii) las concentraciones de Hx en las plantas nutrientes; iv) los efectos fisiológicos de los Hx en los ratones. Sanders et al. (1981) también reportaron que la DIMBOA es una "fracción activa". Es probable que en los tejidos frescos ingeridos el DIMBOA-Glc se hidrolice a la aglucona, ya sea por la β -glucosidasa vegetal o por enzimas presentes en el tubo digestivo del mamífero (Honkanen y Virtanen, 1960b). Pero también es factible que la DIMBOA se degrade en el intestino ($t_{1/2} < 1$ h). Además, Sanders et al. (1981) encontraron que dosis i.p. mayores que 15 μ g de MBOA (en 3 días; efecto máximo) causan menor estimulación e incluso aparece inhibición reproductiva al inyectar 600 μ g i.p. de la benzoxazolinona (en 3 días). Las dosis señaladas corresponderían entre 0,75 y 3 mg MBOA/Kg animal, de modo que probablemente los efectos negativos que estos au

tores encontraron con las dosis altas se deberían, al menos en parte, a la influencia sobre el sistema nervioso central que detectaran Gomita et al. (1981; pág. 60), en que el carbamato actuaba como relajante muscular central en ratas y ratones con dosis i.p. entre 20 y 100 mg/Kg. También resulta interesante notar la dualidad de efectos ejercidos por la DIMBOA sobre áfidos (Corcuera et al., 1982; pág. 43).

Por otra parte, cabe destacar, con respecto a la ingestión de MBOA y compuestos relacionados (BOA, DIMBOA, DIBOA y otros), el efecto que estas sustancias inhibidoras puedan tener en la composición de la flora microbiana entérica de los animales consumidores primarios, fenómeno que también mencionan como posible Virtanen et al. (1957), particularmente con respecto al ganado.

Además, se ha propuesto, con base en sus altas concentraciones en las plántulas en germinación, que los Hx podrían jugar algún papel en el desarrollo del vegetal (Klun y Robinson, 1969). Virtanen et al. (1957) no hallaron influencias de benzoxazolinonas sobre el crecimiento en longitud de cotiledones. Las benzoxazolinonas MBOA y M₂BOA inhibirían la unión de hormonas vegetales a receptores ligados a membranas (Venis y Watson, 1978).

Las evidencias compiladas hasta el momento muestran que los Hx existentes en extractos de gramíneas, de los

cuales la DIMBOA es el más abundante, participarían en varios roles funcionales, de los que la defensa contra patógenos es el que más atención ha recibido. Se ha visto que a aquellas gramíneas de las cuales provienen, estos compuestos les confieren resistencia contra enfermedades causadas por organismos tan diversos como insectos, hongos y bacterias, y más aún, también provocan efectos deletéreos en plantas, no conociéndose el(los) mecanismo(s) bioquímico(s) de su acción.

En esta Tesis se pretende:

- a) Aislar la DIMBOA y su glucósido desde plántulas de maíz y examinar algunos factores que afectan sus concentraciones in vivo.
- b) Determinar un posible modo de acción de estos Hx a nivel molecular, estudiando sus efectos sobre la síntesis de ATP.

M E T O D O L O G I A

A. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE ACIDOS HIDROXAMICOS

1. Purificación de DIMBOA

Se siguió el procedimiento utilizado por Woodward et al. (1978a) y por Tipton et al. (1967), con las modificaciones señaladas: En bandejas plásticas provistas de papel filtro Whatman embebido con agua destilada, se sembraron 1.000 frutos de maíz LH Rinconada distanciados 1 cm uno de otros. Se cultivaron en una estufa termorregulada a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}$, en oscuridad permanente y se regaron diariamente con agua destilada durante 7 días. Se cosecharon plántulas etioladas (descartando los frutos; 674 g de tejido fresco) y se molieron en una juguera comercial con 200 ml de agua destilada. El homogenizado (que no se dejó reposar)

NOTA: Todos los reactivos fueron de grado analítico, al igual que la mayor parte de los solventes. Los solventes de grado técnico se destilaron, antes de su uso, hasta que su punto de ebullición coincidiera con el del solvente puro o con el punto azeotrópico correspondiente. La MBOA fue generosamente donada por el Prof. H. R. Bravo. El maíz LH Rinconada se obtuvo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile. El maíz T 129_s fue donado por la semillera Tracy (Santiago).

se filtró a través de una capa de lienzo. Al filtrado se le disminuyó el pH desde 5,5 hasta 3,0 con HCl 1 N (en lugar de calentar hasta 65 °) y se centrifugó a 6.000 g durante 15 min. El sobrenadante fue extraído sucesivamente 3 veces con éter (éter : extracto acuoso = 2 : 1). Las fases etéreas (amarillas) se juntaron y concentraron con vacío en un evaporador rotatorio termorregulado a 20 °. El residuo, un líquido viscoso anaranjado, se guardó en un congelador (- 6 °) durante 12 h, con lo cual cristalizó un compuesto rosado. Con una pipeta Pasteur se extrajo la fase líquida y los cristales fueron lavados rápidamente y en frío, en forma sucesiva con: 2 ml de éter (2 veces), 2 ml de acetona (2 veces) y 1 ml de metanol : cloroformo = 1 : 1 v/v. Después de cada lavado, se sacaron los solventes con una pipeta Pasteur. Finalmente, los cristales, rosados y de forma polihédrica, se disolvieron en 8 ml de acetona, mezclándose con 40 mg de carbón activado. La suspensión se filtró a través de papel y al líquido se le agregó n-hexano gota a gota, hasta obtener opacidad; se dejó cristalizar sobre hielo, y la suspensión se filtró. Se recuperaron cristales blancos a rosado pálido (222 mg). En posteriores purificaciones los cultivos se hicieron en tierra vegetal bajo luz permanente, en un invernadero termorregulado a 28 ° ± 3 °; se usaron sólo hojas y no se efectuó la etapa de descoloración con carbón activado (se encontró in necesaria). Con las modificaciones mencionadas se obtenía

mayor rendimiento de DIMBOA, tanto por una menor descomposición del Hx como por la mayor productividad de los órganos utilizados (hojas); ulteriormente se ha logrado una más alta eficiencia en el uso de materiales y de tiempo al moler las hojas en un molinillo sin agregar agua, lavar sólo con acetona el residuo de la evaporación del éter y cristalizar desde dioxano con n-hexano (Bravo, H. R. , com. pers.).

2. Caracterización de DIMBOA

2.1. Espectro ultravioleta

Se disolvieron 3,3 mg de DIMBOA en 50 ml de etanol absoluto. Una alícuota se diluyó 2,5 veces en el mismo solvente y mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV 240 se obtuvo el espectro mostrado en la Fig. 3. Se aprecia un máximo amplio a 262 nm con un $\epsilon = 10.136$, un hombro a 288 nm con un $\epsilon = 7.256$, y un mínimo a 233 nm. Este espectro es muy parecido al obtenido con otra muestra en un espectrofotómetro Cary 17 ($\epsilon_{265} = 10.135$; $\epsilon_{288} = 5.165$; $\lambda_{\text{mín}} = 235$ nm). Ambos espectros son similares a los reportados por Woodward et al. (1978; $\epsilon_{262} = 10.000$ en etanol absoluto) y por Gahagan y Mumma (1967; $\epsilon_{264} = 10.300$ en etanol), y a otros espectros UV obtenidos con agua como solvente [Tipton et al., 1967; Wahlroos y Virtanen, 1959; Hamilton et al., 1962; Tipton et al., 1971 ($\epsilon_{264} = 10.114 - 9.677$)].

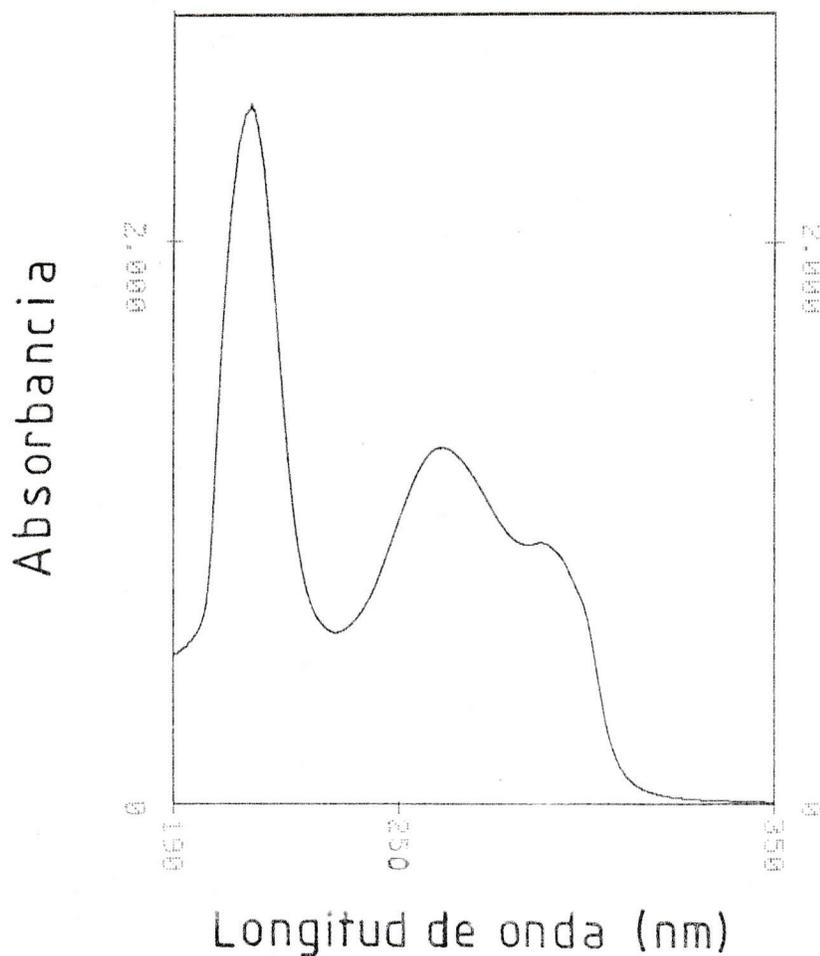


Figura 3. Espectro de absorción por DIMBOA en el rango de luz ultravioleta.

Se disolvieron 3,3 mg de DIMBOA en 50 ml de etanol absoluto y una alícuota (1 ml) se diluyó 2,5 veces en el mismo solvente. La curva se obtuvo en un espectrofotómetro Shimadzu UV 240 usando el mismo alcohol como blanco.

En el presente caso no se observaron cambios espectrales notorios con el solvente (etanol) y rango de concentraciones usados: 0 a 250 μM (0 a 2,5 unidades de absorbancia).

2.2. Espectro infrarrojo

A 3 mg de DIMBOA en una pastilla de KBr, se les midió la transmitancia desde 4.000 hasta 640 cm^{-1} en un espectrofotómetro de IR Perkin Elmer 700. El espectro obtenido aparece en la Fig. 4, donde se aprecian los máximos de absorbancia (A) característicos de los grupos hidroxilo en posiciones 2 y 4 (3.325 y 3.140 cm^{-1}), del grupo carbonilo (1.670 cm^{-1}) y del fenilo (1.520 cm^{-1}) de la DIMBOA. La lactama no absorbe en la frecuencia de 3.325 cm^{-1} (Tipton et al., 1967). Este espectro calza muy bien con otros obtenidos previamente (Hamilton et al., 1962; Tipton et al., 1967). Por otra parte, el que no haya absorción en la región de los 1700-1.800 cm^{-1} indica que está libre de contaminación por benzoxazolinonas, que absorben fuertemente en ese rango (Hamilton et al., 1962).

2.3. Espectro visible del complejo formado por DIMBOA con FeCl_3

Se usó el reactivo descrito por Hamilton (1964a) y modificado por Corcuera et al. (1978; ver págs. 16-19).

2.3.1. Preparación del reactivo de FeCl_3 .

Se disolvieron 100 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de agua desionizada que contenía 1,35 ml de HCl 37 % p/v y se

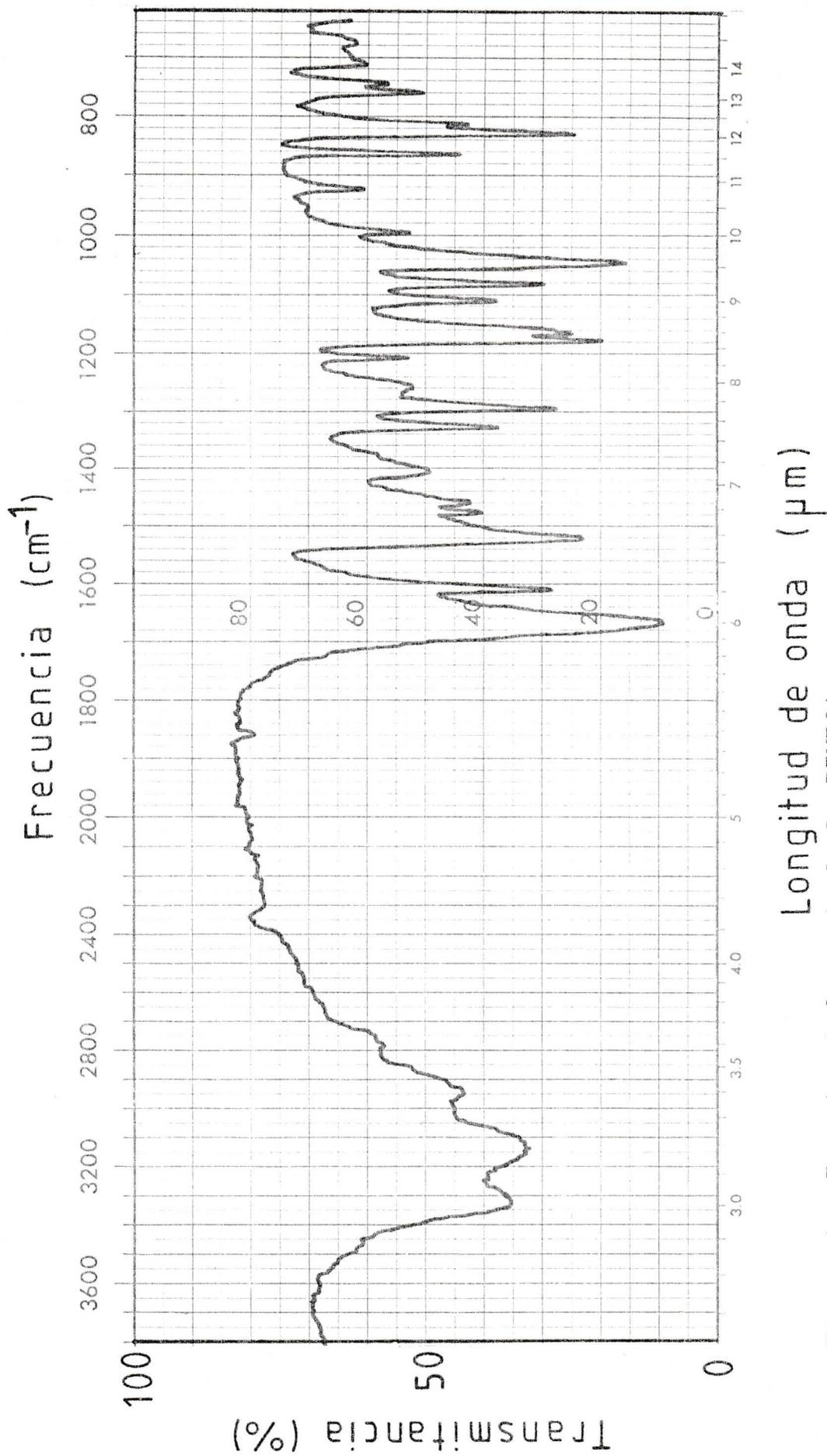


Figura 4. Espectro infrarrojo de la DIMBOA.

Se incluyeron 3 mg del Hx en una pastilla de KBr y la gráfica se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin Elmer 621. Los máximos de A en las frecuencias 3325, 3140, 1670 y 1520 cm^{-1} corresponden a los enlaces OH del N y del C-2, del carbonilo y del fenilo, respectivamente.

llevó a 100 ml con agua desionizada. El HCl libre fue \leq 0,5 % p/v. Esta solución madre se almacenaba incluso durante meses en una botella oscura a temperatura ambiente, sin que se descompusiera. Para obtener el reactivo mismo, a 100 ml de etanol 95 % v/v se agregaba 1 ml de HCl 37 % p/v y 10 ml de la solución madre.

2.3.2. Obtención del espectro

Se disolvió DIMBOA en etanol absoluto; 1 ml de esta solución fue evaporado a sequedad, soplando aire seco. A los cristales residuales se les agregó 5 ml de reactivo de FeCl_3 , obteniéndose una solución $4,875 \cdot 10^{-4}$ M, de color azul oscuro. A esta solución se le midió la A desde 800 hasta 495 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 240. Como blanco se usó el reactivo de FeCl_3 . El espectro aparece en la Fig. 5, en donde se aprecia un máximo amplio alrededor de los 590 nm ($\epsilon = 1.313$). Este espectro se asemeja tanto al obtenido en un espectrofotómetro Beckman DU con otra muestra, como al logrado por Corcuera et al. (1978; $\epsilon_{590} = 1.280$).

2.3.3. Determinación del coeficiente de extinción molar a 590 nm

Se disolvieron 30 mg de DIMBOA en 4 ml de etanol absoluto. En tubos de ensayo se colocaron alícuotas conocidas de diferente volumen y se evaporó el solvente con vacío a 0° (soplando aire seco es muy demoroso). Cada residuo se mezcló con 5 ml de reactivo de FeCl_3 , se leyó su A

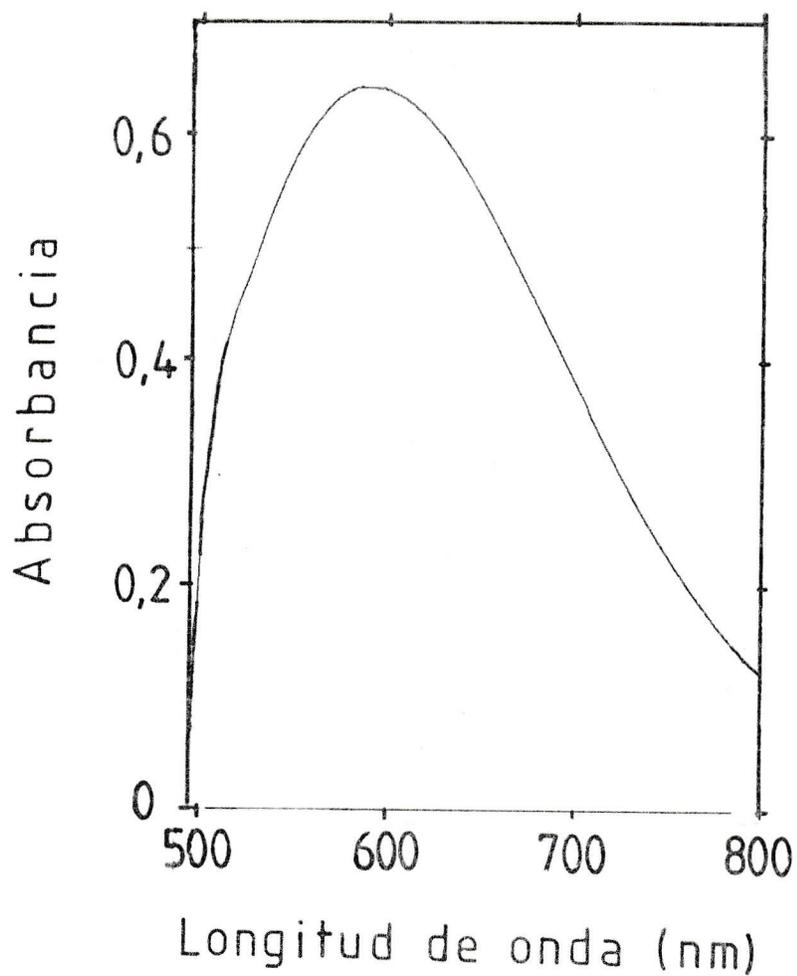


Figura 5. Espectro de DIMBOA con FeCl₃ en el rango de luz visible.

Se formó una solución $4,875 \cdot 10^{-4}$ M del Hx en reactivo de FeCl₃ (pág. 68) y el espectro se obtuvo en un espectrofotómetro Shimadzu UV 240.

a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman DU, usando el mismo reactivo como blanco, y se confeccionó una gráfica de A_{590} Vs. concentración de DIMBOA. Del análisis de regresión lineal se obtuvieron los coeficientes $\epsilon = 1.313$ (pendiente), $A_0 = -0,022$ (intercepto en el eje de las ordenadas) y $r = 0,9995$ (coeficiente de correlación), siendo significativa la recta hasta al menos una concentración $\approx 1,5$ mM ($A \approx 2$). Previamente, Hamilton (1964a) informó que se cumplía la ley de Lambert-Beer entre 0,1 y 1 mM (no dio el ϵ ni la $\lambda_{\text{máx}}$); Long et al. (1974) reportaron un $\epsilon_{570} = 800$; Sullivan et al. (1974) encontró una $\lambda_{\text{máx}} = 590$ nm; ulteriormente, con un mayor refinamiento del método usado, Corcuera (1974) halló una $\lambda_{\text{máx}} = 590$ nm con un $\epsilon = 1.280$. El mayor ϵ aquí encontrado respecto del de Corcuera (1974), puede ser debido al aparato con que se mide, a los reactivos usados y/o a la pureza del Hx. En repeticiones de la curva de calibración aquí mencionada se lograron coeficientes parecidos, con rectas también significativas. En los experimentos de cuantificación de Hx se usó el $\epsilon = 1.313$.

3. Aislamiento y purificación de DIMBOA-Glc

3.1. Preparación de la columna de SP-Sephadex-Fe(III)

En 700 ml de metanol acuoso 1 : 3 v/v se embebieron 80 g de SP-Sephadex (con Na^+ como contraión) durante 1 día a temperatura ambiente y se descartó el líquido sobrenadante. El

gel se suspendió en 80 ml de una solución de FeCl_3 al 5 % p/v en metanol : agua = 1 : 3 y se dejó decantar; se eliminó el sobrenadante y se repitió este proceso 3 veces más. Con esto, los iones Na^+ fueron desplazados por los iones Fe^{+3} , obteniéndose así el SP-Sephadex-Fe(III), que es de color anaranjado. Luego, el gel se lavó con porciones de 100 ml de metanol acuoso 1 : 3 por 5 veces. El SP-Sephadex-Fe(III) fue empacado con una pipeta invertida en una columna de 30 • 4,2 cm. Se usó arena inerte como soporte inferior del gel. La columna se lavó con 300 ml del mismo solvente, con un flujo descendente de 43 ml/h, quedando entonces lista para usar.

3.2. Preparación de la columna de Sephadex G-10

Se embebieron 450 g de Sephadex G-10 en agua desionizada saturada con cloroformo, durante 1 día. Se montó una columna de 70 • 4,1 cm, depositando el gel con una pipeta invertida. Como soporte inferior se usó arena inerte. Se lavó la columna con 200 ml del mismo solvente, con un flujo de 30 ml/h, quedando lista para su utilización. La columna se usaba sucesivamente lavándola en forma previa con 2 lt del mismo eluyente. Dado el contenido de cloroformo en el solvente, la columna no se contaminó con hongos en 3 años desde su montaje.

3.3. Descripción de la extracción y purificación típicas

En un invernadero se sembraron 1.786 frutos de maíz (Zea mays L. cv. T 129_s; 500 g) en un bandejón de tierra vegetal (76 · 105 · 6 cm) a 1 cm de profundidad. Se regaron diariamente con agua potable hasta la capacidad de campo y se mantuvieron a $30 \pm 3^\circ$, con una humedad relativa entre 55 y 85 %. Al germinar los frutos, se mantuvo luz continua [fuentes incandescentes (450 W) y fluorescentes (320 W) ubicadas a 80 cm sobre la tierra cultivada].

A los 7 días de edad se cosechó cuidadosamente la parte aérea (hojas) de 1.537 plántulas (951 g de TF), que medían 21 cm en promedio con sus hojas extendidas. El material fresco se calentó a 90° durante 15 min en 1.000 ml de agua destilada y se enfrió hasta 60° ; entonces se pasó todo por un molinillo Victoria y el homogenizado se filtró a través de un lienzo, recogién dose 1.460 ml de filtrado (verde oscuro; pH 5,5), el cual se llevó a pH 10,0 con NaOH 5 N y se centrifugó por 10 min a 10.300 g. Lo sobrenadante resultó rojo muy oscuro (1.400 ml, pH 10,1), que se llevó a pH 3,0 con HCl 37 % p/v (la solución quedó café clara).

El extracto se lavó 3 veces con éter (éter : sobrenadante = 2 : 1 v/v). La fase acuosa (1.420 ml) se llevó a pH 8,0 con NaOH 5 N (tornándose roja muy oscura) y se guardó durante 15 h a -11° . La solución se concentró ba

y más abajo (4 cm siguientes) quedó una banda roja oscura. Los 8 cm superiores del gel se eliminaron y entonces el DIMBOA-Glc se eluyó desde la columna con el mismo solvente saturado con NaCl (520 ml; 33 ml/h). Se colectaron las fracciones azules (158 ml) y se mezclaron con 70 ml de una solución acuosa de EDTA 0,83 M (pH 8,5), con lo cual se descoloraron al ser desplazado el fierro desde su complejo glucosídico por el anión del EDTA. La suspensión formada (17,6 g de precipitado) se filtró y la solución se neutralizó con NaOH 2 N y se concentró hasta 45 ml, obteniéndose un líquido rojo oscuro viscoso en el que, al ser almacenado a -11° , apareció un precipitado cristalino (13,5 g, posiblemente NaCl).

De la mezcla precedente se tomaron porciones de 6,5 ml, se filtraron y se sembraron en una columna de Sephadex G-10, preparada como se indicó (pág. 73). Cada porción se eluyó con agua saturada con cloroformo a razón de 13 ml/h, colectándose fracciones de 2 ml.

A cada una de las fracciones se le midió la A a 260 nm (Fig. 6.A), a 590 nm (alícuotas tratadas con reactivo de FeCl_3 preparado como se describe en la pág. 68) y a 620 nm [alícuotas incubadas por 5 min a 95° con reactivo fresco de antrona, consistente en 200 mg de antrona disuelta en 100 ml de H_2SO_4 (ver pág. 93)]. En la Fig. 6.A se aprecia el perfil de elución determinado por las A a 260 nm. Se ve un complejo de picos con máximos notorios en los 433

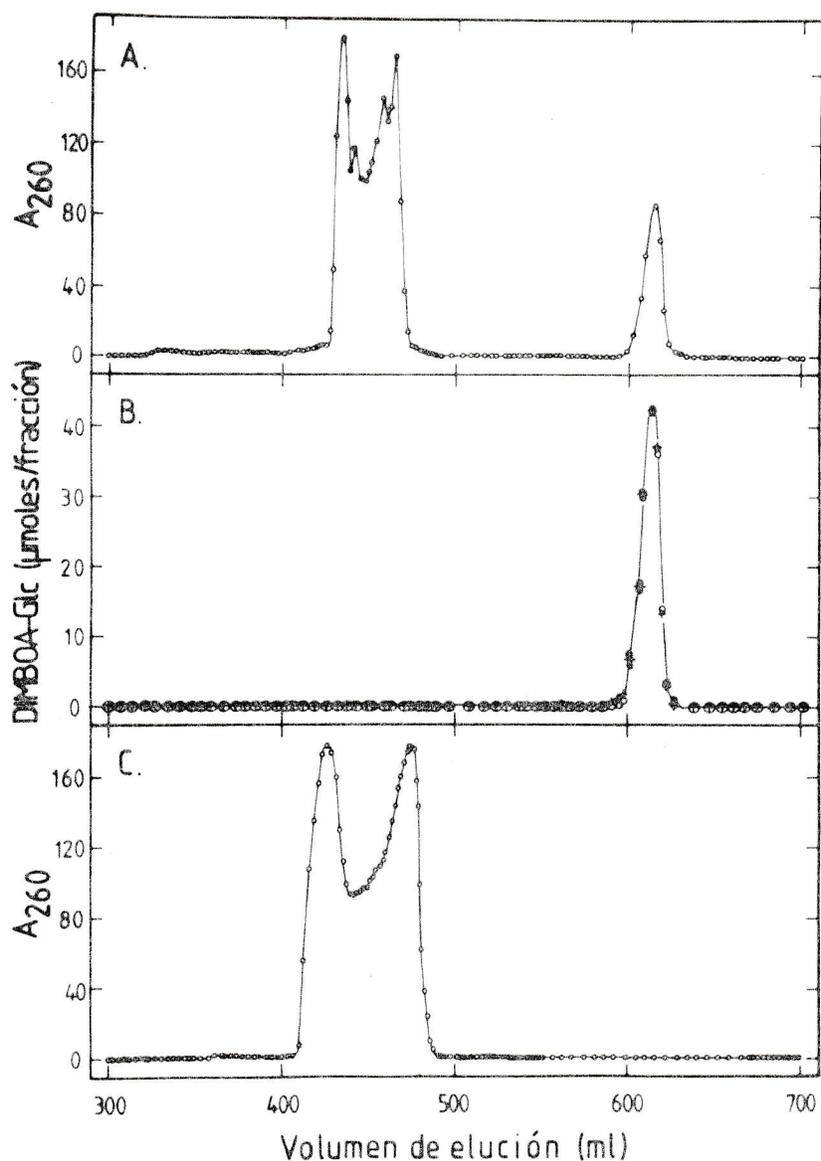


Figura 6. Perfiles de elución desde una columna de gel Sephadex G-10.

A. Elución del DIMBOA-Glc. La fracción hidroxámica eluida desde la columna de SP-Sephadex-Fe(III) y tratada como se indica (pág. 76), fue dividida en porciones (6,5 ml), cada una de las cuales se filtró, se colocó en una columna (70 × 4,1 cm) de Sephadex G-10 equilibrado en agua saturada con cloroformo y se eluyó (13 ml/h) con el

Figura 6. Continuación.

mismo eluyente, colectándose fracciones de 2 ml, a cada una de las cuales se le midió la A a 260 nm con el mismo solvente como blanco. B. Elución de azúcares y de Hx. Para cada una de las fracciones mostradas en la Fig. 6.A se midió colorimétricamente tanto el contenido de Hx (+; método del FeCl_3) como el de azúcar (●; reacción con antrona). Las conversiones a μmoles de Hx o de azúcar se hicieron con base en curvas estándar adecuadas (págs. 99 y 100). Esto mismo se hizo para la cuantificación por UV (○), usando las A a 620 nm de la Fig. 6.A correspondientes al pico del DIMBOA-Glc. C. Elución de FeCl_3 + EDTA. Una alícuota de FeCl_3 , eluido desde una columna de SP-Sephadex-Fe(III), se trató de un modo similar al del DIMBOA-Glc, según se describe en la parte A precedente (ver pág. 81).

y 464 ml de elución y un pico aislado con máximo en los 614 ml. En la Fig. 6.B se muestra el contenido de azúcar determinado por la A a 620 nm y el de DIMBOA-Glc, calculado desde las A a 590 nm, así como desde las obtenidas a 260 nm y que corresponden al pico aislado (614 ml); los cálculos se basaron en las curvas estándares pertinentes (sección 5.; pág. 97). De la misma ilustración se desprende que eluyeron 57 mg del glucósido en el pico mostrado. En otros experimentos se eluyeron sobre 150 mg del Hx con igual resolución. En la Fig. 6.B también se observa que las fracciones que contienen azúcar (máximo en los 614 ml de elución) son las únicas en que hay ácidos hidroxámicos (el mismo máximo) y en cantidades equimolares, indicando que el glucósido está formado por 1 molécula de Hx y 1 de azúcar; además, prácticamente no hay contaminación de otros compuestos ($< 1\%$ según A_{260}). Por otro lado, los 2 grandes picos sobrepuestos parcialmente (con máximos en los 433 y 464 ml de elución; Fig. 6.A) corresponden a una banda roja y a una amarilla, respectivamente; entre los componentes de estas bandas no hay Hx ni azúcares (Fig. 6.B).

Finalmente, se juntaron las fracciones que contenían ácidos hidroxámicos (y azúcar) y se extrajeron con n-butanol. Las fases orgánicas se evaporaron a sequedad, obteniéndose un polvo blanco que se identificó como 2-(2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona)- β -D-glucopiranosido (DIMBOA-Glc; ver sección 4., pág. 83).

La cromatografía de afinidad a través de SP-Sephadex-Fe(III) fue descrita por Corbetta y Chipko (1978) como apta para purificar el ácido hidroxámico análogo del cloramfenicol, usando la propiedad quelante de ese ácido; para ello, hicieron pasar el ácido hidroxámico impuro por una columna de SP-Sephadex-Fe(III), la lavaron y luego eluyeron el(los) complejo(s) $Fe(Hx)_n$, el(los) cual(es) deshicieron reduciendo el Fe(III) a Fe(II) con ditionito de sodio. Se vio que el ditionito reacciona con DIMBOA, pues no se obtiene el color azul en soluciones de esta aglucona (tratada con ditionito) con reactivo de $FeCl_3$. Debido a esto, en el presente trabajo se utilizó EDTA para secuestrar el Fe(III) desde los complejos $Fe(DIMBOA-Glc)_n$.

La filtración por Sephadex G-10 fue descrita por Hofman y Hofmanová (1969) como un método para aislar y cuantificar glucósidos de benzoxazinas. Sin embargo, no muestran una separación total de los componentes ni dan valores acerca de las cantidades de cada glucósido eluido de la columna analítica utilizada. Posteriormente, Thompson et al. (1970) obtuvieron un perfil de elución parecido. En este trabajo se ocupó una columna de Sephadex G-10 más resolutive y de mayor capacidad (70 • 4,1 cm), obteniéndose un pico aislado correspondiente al DIMBOA-Glc, cuyo contenido excede los 100 mg por cada elución.

El rendimiento logrado con la metodología aquí utilizada fue de 1,331 g de glucósido desde 1 Kg de TF y corres

ponde aproximadamente a un 70 % del contenido original existente en la planta, determinado como DIMBOA por el método del FeCl_3 (Zúñiga, 1982). El DIMBOA-Glc así obtenido fue el que se usó en los experimentos descritos más adelante.

3.4. Identificación de algunos picos del perfil de elución obtenido del Sephadex G-10

Se montó una columna de SP-Sephadex en su forma férrica (pág. 72), se lavó con 590 ml de metanol : agua = 1 : 3 (65 ml/h) y se eluyó con el mismo solvente saturado con NaCl (33 ml/h); se colectó la porción entre los 306 y los 464 ml de elución, correspondiente a parte del volumen en que aparecía el glucósido. A tal porción (color café rojizo, pH 1,6) se le agregaron 12 ml de EDTA 0,94 M (pH 8,6), subiendo el pH del eluido hasta 3,0 y desapareciendo su color (quedó amarillo pálido). Luego se le adicionaron 3,6 ml de NaOH 2 N, hasta llevar la solución a pH 7,0 (quedó roja); ésta se concentró bajo vacío en el evaporador rotatorio a 35 ° durante 1 h, obteniéndose 13,2 ml de un líquido viscoso rojo oscuro, del cual precipitaron 2 g de cristales (NaCl probablemente). Una alícuota (5 ml) se filtró y se sembró en la columna de Sephadex G-10 (pág.73) y se eluyó con agua saturada con cloroformo. Aparecieron las bandas roja y amarilla observadas durante la elución del DIMBOA-Glc. Se colectaron fracciones del mismo modo

que para la elución de este compuesto. A cada porción se le midió la A a 260 nm. El perfil de elución se muestra en la Fig. 6.C. Se observa que hay sólo dos máximos notorios: en los 427 y 475 ml de elución.

Por lo tanto, las bandas roja y amarilla corresponden a complejos Fe-EDTA formados durante el desplazamiento del ión férrico desde su complejo glucosídico. Además, el pico cuyo máximo está en los 614 ml de elución corresponde exclusivamente al DIMBOA-Glc. En experimentos en que las fracciones eluidas desde la columna de SP-Sephadex - Fe(III) se juntaban según sus tonalidades (todas azules) y se trataban (mezcla con EDTA, neutralización y concentración) y se filtraban a través del Sephadex G-10 separadamente, podía detectarse un pico pequeño, anterior al del DIMBOA-Glc, con máximo en los 596 ml y cuya área bajo la curva del perfil de elución representaba menos del 3 % del área perteneciente al glucósido de DIMBOA, pero esto sólo ocurría en el caso de las fracciones hidroxámicas que primero eluían desde el gel de intercambio iónico. Probablemente ese Hx minoritario corresponde al DIBOA-Glc (Hofman y Hofmanová, 1969), aun cuando Zúñiga (1982) no detectó DIBOA en la variedad de maíz aquí utilizada.

4. Caracterización espectroscópica del DIMBOA-Glc

4.1. Espectro ultravioleta

Se disolvió DIMBOA-Glc en agua y en un Shimadzu UV 240 se obtuvieron los espectros que se observan en la Fig. 7, correspondientes a distintas concentraciones del Hx. A concentraciones de $\approx 25 \mu\text{M}$ se observa un máximo (M) en los 270 nm ($\epsilon = 9.083$), un hombro en los 285 nm y un mínimo en los 238 nm. Este espectro concuerda con los publicados por Wahlroos y Virtanen (1959; $\lambda_{\text{máx}} = 270 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{hombro}} = 282 - 283 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{mín}} = 237 \text{ nm}$, en agua) y por Gahagan y Mumma (1967; $\lambda_{\text{máx}} = 270 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{hombro}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{mín}} = 241 \text{ nm}$). Además, en la Fig. 7 se puede apreciar que el espectro cambia su forma a medida que varía la concentración del DIMBOA-Glc: i) si las soluciones absorben menos de 0,2 A ($< 22 \mu\text{M}$), el máximo M se corre a una menor λ a medida que decrece la concentración del Hx, llegando a los 261 nm (1 μM); ii) cuando las soluciones absorben más de 0,3 A ($> 55 \mu\text{M}$), el hombro (285 nm) pasa a ser el máximo, en tanto que el máximo M se reduce a un hombro, acentuándose más esta variación al aumentar la concentración del glucósido, lo cual conlleva que el ϵ_{270} vaya disminuyendo (sección 5.1., pág. 98). Usando agua saturada con cloroformo como solvente, se observaron cambios espectrales similares. Todas estas variaciones son más notorias a $A > 0,2$ ($> 20 \mu\text{M}$) y $< 1,5$ ($< 170 \mu\text{M}$), lo cual sugiere posibles cambios en la solvata -

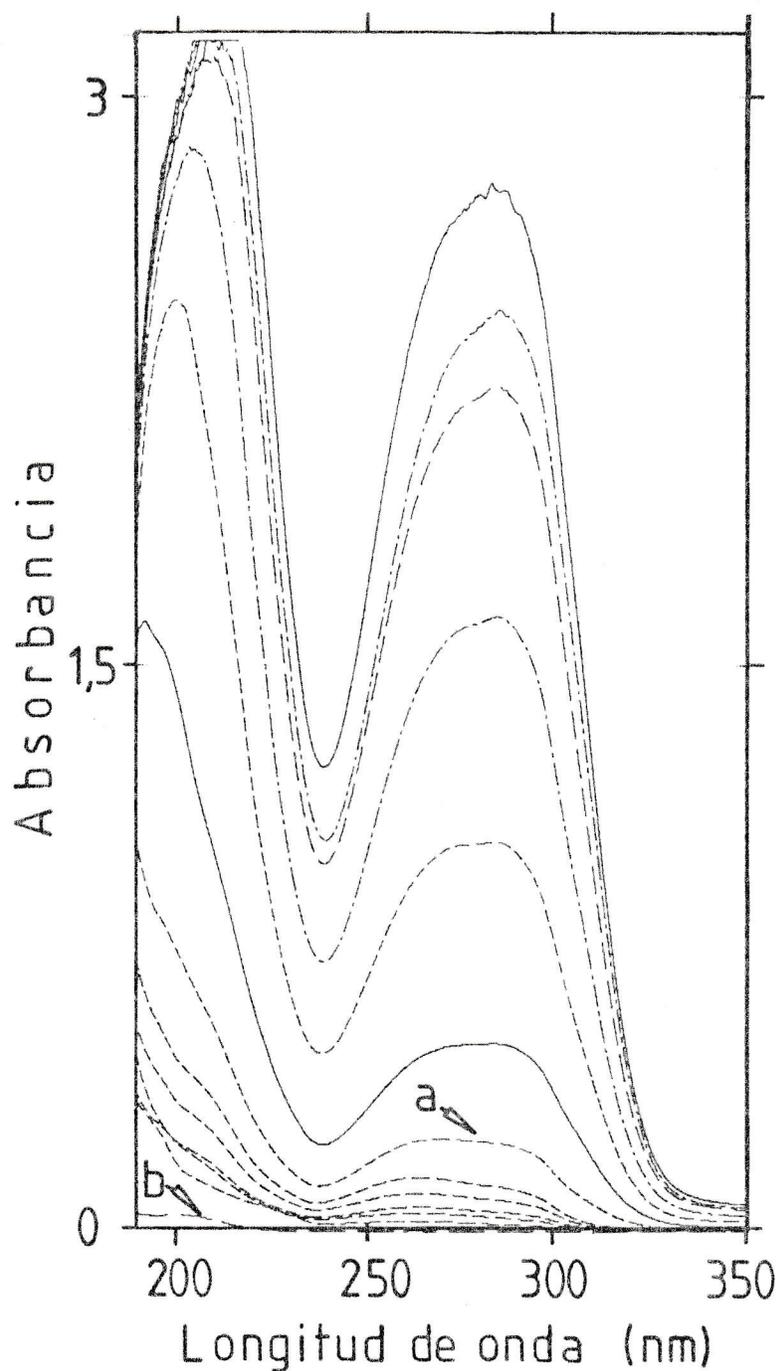


Figura 7. Espectros de absorción del DIMBOA-Glc en el rango de luz ultravioleta.

Se disolvió DIMBOA-Glc en agua y se diluyeron diferentes alícuotas en el mismo solvente, obteniéndose los espectros en un Shimadzu UV 240. a: espectro con DIMBOA-Glc 26,6 μM ; b: espectro sin el Hx.

ción de los diversos grupos funcionales del Hx, así como también la posibilidad de interacciones entre las moléculas del soluto, como la formación de dímeros, por ejemplo (Bravo, H. R., com. pers.), o la constitución de agregados moleculares semajando pilas de monedas (Tipton et al., 1971). Además, estas variaciones espectrales se deberían considerar en experimentos de cuantificación por UV del DIMBOA-Glc, puesto que los ϵ a una λ dada se modifican con los cambios en las concentraciones del Hx (sección 5.1., pág. 98).

4.2. Espectro infrarrojo del DIMBOA-Glc

Se formó una pastilla con 1 mg de DIMBOA-Glc en KBr y mediante un Perkin Elmer 700 se obtuvo el espectro que se ve en la Fig. 8. Se aprecia buena concordancia con el obtenido para la aglucona (Fig. 4), aunque la banda correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo es más ancha y aparece a menor frecuencia (1.640 cm^{-1}) que en el caso de la DIMBOA (1670 cm^{-1}), probablemente por formación de puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo de la glucosa y el oxígeno carbonílico. Gahagan y Mumma (1967) informaron una frecuencia de absorción del carbonilo de 1.610 a 1640 cm^{-1} . El carbonilo de las benzoxazolinonas absorbe fuertemente en los 1.700 a 1.800 cm^{-1} (Hamilton et al., 1962) y el del HMBOA-Glc lo hace en los 1680 cm^{-1} , por lo cual el DIMBOA-Glc no estaría contaminado con esos compues

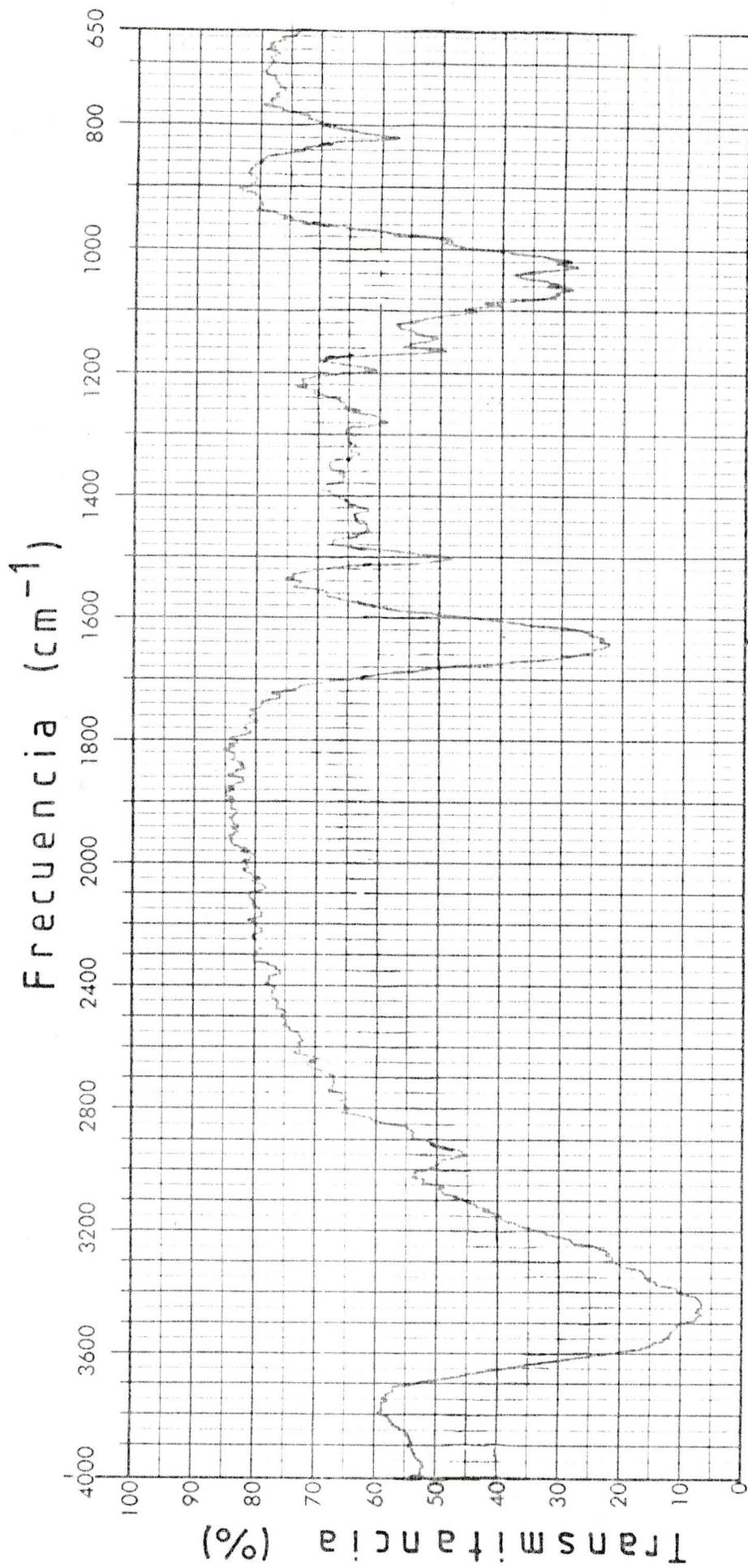


Figura 8. Espectro infrarrojo del DIMBOA-Glc.

Se incluyó 1 mg del Hx en KBr y la gráfica se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin Elmer 621 (ver texto).

tos. Además, en la Fig. 8 se observa una gran banda a los $3.400 - 3.500 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento de los OH del azúcar; la banda del OH hidroxámico (alrededor de los 3.300 cm^{-1}) aparece enmascarada por la absorción de esos hidroxilos. También se ve un pico en los 2.950 cm^{-1} , al igual que para el caso de la DIMBOA, pero no aparecen los máximos alrededor de los $2.800 - 2.900 \text{ cm}^{-1}$ observados en el caso de la DIBOA (Tipton *et al.*, 1967), lo cual indicaría la ausencia de DIBOA-Glc como contaminante

4.3. Espectro de resonancia magnética nuclear

Se disolvió DIMBOA-Glc en D_2O y en un Varian T 60 se obtuvo el espectro cuyas absorciones aparecen sumariadas en la Tabla III. La distribución de picos es similar a la reportada por Gahagan y Mumma (1967). En el espectro se pudo apreciar una absorción amplia atribuible a los protones del azúcar, entre $5,8$ y $7,0 \tau$, observándose un pico complejo con máximo en los $6,67 \tau$ (integración para 4 protones) y otros 2 superpuestos con el singlete del metoxilo ($6,27 \tau$; integración para 5 protones totales). De acuerdo con Gahagan y Mumma (1967), se puede aseverar que: i) la constante de acoplamiento ($J = 8 \text{ cps}$) para la absorción del protón del C número 1 de la hexosa (doblete en $5,28 \tau$) requiere que los protones de los C 1 y 2 sean trans diaxiales, sugiriendo un β -D-glucopiranosido; ii) el corrimiento del protón del C número 1 ($5,28 \tau$) es más acorde con

Tabla III. Correlación entre las absorciones de NMR y los protones del DIMBOA-Glc.

PROTON	τ	Nº DE PROTONES (POR INTEGRACION)	OBSERVACIONES
C - 2	4,21	1	-----
C - 5	2,69	1	Doblete; J = 9
C - 6	3,23	1	Multiplete ⁺
CH ₃ O -	6,27	3	-----
C - 8	3,38	1	Doblete; J = 2
C - 1'	5,28	- ⁺⁺	Doblete; J = 7
Azúcar	5,8-7,2	6	Absorción amplia

⁺Aun cuando se esperaba obtener un doblete de dobletes con constantes J = 9 (originada por su acoplamiento con el protón del C-5) y J = 2-3 (originada por su acoplamiento con el protón del C-8), debido a la baja resolución del instrumento y a la superposición de estas señales con aquéllas correspondientes al protón del C-8, sólo se pudo observar un multiplete.

⁺⁺No considerado porque el doblete se superpuso con el singlete de los protones de los hidroxilo (del azúcar y del agua contaminante).

El espectro de NMR pertinente se obtuvo en un Varian T 60 con DIMBOA-Glc disuelto en D₂O.

el de un β -D-glucopiranosido (5,50 τ) que con el de un α -D-glucopiranosido (5,96 τ) (últimos valores en dimetilsulfóxido); iii) el corrimiento a un campo más bajo que el esperado para un β -glicósido indica que el protón está descubierta, probablemente por su estrecha proximidad al heterociclo.

4.4. Espectro de masas

Se dispuso una muestra sólida de DIMBOA-Glc directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas Varian CH 7; el conjunto de señales obtenido se muestra esquemáticamente en la Fig. 9. Este espectro es similar al publicado por Gahagan y Mumma (1967) para el glucósido ($m/z = 373, 211, 196, 195, 193, 165, 150, 136, 122, 106, 94, 80, 78, 67$), a la vez que los picos correspondientes a los fragmentos de la aglucona (mismos $m/z \leq 211$) concuerdan con los ya reportados (Hamilton *et al.*, 1962; Klun *et al.*, 1970; Corcuera, 1974 y Woodward, 1975), así como con aquellos picos producidos por la benzoxazolinona (mismos $m/z \leq 165$; Corcuera, 1974; Woodward, 1975).

En las condiciones utilizadas, el ión molecular ($m/z = 373$) se observó con una intensidad $< 2\%$ relativa al pico base, posiblemente debido a la baja volatilidad del glucósido. Su espectro indica que este compuesto probablemente se fragmenta en una porción heterocíclica ($m/z = 195$ y 211) y en una porción de azúcar ($m/z = 179$). El heteroci-

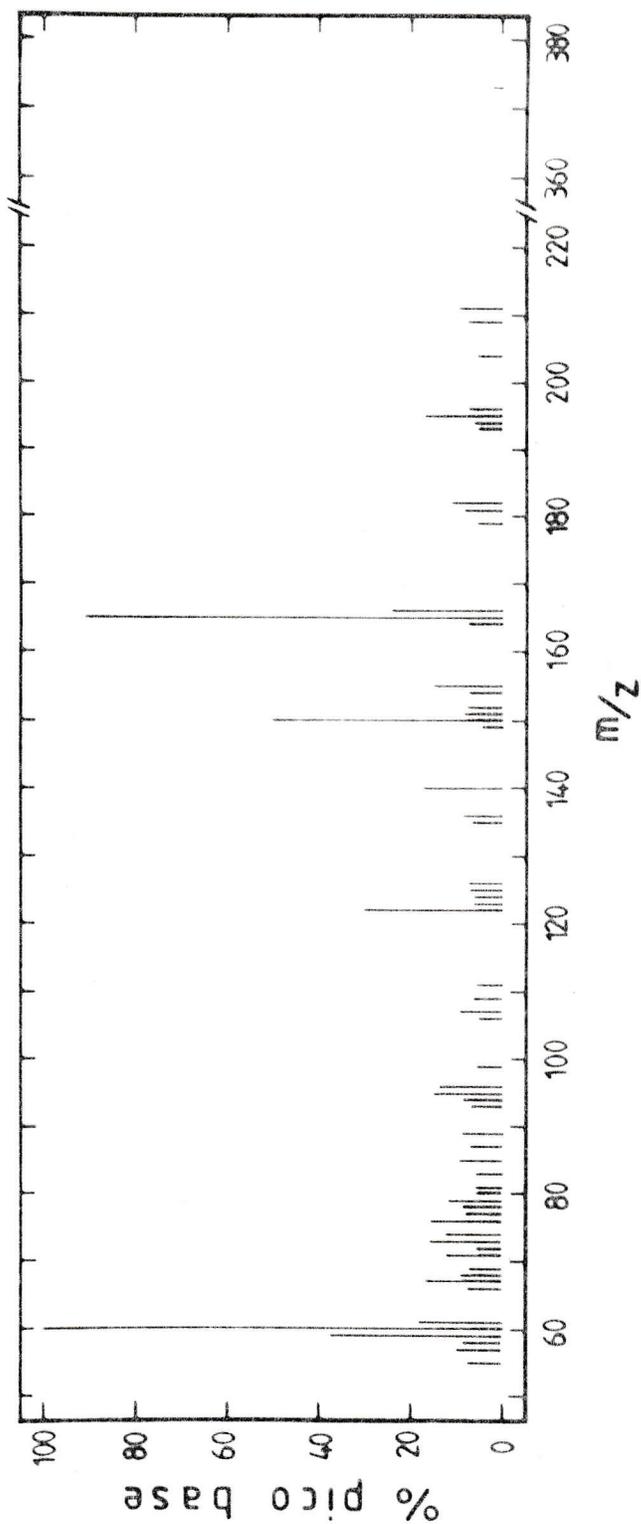


Figura 9. Espectro de masas del DIMBOA-Glc.

El Hx sólido se colocó directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro Varian CH 7. Se graficaron las señales con $m/z \geq 55$ y con intensidad relativa al pico base ($m/z = 60$) $\geq 5\%$, excepto la señal correspondiente al ión molecular ($m/z = 373$).

clo parece degradarse vía la benzoxazolinona MBOA ($m/z = 165$). El pico base ($m/z = 60$) correspondería a grupos de fórmula $(CH_2O)_2$, provenientes del azúcar mediante 4 posibles formas de fragmentación, dando esto cuenta de la alta intensidad relativa. La fórmula para la porción del pico base es apoyada por las señales acompañantes de menor m/z (59, 58 y 57), debidas posiblemente a pérdidas de H.

4.5. Espectro visible del complejo formado por DIMBOA-Glc con $FeCl_3$

Se disolvió DIMBOA-Glc en reactivo de $FeCl_3$ (pág. 68) y la mezcla se tornó de color azul intenso. Mediante un Shimadzu UV 240 se obtuvieron los espectros mostrados en la Fig. 10. Se aprecia que la absorbancia es máxima en los 580 nm ($\epsilon = 1.332$) y que prácticamente no hay diferencias en la forma de las curvas ante distintas concentraciones del Hx.

4.6. Espectro visible de los productos de reacción entre DIMBOA-Glc y antrona

4.6.1. Reacción del DIMBOA-Glc con la antrona

Para formar compuestos coloreados, la antrona debe reaccionar con los grupos reductores de los azúcares (Dische, 1962), por lo cual es necesario hidrolizar previamente el DIMBOA-Glc. Por otro lado, dada la inestabilidad de la aglucona liberada (DIMBOA), es probable que las condiciones drásticas para la hidrólisis del glucósido (alta t° ,

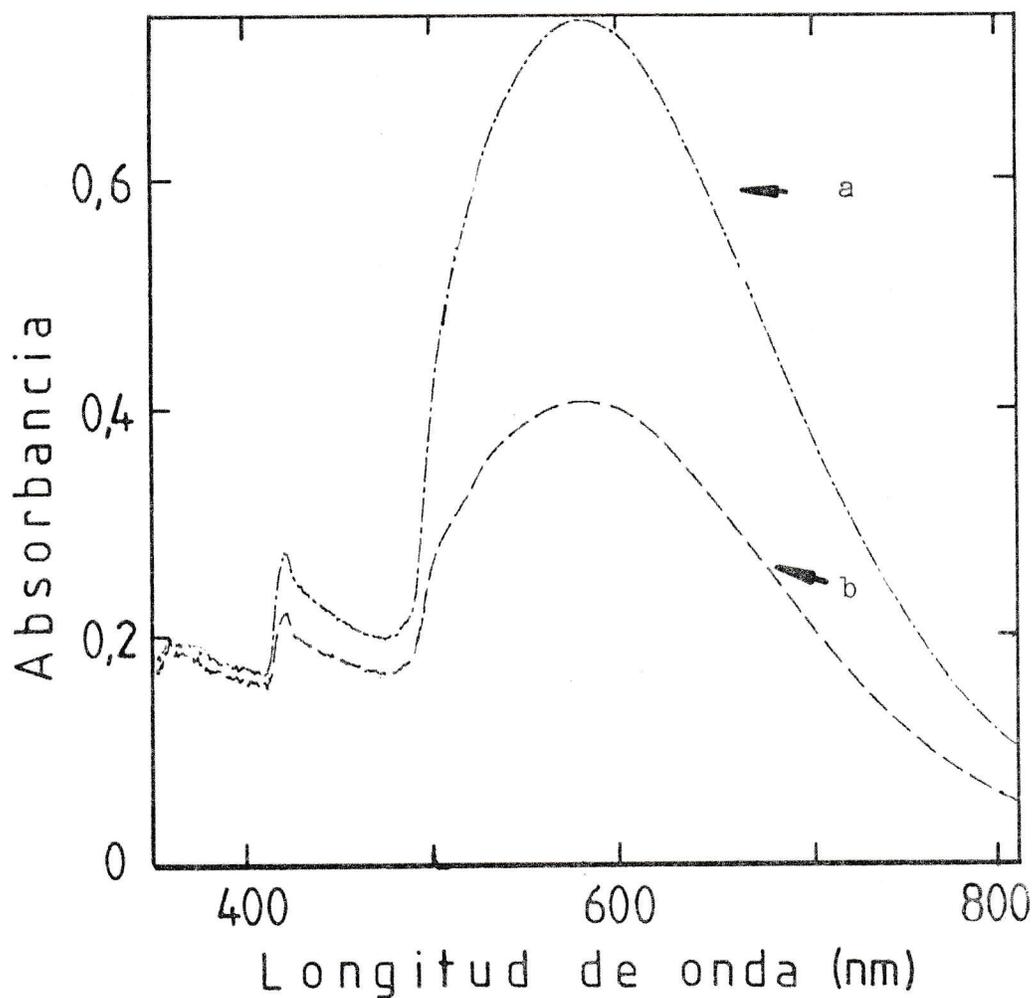


Figura 10. Espectros del DIMBOA-Glc en el rango de luz visible con reactivo de FeCl_3 .

Se disolvió el Hx en reactivo de FeCl_3 (pág. 68) y los espectros se obtuvieron contra el mismo reactivo como blanco. Las concentraciones del DIMBOA-Glc en la mezcla colorimétrica fueron 0,555 mM (a) y 0,306 mM (b).

bajo pH) permitan una rápida descomposición de la aglucona, lo cual podría afectar las mediciones. Por esto, se siguió previamente el progreso de la reacción a 95° entre DIMBOA-Glc y reactivo fresco de antrona (200 mg de antrona disuelta en 100 ml de H_2SO_4). Se observaron grandes cambios espectrales (Fig. 11): el compuesto color verde conformado por la glucosa y la antrona se va degradando y aparece(n) algún(os) producto(s) que absorbe(n) mayormente en los 510 - 490 y en los 550 - 540 nm y que interfiere(n) notoriamente con la A_{620} más allá de 20 min de reacción; también el reactivo mismo se descompone, absorbiendo cada vez más en los 425 nm. Además, se vieron variaciones en el ϵ_{620} al transcurrir el tiempo (Figs. 11 y 12). A pesar que la incubación entre 4 y 5 min es muy variable en cuanto al factor tiempo (Fig. 12) y a pesar que el ϵ_{620} es el máximo (Fig. 11) y, por ende, el más variable en valores absolutos, el tiempo de incubación usado fue de 5 min, pues se tiene mayor resolución y una pequeña interferencia de las bandas de absorción a menor λ (Fig. 11).

4.6.2. Comparación con el espectro de glucosa con antrona

En tubos con 1 ml de agua, se disolvió glucosa o DIMBOA-Glc y se agregó 2 ml de reactivo fresco de antrona. La mezcla se incubó de inmediato a 95° por 5 min, adquiriendo un color verde oscuro; luego se enfrió en hielo hasta t° ambiente, tomándose entonces los espectros pertinentes (no mostrados) mediante un Shimadzu UV 240. Como blan

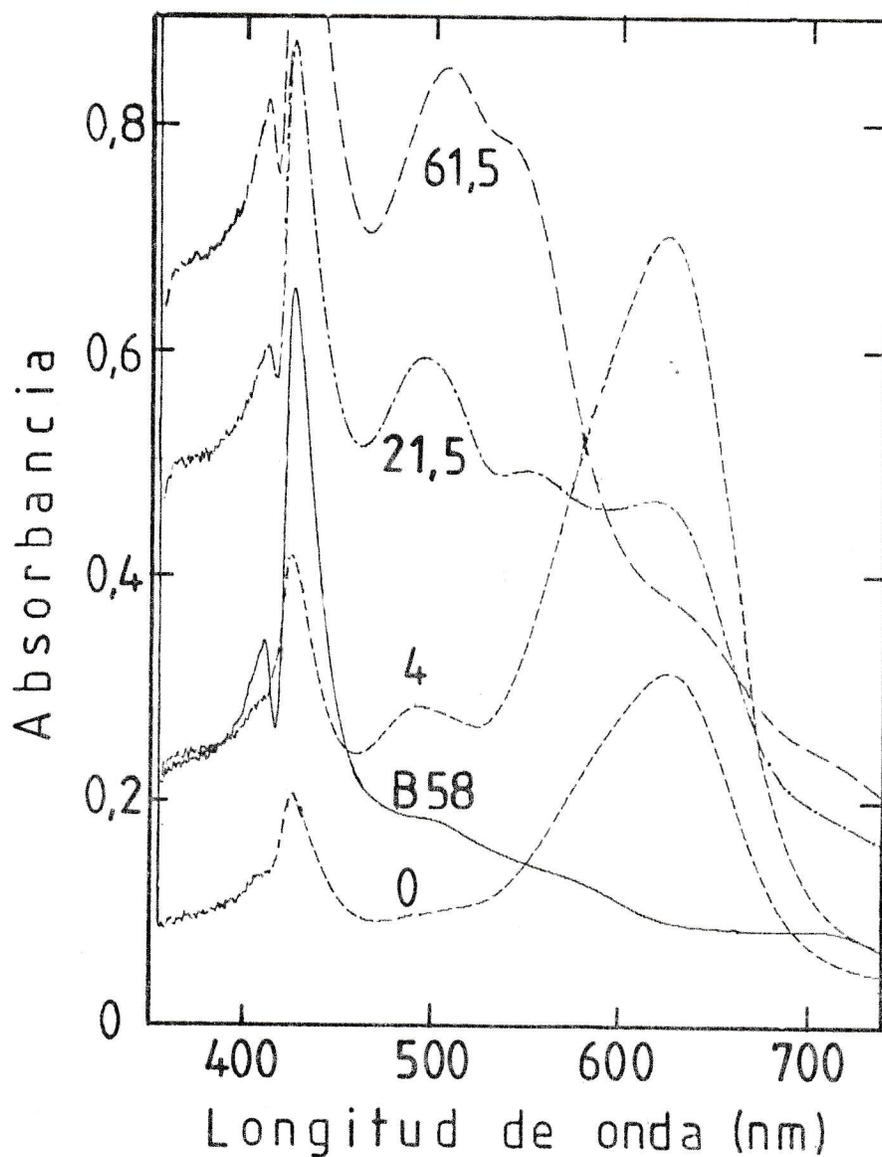


Figura 11. Espectros del DIMBOA-Glc con reactivo de antrona en el rango de luz visible, a distintos tiempos de reacción.

En tubos con 1 ml de agua se disolvió DIMBOA-Glc en iguales cantidades y se les agregó 2 ml de reactivo de antrona, colocándolos inmediatamente en un baño

Figura 11. Continuación.

a 95° , excepto los tiempo cero, que se pusieron en hielo hasta alcanzar la t° ambiente. En distintos momentos (números en las gráficas, en min) se sacaron los tubos y se enfriaron en hielo hasta alcanzar la t° ambiente, determinándose entonces sus espectros en un Shimadzu UV 240 contra un blanco de tiempo cero constituido por agua (1 ml) y antrona (2 ml). El blanco a tiempo 58 min (B58) corresponde a agua (1 ml) con reactivo de antrona (2 ml) incubado a 95° durante ese tiempo.

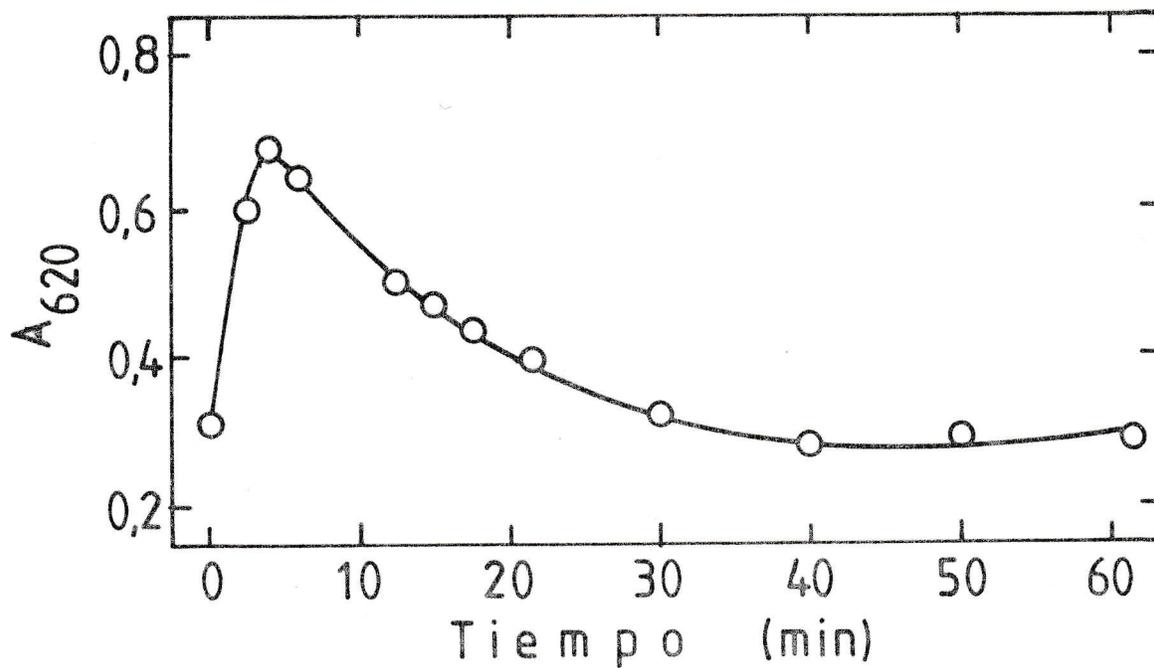


Figura 12. Curva de progreso de la reacción colorimétrica entre el DIMBOA-Glc y el reactivo de antrona.

Esta ilustración fue confeccionada restando los blancos respectivos a las A en los 620 nm. Estas A se determinaron como se indica en la leyenda de la Fig. 11, de cuyos espectros se han tomado algunos de los puntos aquí graficados.

co se usó agua (1 ml) mezclada con reactivo de antrona (2 ml) y tratada como los demás tubos. Se vio que los espectros de absorción de ambos compuestos en el rango de luz visible son parecidos a uno de los mostrados en la Fig. 11 (4 min): ambos presentan un máximo intenso ($\epsilon = 7.770$) en los 625 nm, así como otros dos máximos menores a longitudes de onda más bajas. Las pequeñas diferencias espectrales observadas entre la glucosa y el glucósido serían debidas a la aglucona liberada por la hidrólisis ácida. La DIMBOA da un color amarillo, y muy probablemente se descompone, al mezclarla con el reactivo de antrona. Sin embargo, lo importante es que la aglucona prácticamente no interfiere en la banda de mayor absorción por azúcares ($\lambda_{\text{máx}} = 625 \text{ nm}$), la cual es usada para cuantificar estos hidratos de carbono. Tampoco molesta la antrona descompuesta, pues ésta absorbe en los 425 y 410 nm (blanco en Fig. 11). Por otra parte, la concentración de azúcar o de DIMBOA-Glc no afecta mayormente la forma del espectro (no mostrado).

5. Cuantificación del DIMBOA-Glc. Curvas de calibración

Para esto, se confeccionaron curvas estándar a las λ escogidas. En las gráficas de A Vs. Molaridad, para cada λ estudiada, la pendiente representa el coeficiente de extinción molar (ϵ) y el intercepto en el eje de las ordenadas (A_0) corresponde a la absorbancia sin soluto y debe

ser igual a cero. Cada punto de las figuras representa el promedio de 2 o 3 determinaciones. Las rectas fueron trazadas por regresión lineal.

5.1. Absorbancia ultravioleta del DIMBOA-Glc en agua saturada con cloroformo

Se dispusieron alícuotas de distinto volumen de una solución $4,44 \cdot 10^{-4}$ M del glucósido y se llevaron a 1,00 ml con agua desionizada saturada con cloroformo. Luego se leyó la A a 270 nm en un Shimadzu UV 240 con el mismo solvente como blanco. Se encontró que a concentraciones bajas ($< 40 \mu\text{M}$) se cumple la ley de Lambert-Beer, tanto en los 260 como en los 270 nm. Se obtuvo una recta cuyos parámetros de regresión lineal son : $\epsilon = 9.083$; $A_0 = 0,0004$ y $r = 0,9997$. Con agua sola como solvente, se halló algo similar. Wahlroos y Virtanen (1959b) informaron un $K_{270}^{\text{H}_2\text{O}} = 29,6$, que correspondería a un $\epsilon_{270} = 8.786$ (con base en que ellos encontraron que la DIMBOA tiene un $K_{\text{máx}} = 34,7$ y un $\epsilon_{\text{máx}} = 10.300$). Por otro lado, a medida que aumenta la concentración del glucósido, el ϵ va disminuyendo notoriamente, tanto en los 270 como en los 260 nm, fenómeno que fue previamente visualizado por los cambios espectrales ocurridos (Fig. 7). Estos resultados concuerdan con lo informado por Tipton et al. (1971), quienes observaron un hiperchromismo en la absorción de una solución acuosa de la DIMBOA en los 264 nm. Ellos encontraron una disminución de

un 4,3 % en el ϵ_{264} al aumentar la concentración desde 167 μM ($A_{264} = 1,78$) a 1.670 μM ($A_{264} = 17,03$). No hicieron lo equivalente con el glucósido. En el presente trabajo se halló que el ϵ de este compuesto disminuía en un 25 % aproximadamente al aumentar la concentración desde 111 a 444 μM (≈ 1 a 3 unidades de A).

5.2. Curva estándar del DIMBOA-Glc con reactivo de FeCl_3

Se dispusieron diversas alícuotas de una solución acuosa de DIMBOA-Glc 31,25 mM y se les agregó 3 ml de reactivo de FeCl_3 (pág. 68). Se hicieron los blancos adecuados con alícuotas de agua y reactivo. Posteriormente se leyó la A contra agua de los tubos con y sin el Hx en los 590 nm en un Shimadzu UV 240. Se obtuvo una recta cuya pendiente es $\epsilon_{590} = 1.322$; su intercepto es $A_0 = -0,016$ y su coeficiente de correlación es $r = 0,9993$. Hamilton (1964a), mediante un fotocolorímetro Klett (con filtro 59) encontró un mismo ϵ para la aglucona y para el DIMBOA-Glc con FeCl_3 , aunque no reportó su valor. En el presente caso, se observó que el ϵ_{590} es similar al de la DIMBOA ($\epsilon_{590} = 1.313$), aun cuando para el glucósido la $\lambda_{\text{máx}} = 580$ nm (Fig. 10) con un $\epsilon_{580} = 1.332$. De manera que a pesar de las diferencias en los espectros con FeCl_3 del DIMBOA-Glc y de la DIMBOA (Figs. 5 y 10), las absortividades a 590 nm son lo suficientemente parecidas (difieren 0,7 %) como para cuantificar los Hx existentes en una mezcla de estos

compuestos, haciendo la equivalencia ya sea al glucósido o a la aglucona. En el primer caso, la recta (en los 590 nm) es válida hasta al menos una concentración de 1,9 mM (2,5 A/cm) en el reactivo de FeCl_3 ; para la aglucona sirve al menos hasta 1,5 mM (pág. 72). Más aún, el parecido entre los ϵ_{590} muestra que hay 1 molécula de Hx por cada molécula de glucósido.

5.3. DIMBOA-Glc y el reactivo de antrona

Diferentes cantidades conocidas del glucósido disueltas en agua desionizada se diluyeron hasta 1 ml en el mismo solvente y se les agregó 2 ml del reactivo de antrona (200 mg de antrona en 100 ml de H_2SO_4 ; Dische, 1962) recién preparado. Se calentaron a 95° por 5 min en un baño y se enfriaron en hielo hasta temperatura ambiente. Luego se leyó su A a 620 nm. Como blanco se usó agua desionizada tratada de igual manera que las muestras. En la Fig. 13 está la recta correspondiente, cuyos parámetros de regresión lineal son $\epsilon_{620} = 7.701$; $A_0 = 0,002$ y $r = 0,9990$. Con glucosa se hizo lo mismo y los puntos respectivos se muestran incluidos en la Fig. 13. En este caso se obtuvieron los siguientes parámetros: $\epsilon_{620} = 7.575$; $A_0 = 0,008$ y $r = 0,9984$. Se aprecia que en el caso de la glucosa el ϵ_{620} es un 1,6 % menor que en el caso del glucósido, lo cual podría deberse a la influencia de la DIMBOA liberada en la hidrólisis como a los productos de su des-

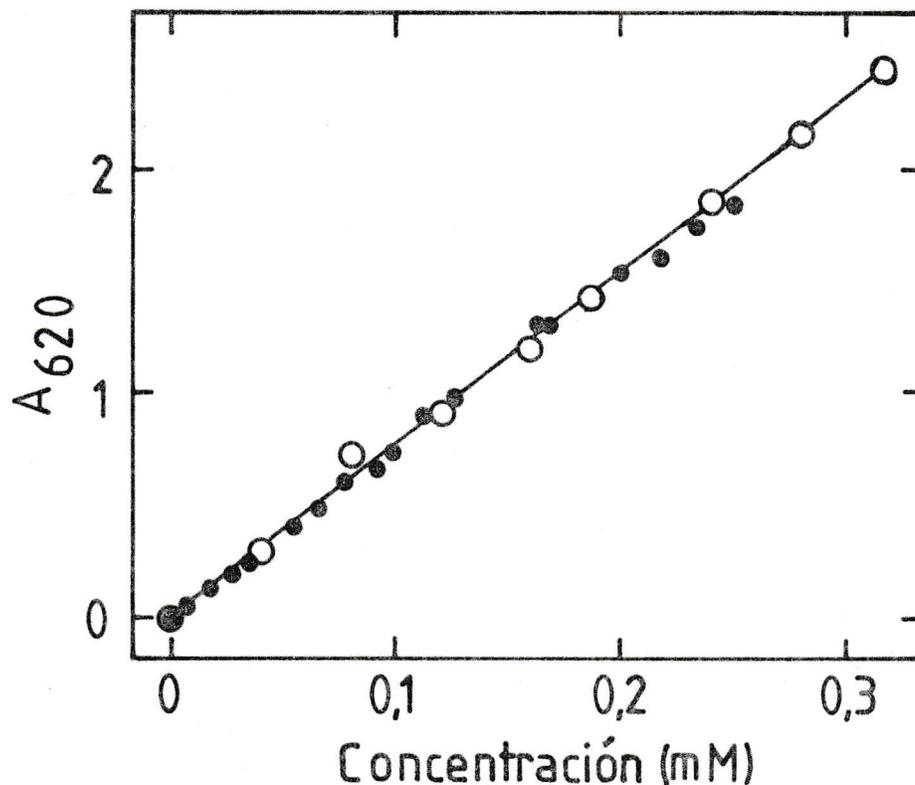


Figura 13. Curvas de calibración de DIMBOA-Glc y de glucosa con reactivo de antrona.

Se disolvieron diversas cantidades de DIMBOA-Glc (○) o de glucosa (●) en 1 ml de agua y se les agregó 2 ml de reactivo de antrona fresco (200 mg de antrona disuelta en 100 ml de H_2SO_4), calentándose inmediatamente en un baño a 95° durante 5 min y enfriándose en hielo hasta la t° ambiente. Se hicieron blancos con agua (1 ml) tratada igual que las muestras. Luego se leyó la A a 620 nm de cada mezcla.

composición durante la reacción colorimétrica. La pequeña diferencia observada y la pureza del DIMBOA-Glc (no está contaminado con DIMBOA ni con glucosa) le confieren validez a este método para cuantificar el DIMBOA-Glc (y muy probablemente otros glucósidos de benzoxazinas), a la vez que ratifica que el compuesto estudiado está formado por sólo una molécula de azúcar por cada molécula de Hx. Por otra parte, la ley de Lambert-Beer se cumple hasta al menos 0,25 mM ($A \sim 1,9$) para la glucosa y 0,36 mM ($A \approx 2,8$) para el DIMBOA-Glc, ambos compuestos disueltos en la mezcla colorimétrica. El alto ϵ (> 7.500) otorga bastante sensibilidad en las mediciones.

B. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE Hx EN MAIZ LH Rinconada

En general, el material fresco utilizado en estos experimentos se obtenía del siguiente modo: se desinfectaban cariósides de maíz LH Rinconada con hipoclorito de sodio comercial diluido al 50 % en agua, durante 30 min; se lavaban con abundante agua potable y se enjuagaban con agua destilada. Luego se ponían a germinar en bandejas plásticas (300 frutos/bandeja), cubriendo completamente los granos con vermiculita esterilizada (1 lt/bandeja). Se agregaba agua destilada hasta la capacidad de campo del sustrato (400 ml/lt vermiculita). Las bandejas se colocaban en una estufa termorregulada a $28 \pm 1^\circ$, en oscuridad to-

tal, o bien, en un invernadero a $28 \pm 2^\circ$ bajo luz continua provista por 3 ampolletas incandescentes (450 W) y 12 tubos fluorescentes (480 W), ubicados a 80 cm de la superficie del cultivo. Se regaban periódicamente con agua destilada, tratando de mantener al sustrato a su capacidad de campo.

1. Recuperabilidad en las extracciones

Se necesitó determinar la concentración real de Hx existente en la planta sobre la base de la cantidad (equivalente a DIMBOA) que se extrae por el procedimiento general empleado. Además, se quiso saber la pérdida de Hx ocurrida en diversas etapas del método usado. Con estos fines, se realizaron los experimentos que se describen a continuación:

1.1. Recuperabilidad en la molienda de los tejidos

Aquí se pretendió determinar la proporción del total de Hx que queda retenida en el residuo fibroso al filtrar los tejidos molidos. Se cosecharon 3 muestras, de 10 g c/u, de la parte aérea de plántulas de 8 días de edad, cultivadas como se describió. A cada muestra se la sometió, por separado, al tratamiento que se muestra en la Fig. 14 y que a continuación se explica:

1º Los órganos aéreos (10 g) se molieron en mortero con 2 ml de agua destilada. Los tallos y hojas molidos se filtraron a través de lienzo mediante presión dactilar. A

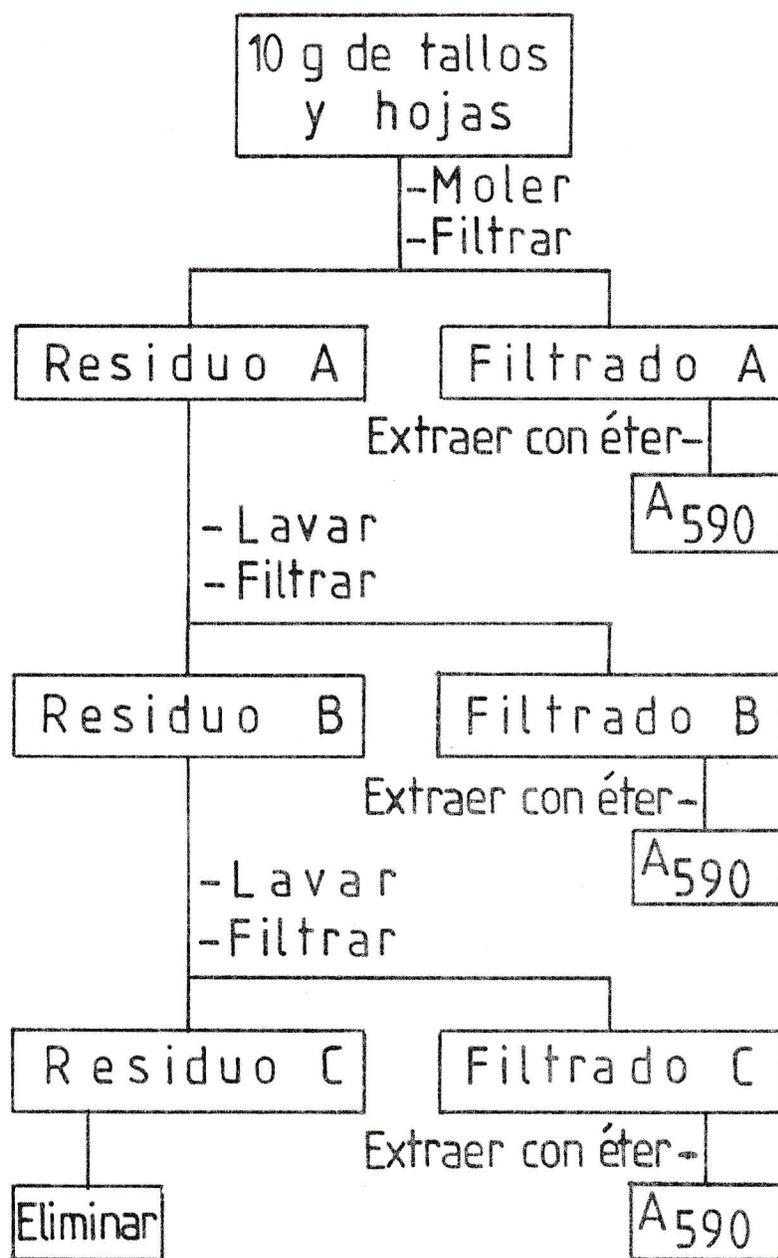


Figura 14. Esquema del experimento de recuperabilidad de DIMBOA en la molienda de los tejidos.

Las explicaciones están dadas en el texto.

A₅₉₀ : Absorbancia a 590 nm.

- la fase líquida (filtrado A; 10 ml) se le agregó el agua (5 ml) con que se lavó el mortero. El residuo sólido (residuo A) se guardó en un congelador por 15 min.
- 2º El filtrado A se extrajo 2 veces con iguales volúmenes de éter. Las fases etéreas combinadas se evaporaron soplando aire seco.
- 3º El residuo A se lavó en el mortero con 10 ml de agua destilada y se filtró a través de un lienzo. Se obtuvo así un residuo B y un filtrado B; el mortero se enjuagó con 5 ml de agua destilada, que se agregó al filtrado B.
- 4º El filtrado B se procesó igual que el A.
- 5º El residuo B se trató igual que el A, obteniéndose un filtrado C y un residuo C.
- 6º El filtrado C se procesó igual que los anteriores y el residuo C se eliminó.
- 7º A cada uno de los remanentes resultantes de la evaporación de las fases etéreas se le agregó 5 ml de reactivo de FeCl_3 y se leyó su A a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman DU.

Los resultados logrados aparecen en la Tabla IV. De ésta y de la Fig. 14 se deduce que la cantidad de Hx totales que queda en el residuo fibroso eliminado (residuo C) es menos del 1,5 % del total que es susceptible de extraerse desde las plántulas. La mayor A que se obtiene si se

Tabla IV. Recuperabilidad de DIMBOA desde los tejidos macerados de maíz.

	FILTRADO	FILTRADO	FILTRADO	TOTAL
	A	B	C	TEORICO ⁺
Hx en $\frac{\text{mg de Hx}}{\text{Kg de TF}}$	1.360	296	74	1.572
Extracción (como % acumulado del total teórico ⁺)	77,6	16,9	4,2	98,7

⁺El total teórico se obtuvo sumando todos los valores de concentración de Hx, tanto experimentales (los mostrados) como extrapolados; éstos se obtuvieron dividiendo iterativamente la última concentración de Hx por el cociente (cuyo promedio es 4,3) entre la concentración de Hx de un filtrado y la del filtrado precedente.

agrega etanol al moler los tejidos (pág. 115) sería debida a una extracción inicial más eficiente de los Hx existentes en las plántulas, y no por causa de una extracción de ácidos unidos al residuo y no extraíbles con agua, puesto que lavando el material fibroso remanente con agua se logra extraer finalmente la misma (o una mayor) cantidad de hidroxamatos que la que se obtiene incluso lavando con el alcohol.

1.2. Recuperabilidad según la cantidad de extracciones etéreas

Como la extracción con éter desde el filtrado no es total, se hizo necesario averiguar cuánta cantidad de ácido hidroxámico se recuperaría en el proceso a seguir. Para esto, se siguió un método iterativo: se molieron 5 g de plántulas; se filtraron a través de lienzo mediante presión dactilar; se lavaron el mortero y el residuo (5 ml por 2 veces); el líquido de los lavados se agregó al filtrado; el filtrado se extrajo 4 veces con éter dietílico (éter : extracto = 2 : 1; las fases etéreas se evaporaron y a cada residuo se le agregó FeCl_3 (reactivo) y se leyó la A a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman DU. Todo este proceso se efectuó en triplicado. También se hizo lo mismo extrayendo en proporciones de éter : extracto = 1,5 : 1 y = 1,2 : 1 v/v. Los resultados pertinentes se muestran en la Tabla V. Aquí se ve que la recuperabilidad de DIMBOA, con 3 ex-

Tabla V. Recuperabilidad de DIMBOA según la cantidad de extracciones etéreas (en proporción 2 : 1 = éter : extracto).

	Nº de la extracción etérea								TOTAL
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	
[Hx] ⁺ experimental	1.400	574	222	109	47	20	9	4	2.385
[Hx] ⁺ en la fase acuosa antes de la extracción	2.385	985	411	189	80	33	13	4	
% de recuperabilidad total hasta el lavado (n)	57,0	81,5	92,1	96,6	98,6	99,4	99,8	99,9	100

+ [Hx] es la concentración de Hx en mg de Hx/Kg de TF y corresponde al promedio de 3 determinaciones (el mayor error estándar no excede del 5 %). Los valores de [Hx] correspondientes a las extracciones 5^a a 8^a son estimados teóricamente, suponiendo que, en cada lavado etéreo sucesivo, se sustraen 43/100 de lo extraído en la separación de fases anterior. Este cociente (0,43) se obtuvo promediando los cocientes entre las [Hx] de una extracción etérea dada y la precedente. La recuperabilidad total se obtuvo calculando el % que representa lo sustraído hasta el lavado (n) con respecto a la [Hx] total.

tracciones etéreas en proporción de éter : extracto acuoso = 2 : 1 v/v, es del 92 %. Con las demás proporciones, la recuperabilidad fue de 88,5 y 81,7 %, respectivamente. Estos porcentajes de recuperabilidad no incluyen la pérdida de Hx que podría ocurrir por la reacción de éstos con alguno(s) de los componentes del extracto, ya sean aminoácidos, proteínas, reductores, u otros compuestos. Tal pérdida no ha sido cuantificada, aun cuando actualmente uno puede aventurar que es menos del 1 %, considerando las condiciones de la extracción; esta afirmación es avalada por el hecho que a 28 °, la vida media de DIMBOA en medio de cultivo bacteriano a pH 6,75 es 5,3 h (Woodward et al., 1978a) y en dieta para pulgones a pH 5,5 es \approx 50 h (Argandoña et al., 1982). Cabe señalar que el extracto filtrado tiene un pH 5,6 y se baja a 3,0 con HCl en cuanto se ha filtrado.

Por lo tanto, conforme a estos dos experimentos de recuperabilidad, todos los extractos ejecutados para la cuantificación se hicieron lavando con agua (por 2 veces, como ya se describió) el residuo de la primera filtración y extrayendo 3 veces con éter (éter : filtrado = 2 : 1 v/v) ; los valores de concentración de Hx obtenidos se corrigieron por el porcentaje de recuperabilidad total, cual es 90,7 %, o sea, el 92,1 % del 98,5 % (92,1 por la extracción etérea y 98,5 por lo que queda en el residuo fibroso).

1.3. Recuperabilidad según el tiempo conferido para la hidrólisis del DIMBOA-Glc en los extractos acuosos

Dada la inestabilidad de las agluconas hidroxámicas en solución, se necesitó averiguar cuánto tiempo, desde que se comienza a moler el tejido, es preciso para que todos los glucósidos de ácidos hidroxámicos sean hidrolizados. También se quiso saber la estequiometría de la reacción hidrolítica. Para cumplir estos objetivos, se cosecharon plántulas de 5 días de edad y se sometieron al siguiente procedimiento: Se pesaron 18 grupos de plántulas de 4,0 g c/u, guardándose en el refrigerador los que no se usaron inmediatamente. Cada grupo se molió en mortero y se dejó reposar un tiempo dado, al cabo del cual se le bajó el pH a 2,0 con HCl 37 % p/v. El tiempo mínimo en moler bien un grupo fue de 6 min, por lo cual fue éste el primer tiempo distinto de cero que se consideró. El tiempo 0 se efectuó moliendo las plántulas en HCl 1 M, de modo que el extracto no subió de pH 2,0 durante la molienda. Para cada tiempo considerado, se hicieron tres repeticiones. De cada extracto acuoso se tomaron 5 ml, los que se extrajeron 3 veces con éter (éter : extracto = 1 : 1 v/v. Las 3 fases etéreas se juntaron y evaporaron soplando aire seco. Por otro lado, se tomaron alícuotas de los extractos acuos después de la separación de fases con éter. A estas alícuotas y al residuo etéreo se les agregó reactivo de

FeCl_3 y se leyó la A a 590 nm en un Beckman DU. Los resultados se muestran en la Fig. 15, de donde se deduce, por una parte, que la hidrólisis de 1 mol de DIMBOA-Glc da lugar a 1 mol de DIMBOA, considerando que el ϵ_{590} es muy parecido para ambos Hx (pág. 99). Por otro lado, de la misma ilustración se desprende que el total del glucósido es hidrolizado en un tiempo menor que el requerido para la molienda, de modo que no es necesario esperar tiempo adicional para extraer la aglucona como el que emplearon Reimann y Byerrum (1964), Tipton et al. (1967), Woodward et al. (1978a; 1979b) y Gahagan y Mumma (1967); estos últimos dejaban reposar (30 min, t° ambiente) el homogenizado con etanol al 60 % sin considerar la desnaturalización de las enzimas. De este modo, se puede evitar cierta descomposición de los Hx; de hecho, en 1 h se descompone más de un 2 % de la DIMBOA en amortiguador succinato (pH 5,5) a 25° (Woodward et al., 1978a); más aún, solventes no acuosos y algunos compuestos naturalmente presentes en los homogenizados (aminoácidos, proteínas, reductores) aceleran la degradación de la DIMBOA, como es el caso de la cisteína (pág. 176; Argandoña et al., 1982; Niemeyer et al., 1982; Bravo et al., 1982). Sin embargo, en esta tesis no se cuantificó la pérdida de todas las etapas involucradas en el procedimiento usado, como la desaparición de Hx debida a su posible degradación en los pasos que van desde la homogenización de los tejidos hasta las extracciones e

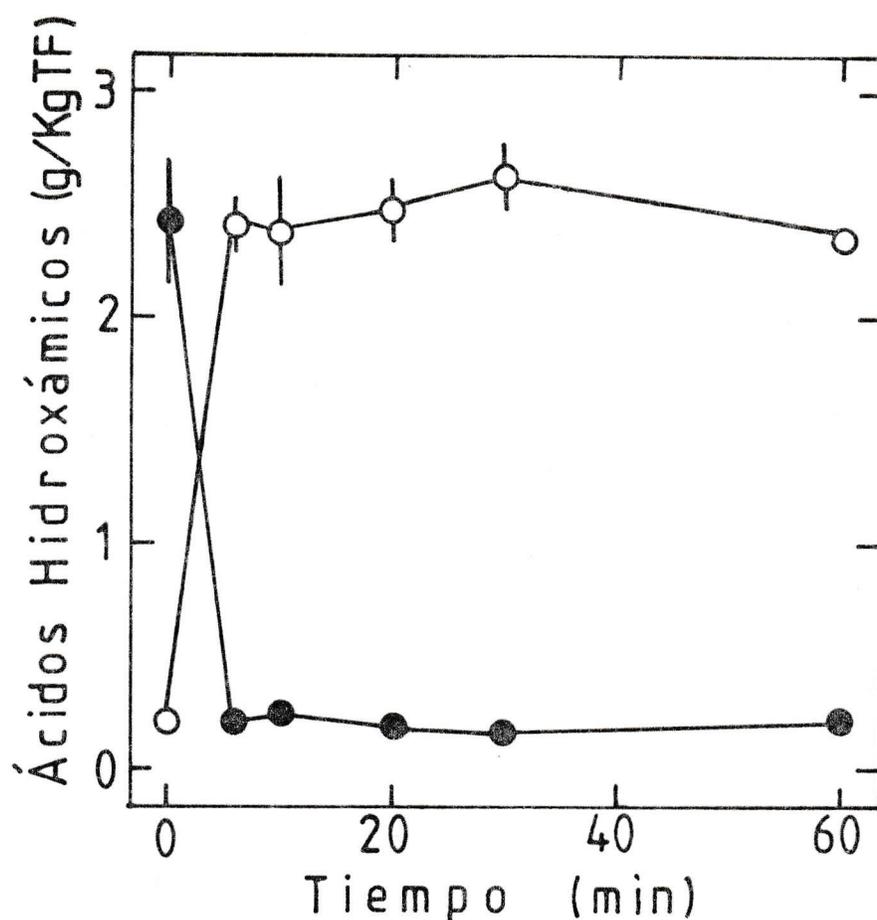


Figura 15. Hidrólisis enzimática del DIMBOA-Glc en extractos acuosos de maíz LH Rinconada.

Se molieron plántulas etioladas de 5 días de edad y, a los tiempos señalados, se bajó a 2,0 el pH del extracto acuoso, se extrajo con éter y se determinó la concentración de Hx en ambas fases por el método del FeCl_3 . Se supuso que prácticamente todo el glucósido (●) quedaba en la fase acuosa, en tanto que la aglucona (O) pasaba a la fase etérea. El tiempo cero se realizó moliendo con HCl 1 M, de modo que el pH del extracto no subió de 2,0. Cada punto del gráfico representa el promedio de 3 réplicas \pm 1 error estándar.

téreas. Un experimento que permitiría obtener la recuperabilidad de Hx con el método de extracción empleado, sería el de agregar distintas cantidades de DIMBOA a varias porciones del tejido fresco usado y cuantificar los Hx encontrados, de manera que, mediante regresión lineal, sea posible obtener el porcentaje de recuperabilidad del glucósido total ($\%_{\text{recup}} = \text{pendiente} \cdot 100$) y la cantidad de Hx existente en la planta ($\text{Hx}_{\text{planta}} = \text{Intercepto} \cdot \frac{100}{\%_{\text{recup}}}$). A partir de este método uno puede llegar a saber con más precisión cuánta DIMBOA se descompone durante la extracción (aunque las plántulas de maíz contienen Hx), midiendo la cinética de degradación de la DIMBOA en el extracto, ya que se conocería la cantidad de Hx que existe en la planta. Por otro lado, si bien este procedimiento para determinar la recuperabilidad permite una muy buena aproximación a la cantidad real de Hx existente en las plantas (pues el intercepto y la pendiente se determinan por regresión lineal), es más costoso (se necesita DIMBOA purificada) y sería más lento (se precisarían más de 3 determinaciones) que la técnica utilizada en el presente trabajo.

Por lo tanto, concorde con los experimentos de recuperabilidad, por el método aquí empleado se puede cuantificar la concentración de Hx en las plántulas con buenos rendimientos y en poco tiempo. Además, con este procedimiento cuantitativo se obtiene buena precisión, pues las

réplicas (en triplicado) arrojan valores cuyo error estándar, en general, no excede el 5 %, lo cual es poco notorio ante las variaciones de los tratamientos experimentales realizados.

2. Extracción y medición de Hx

Las muestras se obtuvieron ya sea cosechando porciones de las plántulas cultivadas adecuadamente, o bien usando directamente los frutos. Cada muestra (5 o 10 g de TF) se molió en un mortero (agregando igual masa de agua en el caso de los frutos no germinados) y se filtró 2 veces según lo descrito (pág. 109). Los filtrados se juntaron y se bajó el pH a 3,0 con HCl 37 % p/v. El total (o una alícuota se centrifugó a 1.000 g por 10 min y se extrajo 3 veces con éter (éter : extracto = 2 : 1 v/v). Las 3 fases etéreas se juntaron en un frasco oscuro y se evaporaron soplando aire seco. Al remanente viscoso se le agregó 3 ml de reactivo de FeCl_3 y a la solución resultante se le determinó la A a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman DU. Las A_{590} obtenidas se transformaron a $\frac{\text{mg de DIMBOA}}{\text{Kg de TF}}$. En todos los experimentos se trabajó en semioscuridad y las soluciones con DIMBOA se mantuvieron a menos de 5 °. Cada ensayo se efectuó en triplicado.

Al seguir otros métodos de extracción alternativos al empleado, se observó que:

i) Si al moler los tejidos se agregaba etanol (Hamilton et al., 1962), y luego de filtrar no se lavaba el residuo fibroso, se obtenía una mayor lectura de A que sin el alcohol. Sin embargo, el proceso era largo (conllevaba mayor degradación de DIMBOA), costoso (se usaba alcohol) y engorroso (se formaban emulsiones y había mayor variabilidad entre las repeticiones). Por esto, se prefirió lavar el tejido residual usando agua solamente.

ii) Si al moler sólo con agua no se disminuía el pH, también aparecían emulsiones con el éter, a la vez que se formaban precipitados al agregar el reactivo de FeCl_3 . Por otro lado, la cantidad de DIMBOA que se saca con éter de extractos acuosos a pH 5,6 es la misma que la extraída a pH 3,0. Además, la degradación de la DIMBOA decrece más de 10 veces al bajar el pH a 3,0 (Woodward et al., 1978a; Niemeyer et al., 1982). Por todo esto, se prefirió disminuir el pH del extracto, aun cuando en las repeticiones se obtuvo una variabilidad mayor, pero no significativa.

Por otra parte, el que se cuantifique los Hx totales con base en una curva de calibración realizada con DIMBOA pura no es una aproximación muy gruesa, ya que tanto Klun y Robinson (1969; 5 variedades), como Woodward (1975) y Woodward et al. (1979b; 15 variedades), demostraron que una gran proporción ($\geq 90\%$ y 85% , respectivamente) de los Hx existentes en maíz corresponde a DIMBOA. Más aún, estos últimos autores encontraron, en plántulas de 7 días,

una relación directa $\approx 1 : 1$ entre la DIMBOA determinada por GLC y los Hx totales determinados por el método del FeCl_3 (pág. 68). Sin embargo, ellos especifican que este último procedimiento no proveería una estimación segura del contenido de DIMBOA en maíz en todos los estados del desarrollo de la planta, basados en que las cantidades relativas de DIBOA, DIMBOA y DIM_2BOA son mucho más variables en individuos de más edad. Pero para todas las determinaciones efectuadas en esta tesis, sólo se usaron plántulas (de no más de 12 días de edad). Sin embargo, en plantas de maíz De Kalb XL 335, las concentraciones de DIBOA serían mayores o menores que las de DIMBOA según la temperatura de cultivo (Thompson *et al.*, 1970). Mas, Zúñiga (1982) estableció que el $\epsilon_{590}^{\text{FeCl}_3}$ de la DIBOA es sólo un 5,6 % más alto que el de la DIMBOA: 1.326 y 1.256, respectivamente. Estos valores relativos, que caen dentro del error de medición en diferentes espectrofotómetros, concuerdan con lo reportado por Woodward *et al.* (1979b), quienes encontraron menos Hx por el método del FeCl_3 que por el de GLC en plantas con menor proporción de DIBOA relativa a la de DIMBOA (pág. 18).

C. EFECTOS DE Hx Y DERIVADOS SOBRE LA FASE LUMINICA DE LA FOTOSINTESIS

Todos estos experimentos se hicieron adicionando soluciones concentradas (generalmente 500 mM) de los compuestos en estudio (BOA, MBOA y DIMBOA disueltos en dimetilsulfóxido; DIMBOA-Glc disuelto en agua), inmediatamente antes de agregar los cloroplastos o las preparaciones enzimáticas al medio de reacción (salvo expresas excepciones). Además, en algunos experimentos, junto con colocar tales compuestos, se agregó un exceso equimolar de $MgCl_2$ o de $CaCl_2$. Las mediciones de las actividades fotofosforilantes y ATPásicas se hicieron en duplicado.

1. Preparación de cloroplastos clase II

Los tilacoides se aislaban desde hojas frescas de espinaca (Spinacia oleracea L.) adquiridas en el mercado. El procedimiento utilizado (Ravizzini et al., 1977) consiste en que: se iluminan hojas sin nervadura gruesa (unos 50 g) durante ½ h en agua corriente; se lavan con agua destilada y se muelen, durante 15 seg y en frío, con una juguera comercial que contiene 40 ml de medio STM (sacarosa 250 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,8 y $MgCl_2$ 5 mM); el homogenizado se filtra a través de un lienzo fino, por presión dactilar; el filtrado se centrifuga a 5.900 g durante 1 min, a 0°; el precipitado se resuspende, mediante un pincel, en 4 ml

de medio STM; esta suspensión se mantiene en hielo y oscuridad, hasta su uso; se determina el contenido de clorofila, según el método de Whatley y Arnon (1963), para lo cual se mezclan 20 μ l de la suspensión con 4 ml de acetona : agua = 4 : 1, se centrifuga y se lee la A del líquido sobrenadante a 652 nm; el valor obtenido se multiplica por el factor 5,8 y se obtiene, directamente, la concentración en mg de clorofila / ml de suspensión.

Debido al rudo procedimiento que se emplea, los cloroplastos resultan con sus membranas envolventes destruidas, por lo cual queda una suspensión de tilacoides y de grana que corresponden a los cloroplastos clase II.

2. Fotofosforilaciones

La síntesis de ATP se determinó en el mismo medio usado para la resuspensión de los cloroplastos (medio STM), con la adición de ADP 2 mM, fosfato de potasio 3 mM y 10 cpm de ^{32}P , concentraciones variables de los inhibidores a ensayar, y ya sea m-sulfato de fenazina 50 μ M (PPO cíclica), o bien, metil viológeno (MV) 100 μ M y azida de sodio 500 μ M (PPO no cíclica). Por cada tubo de ensayo se usaron cloroplastos equivalentes a 10 μ g de clorofila.

Las reacciones se llevaron a cabo en 1 ml de volumen total por tubo, a 25 °, en oscuridad o con luz saturante provista por una lámpara de halógeno de 500 W. Las sínte-

sis de ATP se iniciaron al agregar los cloroplastos al medio de prueba y se detuvieron después de 2 min mediante el complejamiento selectivo del P_i como fosfomolibdato de trietilamina ($P_iMo_2TEA_3$); para esto se agregó 1 ml por tubo de un reactivo precipitante (Sagino y Niyoshi, 1964) que contenía molibdato de amonio 12 mM, trietilamina 0,97 N y ácido perclórico 18 mM. Luego se centrifugaron los tubos a 1.500 g por 15 min. Del líquido sobrenadante (2 ml) se tomaron alícuotas de 0,5 ml, las que se depositaron en frascos blancos de plástico que contenían 10 ml de agua destilada c/u. Las cpm del ^{32}P incorporado en el ATP se obtuvieron en un contador de centelleo líquido Beckman LS-233.

3. Transporte de electrones

El transporte de electrones que ocurre en cloroplastos clase II desde el agua hasta el MV fue medido como consumo de O_2 con un electrodo Clark y un oxígrafo Gilson. Tal consumo de oxígeno está relacionado estequiométricamente 1 : 1 con la liberación de O_2 desde el agua por los tilacoides (fotólisis del agua).

Cada ensayo se hizo en 1,5 ml de volumen total, a 15 °. El medio de reacción usado contiene sacarosa 100 mM, Tricine-NaOH 25 mM (pH 8,0), NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, NaN_3 1 mM, MV 100 μ M y cloroplastos equivalentes a 60 μ g de clorofila. Además, al medio de reacción se le agregó ATP 150 μ M

y 800 μg de tripsina; cumplidos 10 min, se agregó un inhibidor de la tripsina disuelto en agua (1,6 mg/ml de medio de activación).

La reacción enzimática se realizó durante 10 min a 37° con luz ambiente, transfiriendo alícuotas de 0,1 ml del medio con la ATPasa activada, a 0,9 ml de un medio de reacción [Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), CaCl_2 5 mM y ATP 5 mM]. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de TCA 0,5 N. La suspensión resultante se dejó en hielo.

Para la medición del P_i liberado se usaron las recomendaciones hechas por Taussky y Shorr (1953). Para ello, cada muestra obtenida en el paso precedente se centrifugó y el líquido sobrenadante se mezcló con 1 ml de reactivo colorante (que contenía molibdato de amonio 1,6 % p/v, H_2SO_4 1,0 N y FeSO_4 5 % p/v), manteniéndose en hielo. Luego, el color azul del ácido fosfomolibdico reducido se desarrolló durante 2,25 min a 37° , o bien, durante 8 min a temperatura ambiente, y luego se leyó la A de cada solución a 740 nm, λ a la cual 1 μmol de P_i en 3 ml absorbe $1,17 \pm 0,03$ unidades.

5. Actividad ATPásica dependiente del Ca^{++} en CF_1 soluble

Se obtuvo CF_1 purificado desde espinacas según se ha descrito (Lien y Racker, 1971). Por electroforesis, realizada en geles de poliacrilamida, se encontró que la pureza de la enzima fue al menos de un 95 %. La cuantificación

del factor acoplante se determinó como proteína total por colorimetría métodos de Lowry et al. (1951) o del azul de Coomassie (Spector, 1978) , usando albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar y corrigiendo por los factores a apropiados, pues diferentes preparaciones proteicas tienen distinta capacidad de unión con las tinturas (Viale et al., 1981). El CF_1 se almacenaba insolubilizado con sulfato de amonio, a 5° . Para activar la ATPasa se centrifugaban (por 3 min en una centrífuga Eppendorf 3200) alícuotas su ficientes y el precipitado se disolvía en el medio de ac tivación adecuado, determinándose el contenido proteico.

Las activaciones por calor y por tripsina se basaron en los métodos de Lien y Racker (1971). La efectuada por DTE se realizó de acuerdo a la técnica de Arana y Vallejos (1982).

Las reacciones se llevaban a cabo en tubos con 1 ml de un medio de reacción (MR) idóneo, durante 5 a 10 min, a $37 \pm 0,2^\circ$; se iniciaban agregando alícuotas del CF_1 acti vado a los tubos preincubados por 20 seg a tal temperatu- ra. La hidrólisis enzimática del ATP se detenía adicionando 1 ml de TCA 0,5 N al MR, no observándose precipitación. Los tubos se llevaban entonces al hielo. Para los blancos se procedía igual, sólo que la enzima se agregaba después del TCA.

La medición del P_i liberado en cada ensayo se efectuó agregando 1 ml de reactivo colorante y procediendo como se explica precedentemente (pág. 121).

Con experimentos cinéticos se demostró que la reacción ATPásica es lineal a 37° por lo menos durante 15 min con Ca^{++} -ATP 5 mM y por más de 8 min con Ca^{++} -ATP 0,4 mM.

5.1. CF_1 activado por calor

El medio de activación [Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, ATP 40 mM y 100 μg de CF_1/ml] se calentó rápidamente hasta 63° en un baño; a los 4 min se enfrió con agua corriente, manteniéndose después a temperatura ambiente. La reacción ATPásica se inició transfiriendo alícuotas de 50 μl del medio con CF_1 activado, a 950 μl de MR [Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), ATP 5 mM y CaCl_2 5 mM].

5.2. CF_1 activado por tripsina

Se preparó una solución (400 μl) conformada por Tris-HCl-NaOH 40 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, ATP 1 mM y 200 μg de CF_1 ; la activación se inició agregando 10 μg de tripsina y, al cumplirse 20 min a 25° , se detuvo adicionando 80 μg de un inhibidor de la tripsina disuelto en 20 ml de una solución de Tris-HCl 100 mM, pH 8,6. La reacción (10 min) se inició agregando alícuotas de 0,5 ml del medio con el CF_1 activado, a tubos con 0,5 ml de una solución acuosa conformada por CaCl_2 10 mM y ATP 10 mM.

5.3. CF_1 activado por reactivos de Cleland (CF_1^+)

Se activaba enzima suficiente para cada experimento, concorde con el método descrito por Arana y Vallejos (1982).

El medio de activación [Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), DTE o DTT 50 mM, EDTA 2 mM y 1 a 2 mg de CF_1 / ml] se incubaba durante 2 a 3 h a 25 ° (con luz ambiente), llevándose a cabo la modificación de la enzima al eliminar el reactivo de Cleland mediante la técnica de filtración rápida por centrifugación (Penefsky, 1977; pág. 125), determinándose posteriormente el contenido de proteínas en el eluido de acuerdo con los métodos de Lowry et al. (1951) o del azul de Coomassie (Spector, 1978; pág. 125).

La reacción de hidrólisis del ATP se iniciaba colocando alícuotas del eluido (con 1,5 a 5 μ g de CF_1) en 1 ml de MR [Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), ATP 5 mM y $CaCl_2$ 5 mM] y se detenía luego de tiempos fijos entre 5 y 8 min. Ulteriormente se determinaba el P_i liberado según se describió (pág. 121).

6. Determinación de proteínas

6.1. Método de Lowry modificado

Se preparó una solución patrón de BSA (1,018 mg/ml), cuya concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente ($\epsilon_{279} = 6,67$ para una solución 1 % p/v. En tubos de ensayo se colocaron muestras de BSA (10 - 100 μ g de proteínas), de CF_1 (incógnitas), o nada (blancos) y se llevaron a 0,6 ml con agua destilada, se les agregó 3 ml de mezcla cuproalcalina (Na_2CO_3 2 % en NaOH 0,1 N, $CuSO_4$ 0,01 % y tartrato de sodio 0,02 %) y se esperó 10 min a

25 °, adicionando entonces 0,3 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido a 1/3 con agua. Luego de 30 min a temperatura ambiente, se leyó la A a 750 nm contra agua. La concentración de CF_1 se determinó en cada caso interpolando en la curva de calibración respectiva.

6.2. Método del azul de Coomassie

La preparación del reactivo se hizo con base en el método descrito por Spector (1978). Se disolvieron 10 mg de azul G brillante de Coomassie en 5 ml de etanol 95 %, se agregaron 10 ml de ácido ortofosfórico 88 % y la mezcla se llevó a 100 ml con agua, filtrándose a través de una placa porosa.

Para la cuantificación del CF_1 se dispusieron muestras de BSA (1 - 10 μ g de proteínas), de CF_1 (incógnitas) o nada (blancos) en tubos de ensayo y se llevaron a 0,1 ml con agua; se les adicionó 1 ml del reactivo y se leyó la A a 595 nm contra agua. Para cada determinación de proteínas, previamente se filtró el reactivo.

7. Filtración rápida por centrifugación

Se equilibró Sephadex G-50 fino en amortiguador estándar [Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0) y EDTA 2 mM] y se empacó en jeringas desechables (1 - 6 ml de capacidad). Las columnitas se centrifugaron a 95 g por 3 min (temperatura ambiente). Las muestras con CF_1 tratado se sembraron en

estas columnitas en proporción de 100 μ l/ml de gel hinchado, y se centrifugaron en iguales condiciones. Los elui - dos se usaron para los ensayos de actividad enzimática , luego de determinárseles el contenido de proteínas.

R E S U L T A D O S

A. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE Hx EN MAIZ

1. Variaciones en la concentración de Hx de acuerdo a la edad de las plántulas

Se puso a germinar maíz en oscuridad (pág. 102) y diariamente se cosechaba un número suficiente de plántulas, que se separaban en raíces y parte aérea, cuantificándose la concentración de Hx por el método ya descrito (pág. 114). Para el día primero se usaron los embriones sin dividir - los. Para el día cero se utilizaron los embriones completos de frutos sin cultivar. Se encontró que la concentración de Hx en las plántulas de maíz cambia de acuerdo con su edad (Fig. 16.A). Se observó que los Hx prácticamente aparecen durante la germinación de las semillas, puesto que en granos sin mojar, en frutos que finalizaron la imbibición y en embriones provenientes de cariópsides cultivadas entre 20 y 26 h, se encuentra menos de 3 mg Hx/Kg TF, valor que corresponde al límite de detección del método del FeCl_3 (en estos casos). Las fases acuosas remanentes de las extracciones etéreas resultaron FeCl_3 negativas, in

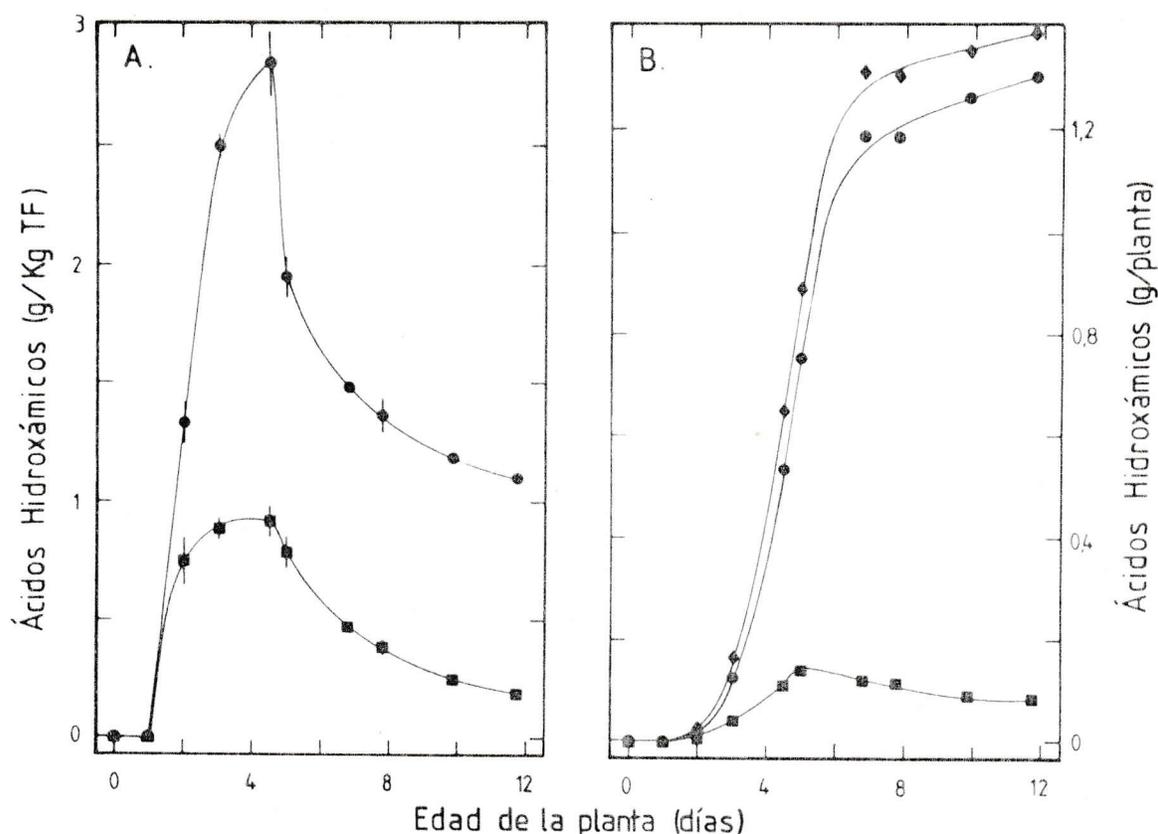


Figura 16. Cambios en la concentración de Hx en plántulas de maíz de edades diferentes, cultivadas en la oscuridad.

Se sembró maíz desinfectado en bandejas con vermiculita en una estufa termorregulada a $28 \pm 1^\circ$, en oscuridad. Se regaba diariamente con agua destilada. A. En los tiempos señalados, se cosechaban plántulas suficientes, se separaban las raíces (■) y la parte aérea (●) y se cuantificaba la concentración de Hx mediante el procedimiento del FeCl_3 (pág. 114). Para el día 1 se usaron los embriones sin dividirlos y para el día cero se utilizaron embriones completos de frutos sin cultivar. Cada punto corresponde al promedio de 3 repeticiones \pm 1 error estándar. B. Los puntos de estas gráficas se calcularon usando tanto el peso fresco promedio de cada uno de los individuos (no mostrado) como sus concentraciones de Hx (ver parte A.). (■): raíces; (●): parte aérea; (◆): total.

dicando que tampoco existirían los glucósidos de Hx. Analizando la parte aérea, se ve que ya al 2º día de cultivo existe una alta concentración de Hx, la cual sigue incrementándose hasta un máximo alrededor del 4º día, para luego ir disminuyendo gradualmente hasta un límite de aproximadamente 1/3 de la mayor concentración. Mirando la gráfica correspondiente a la parte subterránea (raíces primaria y secundarias), se aprecia un comportamiento similar, pero las concentraciones no alcanzan a la tercera parte de las encontradas en la porción aérea (excepto en los 2 primeros días). Cabe notar que en la parte epígea hay una mayor diversidad de órganos considerados que en la porción radical. Además, al cuantificar la presencia de Hx en los escutelos, también se observó un patrón parecido (no mostrado), con concentraciones inferiores a las halladas en las raíces.

Por otro lado, se vio que las plántulas crecen exponencialmente en sus primeras semanas (no mostrado), de modo que la cantidad total de Hx en cada plántula no sigue necesariamente el mismo patrón que el de las concentraciones. Esto se verifica en la Fig. 16.B, donde se aprecia que el contenido total de Hx en la plántula sigue una curva sigmoidea, cuya meseta se alcanza prácticamente a los 7 días de edad, para después continuar subiendo lentamente, al menos hasta los 12 días. También se observa que al

4º día de edad (máxima concentración) sólo hay un tercio de la cantidad de Hx encontrada a los 7 días. Además, en la ilustración 16.B se ve que una gran proporción del contenido de Hx se va acumulando en la parte aérea, encontrándose un 94 % del total a los 12 días. En la misma figura se ve que en la parte hipógea el contenido de Hx alcanza un máximo a los 5 días de edad, y luego va decayendo levemente. Esto sugiere una degradación neta de los hidroxamatos en las raíces y/o transporte hacia la parte epígea. Algo similar se podría inferir con respecto a los escutelos, aunque debido a su baja concentración en Hx y a su poco peso individual, la cantidad de Hx existente en cada uno de estos órganos es tan pequeña que no se consideró al confeccionar la Fig. 16.B.

Con cultivos efectuados a la luz (pág.103) se obtuvieron resultados similares. En la Fig. 17.A aparece la variación que experimenta la concentración de Hx si las plántulas son cultivadas en presencia de luz. Se aprecia un patrón parecido al mostrado en la Fig. 16.A (correspondiente a plántulas etioladas), excepto que: i) el máximo se alcanzó a los 3 días de edad, y ii) las concentraciones son mayores en ambas porciones del vegetal (aérea y radical). Examinando la Fig. 17.B, se observa que el contenido de Hx llega a un máximo alrededor de los 8-9 días, aun cuando las concentraciones a esta edad no son las mayores. En este caso, no sólo en las raíces disminuyó la

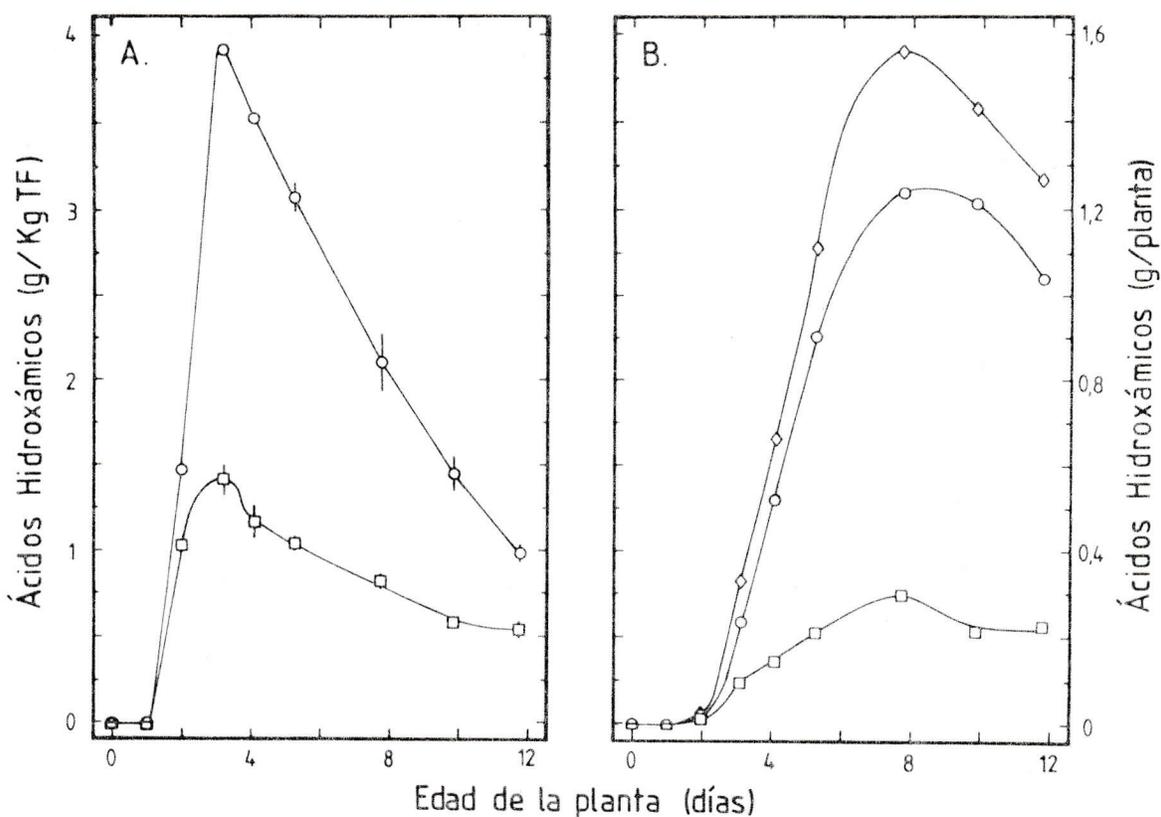


Figura 17. Variaciones en la concentración de Hx en plántulas de maíz de edades diferentes, cultivadas a la luz.

Se procedió del modo descrito en la leyenda de la Fig. 16, excepto que las bandejas se colocaron en un invernadero termorregulado a $28 \pm 2^\circ$ con luz continua provista por 3 ampolletas incandescentes (450 W) y 12 tubos fluorescentes (480 W), ubicados a 80 cm de la superficie de cultivo. A. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones ± 1 error estándar. (□): raíces; (○): parte aérea. B. Los puntos de estas gráficas se calcularon usando tanto el peso fresco promedio de cada uno de los individuos (no mostrado) como sus concentraciones de Hx (ver parte A.). (□): raíces; (○): parte aérea; (◇): total.

cantidad de Hx, sino también en la parte epígea decayó , dando cuenta de la declinación del contenido total en el vegetal. Además, la acumulación de Hx ocurrió en mucho mayor proporción en la porción aérea, llegando a ser casi un 80 % del total.

2. Cuantificación en distintos órganos del vegetal. Efecto de la edad y la luminosidad

Se cultivó maíz como se describió (pág. 102). A los 5 y a los 8 días de edad se cosecharon por triplicado diversas porciones de las plántulas (tallos, raíces, nomófilos y coleoptilos) y se analizaron en cuanto a su concentra - ción de Hx por el método del FeCl_3 (pág. 114).

En la Tabla VI.A se puede apreciar que diversos órganos de plántulas etioladas difieren en cuanto a las concen - traciones de ácidos hidroxámicos, siendo mayores en las porciones aéreas, especialmente en las hojas, en ambas e - dades analizadas. También se observa que, aun cuando las concentraciones disminuyeron, el contenido total de Hx aumentó, debido al incremento en el peso individual propor - cionalmente mayor. También se ve que el contenido de Hx en los nomófilos aumentó a más del doble, a la vez que por - centualmente el incremento fue del 35 al 70 % del total; esta alza explica el aumento de la cantidad de Hx en la plántula, a pesar que éstos disminuyeron en todos los de - más órganos.

Tabla VI. Contenido de Hx en diversas porciones de las plántulas de maíz LH Rinconada.

A. CULTIVOS EN OSCURIDAD

Edad (días)	Organos	μg de TF órg. de 1 pl.	Ac. Hidrox. (mg/Kg TF)	μg de Hx órg. de 1 pl.	mg Hx/Kg TF (ponderado)
5	N	75	5636 \pm 88	423	1905
	C	127	1441 \pm 27	183	
	T	321	1217 \pm 14	391	
	R	182	856 \pm 19	156	856
	Total	732		1153	
8	N	399	2404 \pm 123	959	1578
	C	154	758 \pm 20	117	
	T	235	714 \pm 12	168	
	R	300	399 \pm 10	120	399
	Total	1088		1364	

B. CULTIVOS A LA LUZ

5	N	125	5589 \pm 106	699	3425
	C	68	1503 \pm 69	102	
	T	65	1276 \pm 36	83	
	R	187	1108 \pm 27	207	1108
	Total	445		1091	
8	N	434	2498 \pm 140	1084	2120
	C	29	763 \pm 19	22	
	T	88	702 \pm 25	62	
	R	368	740 \pm 55	272	740
	Total	919		1440	

Maíz desinfectado se dispuso en bandejas con vermiculita ya sea en una estufa termorregulada a $28 \pm 1^\circ$, en oscuridad (A.), o bien, en un invernadero a $28 \pm 2^\circ$, con luz continua (930 W) a 80 cm de la superficie de cultivo (B.). Diariamente se regó con agua destilada. En los tiempos señalados se cosecharon plántulas suficientes, se separaron en nomófilos (N), coleoptilo (C), tallo (T) y raíz

Tabla VI. Continuación.

ces (R) y se les cuantificó la concentración de Hx mediante el procedimiento del FeCl_3 (pág. 114). pl.: plántula; órg.: órgano; los valores de concentración de Hx en el TF corresponden al promedio de 3 réplicas \pm 1 error estándar.

Por otra parte, en la misma tabla se puede ver que en los tallos disminuyó su masa (se encontraron colapsados), lo cual indica una absorción de material desde éstos y transporte hacia otros órganos. Cabe recordar que, en este caso, el agua no es un factor limitante y que la plántula, en la oscuridad, depende exclusivamente del material seco almacenado en el fruto. En los demás órganos aumentó su peso y los nomófilos pasaron a ser los órganos preponderantes a los 8 días de edad.

Tales antecedentes sugieren que: i) los Hx podrían ser trasladados hasta los nomófilos desde las demás partes (dada su pérdida de masa), y/o ii) habría una degradación neta de esos compuestos en los tejidos más viejos, existiendo síntesis sólo en los tejidos nuevos, en alguna etapa de su desarrollo, siguiendo después solamente degradación en esos mismos tejidos. Esto último también es sustentado tanto por el hecho que el mayor crecimiento del vegetal ocurre en los nomófilos como por los resultados de Argandoña et al. (1981), de Corcuera et al. (1982) y de Virtanen et al. (1957), quienes hallaron más altos niveles de Hx en hojas más nuevas.

También otros autores han encontrado diferentes concentraciones de Hx en los distintos órganos de una planta. A partir de sus datos (poco precisos; pág. 14), BeMiller y Pappelis (1965a) sugieren que todas las células vivas del maíz contienen casi la misma cantidad de fracción glucosí

Con respecto al factor luz, se encontró que, en cete-
no, la concentración de BOA determinada en plántulas ver-
des fue 4 veces la obtenida en plántulas crecidas en la os-
curidad (Virtanen et al., 1957). De acuerdo con Brandes y
Heitefuss (1971), las plantas cultivadas con diferente can-
tidad de luz (6 y 16 h de fotoperíodo) parecen no diferir
en los contenidos de DIMBOA-Glc y de aglucona medidos por
absorción en el UV, aunque sus resultados son poco preci-
sos (pág. 15). En la presente tesis se encontró que la con-
centración de Hx es mayor cuando el maíz se cultiva a la
luz que cuando se hace en oscuridad, tanto en la planta
completa como en órganos particulares (comparar la parte
A con la B de la Tabla VI, y la Fig. 16.A con la 17.A).
Sin embargo, el contenido total de Hx en cada plántula su-
fre variaciones diferentes (Tabla VI y Figs. 16.B y 17.B).
La disparidad entre los tratamientos se explicaría porque
las plántulas cultivadas a la luz presentan nomófilos más
desarrollados (mayor masa), y estos órganos tienen una
concentración de Hx muy superior al resto, en tanto que
los individuos cultivados en la oscuridad poseen más desa-
rrollado el tallo. Además, se observó que el contenido to-
tal de Hx es parecido en plántulas que se cultivaron a la
luz y en oscuridad. Entonces, la mayor concentración de Hx
en las primeras se explica porque su masa es proporcional-
mente menor, ya que, como se sabe, a edades tempranas las
plántulas crecen (se elongan) más rápido en la oscuridad
que a la luz.

Por otro lado, en la Tabla VI se ve que, en las plántulas sometidas a ambos tratamientos, la cantidad total de Hx sólo aumentó en los nomófilos, decreciendo en los demás órganos (exceptuándose que en los cultivos hechos a la luz el contenido de Hx también aumentó en la porción radical). Sin embargo, en ejemplares que crecen con luz tiende a disminuir la cantidad absoluta de Hx luego del máximo que se alcanza a los 8-9 días (Fig. 17.B), no ocurriendo lo mismo en el tratamiento con oscuridad (Fig. 16.B). Esta disimilitud puede deberse a un suceso temporal de su ontogenia, quizá propio de la variedad estudiada (LH Rinconada). Klun y Robinson (1969) mostraron que, aun cuando determinaban cada vez menores concentraciones de BOA y de MBOA a medida que las plantas se desarrollaban, el contenido total seguía incrementándose hasta el estado de madurez. También mostraron que en algunas variedades volvía a aumentar la concentración de Hx en etapas posteriores de la ontogenia. En el presente caso se ve que incluso la concentración tiende a ser inferior en las plantas crecidas a la luz respecto de las cultivadas en oscuridad, a los 12 días de edad (Figs. 16.A y 17.A). La mayor baja en las primeras referente a la caída de las segundas puede ser causada por las diferentes vías metabólicas en funcionamiento preponderante, dada la formación de estructuras fotosintéticamente activas en los individuos que se desarrollan a la luz.

3. Efecto de la temperatura sobre el contenido de Hx

Se cultivó maíz como se describió (pág. 102), colocándose, en oscuridad, una bandeja a 24 °, otra a 28 ° y otra a 32 °, en estufas separadas. A los 5 y a los 8 días de edad se cosecharon las partes aéreas de las plántulas y se cuantificó la existencia de Hx de acuerdo al método ya informado (pág. 114).

Según se observa en la Tabla VII, en general la concentración de Hx disminuyó a medida que se aumentó la temperatura de cultivo. En cambio, ocurrió lo inverso con el contenido total de Hx, excepto que, en ambas edades, hay iguales cantidades en plantas cultivadas a 28 y a 32 °.

También se observó que las plántulas crecen más (en lo que a altura y masa se refiere) a mayor temperatura, en el rango estudiado, al realizar los análisis de varianza respectivos.

Thompson et al. (1970) hallaron que, en maíz (DeKalb XL 335), la concentración de glucósidos de benzoxazinas es menor que la mitad en raíces coronarias de plantas crecidas entre 10 y 15 ° que de aquéllas cultivadas entre 25 y 30 °. Incluso parece cambiar la distribución de especies de benzoxazinonas, puesto que si la temperatura de cultivo oscila entre 10 y 15 °, la concentración de DIBOA es menor que la de DIMBOA, en tanto que entre 25 y 30 ° ocurre lo inverso. Los resultados de esta tesis no se contraponen con

Tabla VII. Contenido de Hx en plántulas cultivadas en oscuridad a distintas temperaturas.

Edad (días)	Temperatura (°C)	Altura de pl. (mm)	mg TF pl.	Ac. Hidrox. (mg / Kg TF)	μg de Hx plántula
5	24	53	317	2.083 \pm 4	661
	28	128	488	2.009 \pm 191	980
	32	162	578	1.651 \pm 66	954
8	24	128	558	1.744	973
	28	210	758	1.556	1.179
	32	240	810	1.454	1.178

Maíz desinfectado se dispuso en bandejas con vermiculita, colocando una a 24°, otra a 28° y otra a 32°, en estufas separadas y en oscuridad. Diariamente se regó con agua destilada. A los 5 y a los 8 días se cosechó la parte aérea de las plántulas y se cuantificaron los Hx por el método del FeCl_3 (pág. 114). pl.: plántula; los valores de concentración de Hx en el TF corresponden al promedio de 3 réplicas \pm 1 error estándar, en el caso de los 5 días de edad; para los 8 días no se hizo repeticiones.

los de Thompson, puesto que él comparó otros intervalos de temperaturas (10 - 15 y 25 - 30 °).

4. Efecto de la disponibilidad hídrica sobre el contenido de Hx

En 3 bandejas se cultivó maíz en oscuridad según lo indicado (pág. 102), excepto que el sustrato se regó como para tenerlo con $\frac{1}{2}$, 1 o $1\frac{1}{2}$ veces su capacidad de campo, respectivamente. A los 5 y a los 8 días se cosecharon las partes aéreas y se determinó la cantidad de Hx que poseían, según el método usual (pág. 114). En la Tabla VIII se muestra que, para ambas edades, la concentración de Hx disminuye a medida que aumenta la disponibilidad de agua. En cambio, el contenido total es mayor cuando la humedad es suficiente o más; los valores del tratamiento con exceso de agua no alcanzan a ser significativamente menores (nivel de 5 %) que los del tratamiento con humedad intermedia.

Además, se ve que el crecimiento de las plántulas es mayor cuando hay más agua disponible. De acuerdo a los análisis de varianza efectuados, los tratamientos dan resultados disímiles tanto en altura como en masa de los ejemplares.

Así, tanto el contenido total como la concentración de Hx en las plántulas depende de la cantidad de agua que éstas puedan absorber.

Tabla VIII. Concentraciones de Hx en plántulas cultivadas en oscuridad bajo diferentes condiciones hídricas.

Edad (días)	Capacidad de campo ⁺	Altura de pl. (mm)	mg TF pl.	Ac. Hidrox. (mg / Kg TF)	µg de Hx plántula
5	0,5	83	259	2.896 ± 3	749
	1,0	151	492	1.775 ± 1	873
	1,5	160	598	1.428 ± 19	854
8	0,5	110	289	2.513 ± 174	726
	1,0	209	630	1.434 ± 138	903
	1,5	282	931	895 ± 51	833

Maíz desinfectado se dispuso en bandejas con vermiculita, las que se colocaron en una estufa termorregulada a $28 \pm 1^\circ$, en oscuridad. ⁺ Diariamente se regaba con agua destilada suficiente como para tener el sustrato con $\frac{1}{2}$, 1 o $1\frac{1}{2}$ veces su capacidad de campo. A los 5 y a los 8 días se cosecharon las partes aéreas y se determinó la concentración de Hx según el procedimiento del FeCl_3 (pág. 114). pl.: plántula; los valores de concentración de Hx en el tejido fresco (TF) corresponden al promedio de 3 réplicas \pm 1 error estándar.

B. EFECTOS DE Hx Y DERIVADOS SOBRE LA ETAPA LUMINOSA DE LA FOTOSINTESIS

Hasta el momento se ha mostrado que, en plantas intactas de maíz LH Rinconada existe el DIMBOA-Glc en elevadas concentraciones (> 5 mM), compuesto que se hidroliza rápidamente a azúcar + DIMBOA. También se ha expuesto que esta aglucona inhibe hongos, bacterias e insectos y causa fitotoxicidad, no conociéndose su modo de acción molecular. En adelante se mostrará esencialmente el efecto negativo de la DIMBOA sobre reacciones de transducción de energía, que corresponden a sistemas metabólicos presentes en todo ser vivo.

1. Fotofosforilaciones

Tanto la PPO cíclica (catalizada por metosulfato de ferrozina) como la PPO no cíclica (acoplada al transporte de electrones desde el agua hasta el metilviológeno) resultaron inhibidas en la misma extensión por la DIMBOA ($I_{50} = 1$ mM; Fig. 18). El DIMBOA-Glc y las benzoxazolinonas BOA y MBOA también disminuyeron la velocidad de ambos procesos, pero sus I_{50} (concentración de inhibidor necesaria para producir 50 % de inhibición) fueron mayores que la de la aglucona (4, 3 y 1,6 veces, respectivamente; Fig. 18).

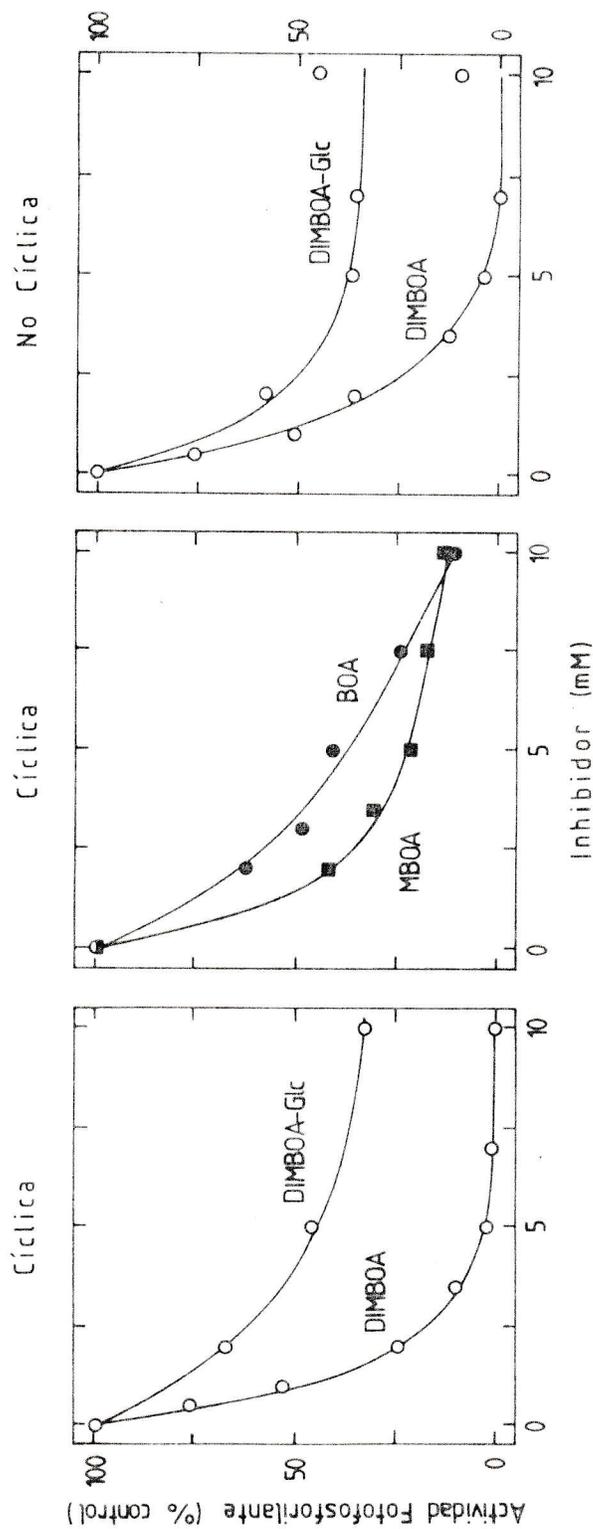


Figura 18. Inhibición de las fotofosforilaciones cíclica y no cíclica.

Se usaron cloroplastos clase II de espinaca (10 μ g de clorofila) suspendidos en un MR (1 ml) con sacarosa 250 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,8), $MgCl_2$ 5 mM, ADP 2 mM, P_i 3 mM con 10^6 cpm de ^{32}P , las concentraciones señaladas de DIMBOA-Glc, DIMBOA, MBOA o BOA, y ya sea m-sulfato de fenazina 50 μ M (PPO cíclica), o bien, metilviológeno 100 μ M y azida de sodio 500 μ M (PPO no cíclica). La síntesis de ATP se efectuó a 25 °, en oscuridad o con luz saturante de halógeno (500 W), por 2 min, al cabo de los cuales se precipitó el P_i , se centrifugó y al líquido sobrenadante se le determinó las cpm en un contador de centelleo líquido Beckman LS-233. Las velocidades controles para las PPO cíclica y no cíclica, fueron 230 y 40 μ moles ATP/mg clorofila/h, respectivamente.

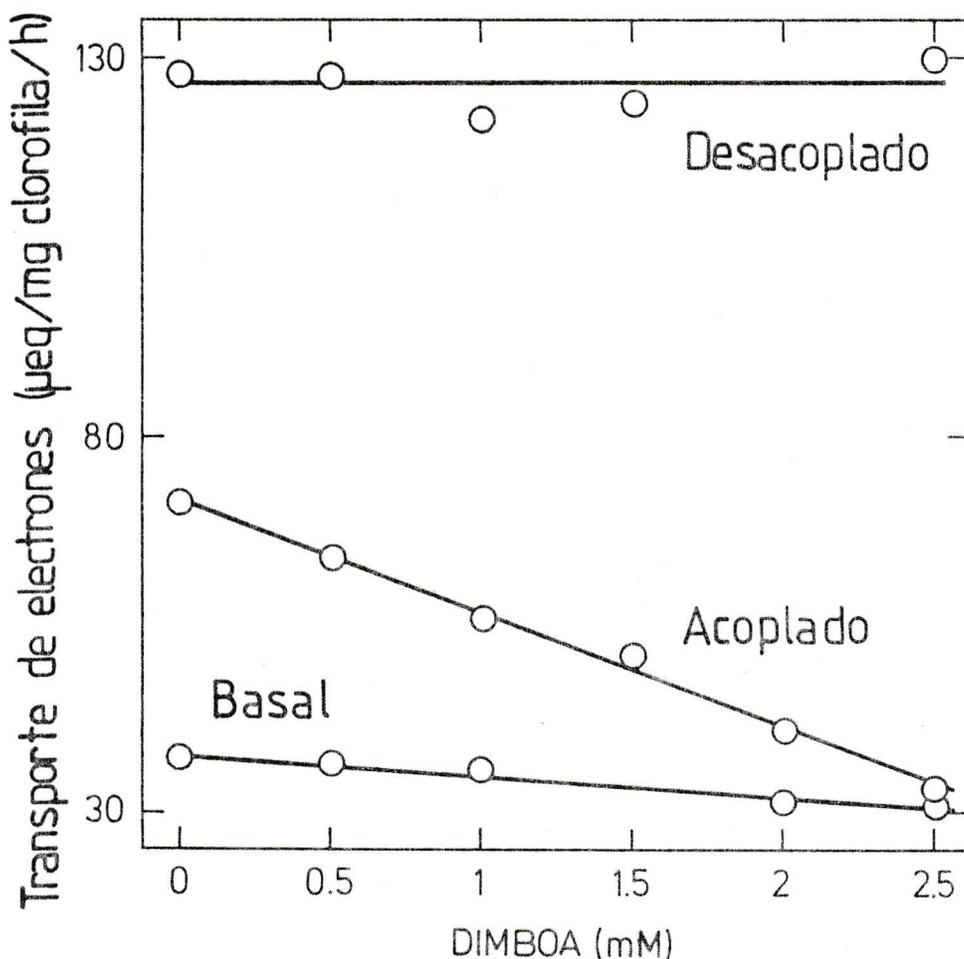


Figura 19. Efectos de la DIMBOA sobre el transporte fotosintético de electrones.

Se utilizaron cloroplastos clase II de espinaca (60 μg de clorofila) suspendidos en 1,5 ml de un MR con sacarosa 100 mM, Tricine-NaOH 25 mM (pH 8,0), NaCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, NaN_3 1 mM, metilviológeno 100 μM y DIMBOA en las concentraciones indicadas. Además, al MR se le agregó ATP 150 μM (transporte de electrones basal), o bien, ADP 2 mM y P_i 2 mM (transporte acoplado a la síntesis de ATP), o bien, ATP 150 μM y metilamina 10 mM (transporte desacoplado de la síntesis de ATP). La reacción se inició con luz saturante (350 W) y se detuvo con oscuridad.

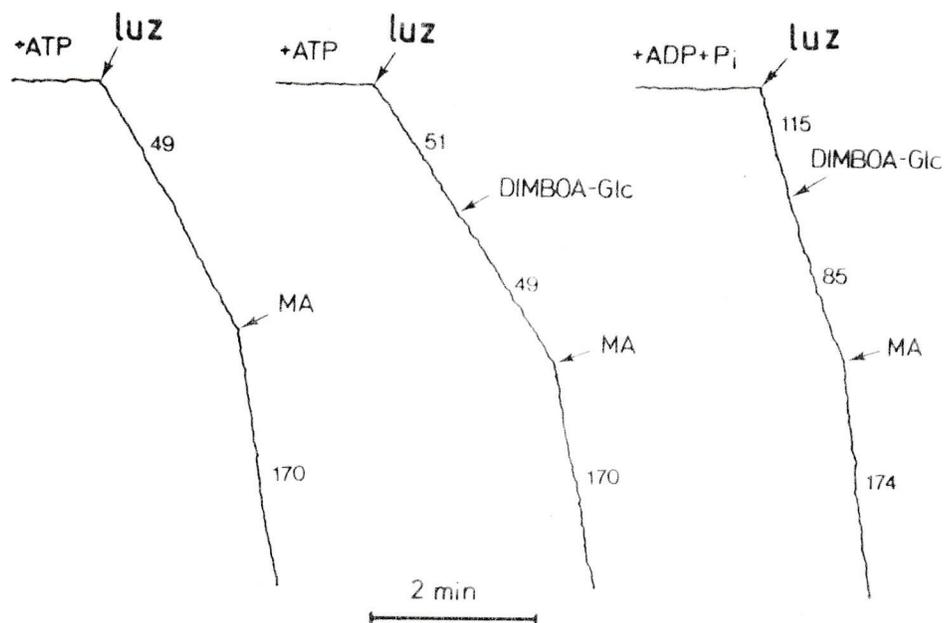


Figura 20. Efecto del DIMBOA-Glc sobre el transporte de electrones en cloroplastos.

El procedimiento seguido y las concentraciones usadas están señalados en la leyenda de la Fig. 19, excepto que el inhibidor aquí utilizado (DIMBOA-Glc) fue 10 mM. Los números sobre las pendientes expresan la velocidad del transporte de electrones en $\mu\text{equivalentes de O}_2/\text{mg de clorofila/h}$.

3. Actividad ATPásica en cloroplastos clase II

El CF_1 unido a la membrana tilacoide tiene una actividad ATPásica latente que puede ser desenmascarada ya sea mediante iluminación en presencia de tioles reactivos, o bien, por tratamiento con tripsina (McCarty y Racker, 1968). En la Fig. 21 se aprecia la inhibición causada por la DIMBOA y el DIMBOA-Glc sobre la actividad ATPásica de cloroplastos clase II activados por tripsina. Se ve que ambos compuestos impiden la catálisis efectuada por la Ca^{++} -ATPasa en la misma extensión en que inhiben las PPO y el transporte acoplado de electrones; las I_{50} de ambos compuestos son 1,7 y 6 mM, respectivamente.

4. Actividad ATPásica en CF_1 soluble

4.1. ATPasa activada por tripsina o por calor

Cuando el CF_1 es liberado desde las membranas tilacoides, su actividad ATPásica puede ser gatillada tanto por calentamiento como por tratamiento con tripsina (Vambutas y Racker, 1965). En la Tabla IX se ve el efecto que la DIMBOA y su glucósido ejercen sobre la actividad ATPásica, tanto del CF_1 purificado y activado por digestión enzimática o por calor, como de cloroplastos clase II. Se observa que la inhibición es mayor en el último caso, sugiriendo que la enzima tiene otros sitios sensibles, a la DIMBOA al menos, cuando está unida a la membrana (o se activó estándolo).

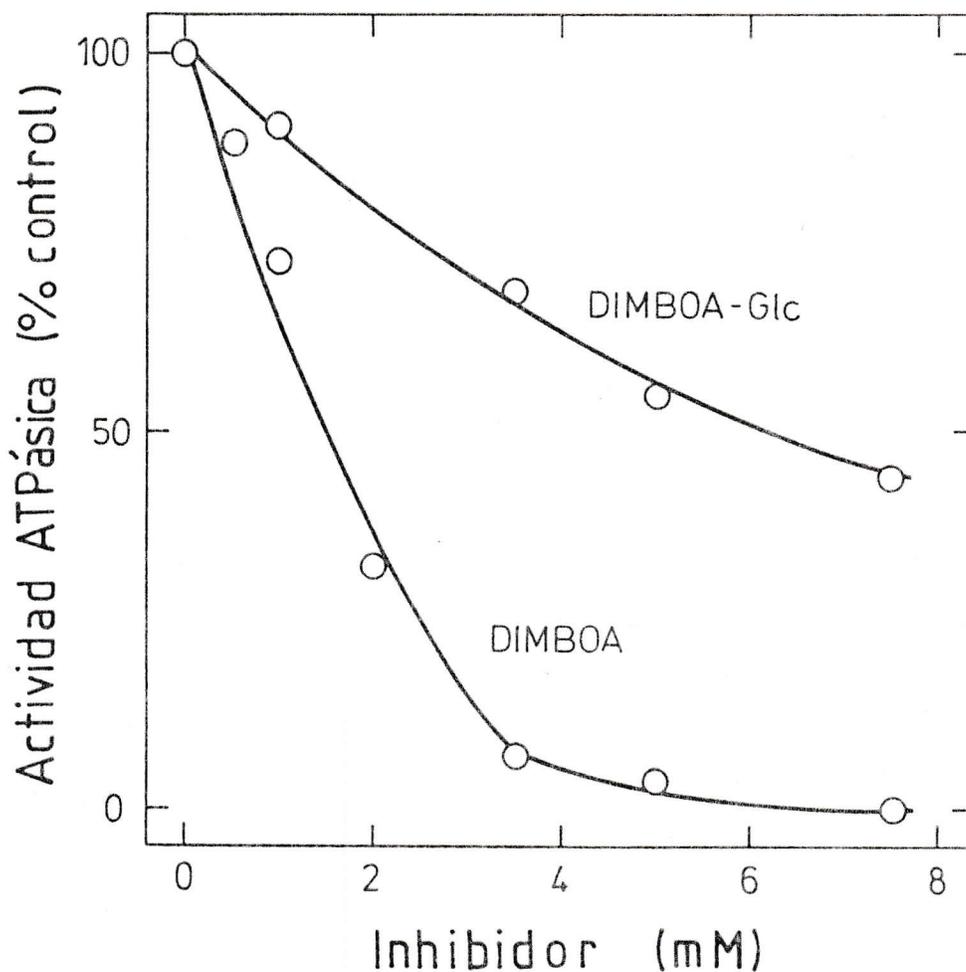


Figura 21. Efecto de la DIMBOA y de su glucósido sobre la hidrólisis de ATP catalizada por el CF_1 activado por tripsina en las membranas tilacoides de espinaca.

La reacción se realizó (10 min, 37°) en un MR (1 ml) con Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), $CaCl_2$ 5 mM, ATP 5 mM, ATPasa activada (pág. 121) equivalente a 20 μ g de clorofila y las concentraciones mostradas de DIMBOA o de DIMBOA-Glc. La actividad control fue de 78 μ moles de P_i /mg de clorofila/h.

Tabla IX. Efecto de la DIMBOA y de su glucósido sobre las actividades ATPásicas del CF_1 purificado y en cloroplastos clase II de espinaca.

Preparación	Inhibidor	Concentración (mM)	Actividad ATPásica ⁺	% del control
CF_1 activado por tripsina	Control	0	12,5	100
	DIMBOA	2	7,7	62
	DIMBOA	5	5,5	44
	DIMBOA-Glc	5	9,8	79
CF_1 activado por calor	Control	0	13,7	100
	DIMBOA	2	8,5	62
	DIMBOA	5	4,8	35
	DIMBOA-Glc	5	11,5	84
Cloroplastos activados por tripsina	Control	0	78,0	100
	DIMBOA	2	17,2	22
	DIMBOA	5	6,2	8
	DIMBOA-Glc	5	46,8	60

⁺ Las actividades están expresadas en μ moles de P_i /mg de clorofila/h (en cloroplastos) y en μ moles P_i /mg de proteína/min (en el CF_1 purificado). La hidrólisis de ATP se determinó en un MR (1 ml) con $CaCl_2$ 5 mM, ATP 5 mM, 5 μ g de CF_1 (pág. 124) y ya sea Tris-HCl 50 mM (pH 8,6) para el CF_1 activado por tripsina, o bien, amortiguador Tris-HCl 40 mM (pH 8,0) en el caso del CF_1 activado por calor. Los valores para los cloroplastos activados por tripsina se extrajeron desde la Fig. 21.

5. Actividad ATPásica desenmascarada por reactivos de Cleland

Si el CF_1 se libera desde las membranas tilacoides, su actividad ATPásica latente puede ser también desenmascarada por incubación prolongada con tioles (Farron y Racker, 1970; McCarty y Racker, 1968). Concomitante con la activación aparecen 2 grupos sulfhidrilo accesibles en la subunidad γ , como resultado de la reducción de un puente disulfuro. A continuación se presentan los resultados de experimentos efectuados con CF_1 purificado y luego activado con DTE o DTT (CF_1^+).

5.1. Efecto de la concentración de BOA, MBOA, DIMBOA y DIMBOA-Glc

En tubos con 1 ml de medio de reacción (MR) y mantenidos en hielo, se colocaron distintas alícuotas de los inhibidores disueltos e inmediatamente se inició la reacción ATPásica con la adición de 3 μ g de CF_1^+ (pág. 124) a los tubos preincubados por 20 seg a 37 °. La reacción transcurrió durante 7 min.

En la Fig. 22 se muestra que la actividad ATPásica del CF_1^+ es inhibida por todos los compuestos ensayados. Las benzoxazolinonas y el glucósido tienen un efecto parecido entre sí y poco notable (con 10 mM inhiben menos

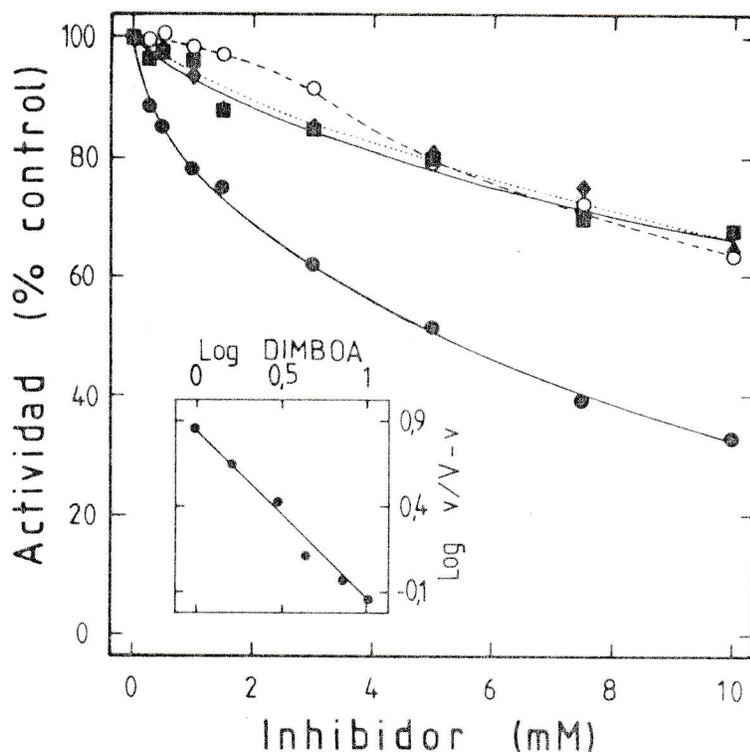


Figura 22. Inhibición por DIMBOA, MBOA, BOA y DIMBOA-Glc de la actividad ATPásica del CF_1^+ .

La reacción se efectuó (7 min, 37°) en un MR (1 ml) con Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), ATP 5 mM, $CaCl_2$ 5 mM e inhibidor según se muestra, iniciándose la catálisis al agregar 3 μ g de CF_1^+ (pág. 124) a las muestras preincubadas por 20 seg a 37° y deteniéndose al adicionar 1 ml de TCA 0,5 N. El P_i liberado se determinó colorimétricamente (pág. 121). Las actividades control fueron 13,8, 13,7, 12,6 y 11,7 μ moles P_i /mg proteína/min para los casos de DIMBOA (●), MBOA (■), BOA (○) y DIMBOA-Glc (◆), respectivamente. En el inserto no se muestran los puntos pertinentes a las dos más bajas concentraciones de DIMBOA.

del 40 %). La aglucona hidroxámica provoca un efecto más intenso (la actividad disminuye un 50 % con DIMBOA 5 mM). Esta inhibición es similar a la encontrada en los casos de CF_1 activado por calor o por tripsina (Tabla IX). Inserto en la ilustración se muestra un gráfico de Hill de los datos obtenidos con DIMBOA; la pendiente de la recta es $n = 1,03$, lo cual sugiere una carencia de efectos cooperativos en la inhibición y que la enzima aparentemente uniría 1 mol de Hx por mol de sitio activo.

5.2. Dependencia del tiempo de preincubación del CF_1^+ con la DIMBOA

Se mantuvo incubando CF_1^+ (1,30 mg/ml de la solución amortiguadora Tricine-NaOH 40 mM + EDTA 2 mM) a 25° en 2 tubos, a uno de los cuales se agregó DIMBOA como para tener 5 mM y, al otro, solvente solo para diluir de igual manera. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de eluido que contenían 4,56 µg de proteína, la que se adicionó a tubos con 1 ml de MR, midiéndoseles entonces la actividad ATPásica. Los tiempos cero se hicieron sin inhibidor y con DIMBOA 17,5 µM. Se controló la inhibición con DIMBOA 5 mM en el MR.

De modo que, al preincubar CF_1^+ (1 mg/ml) con DIMBOA (5 mM) en un medio sin Ca^{++} -ATP, y luego ir transfiriendo alícuotas a un MR con sustrato, se observó que la actividad ATPásica va disminuyendo a medida que transcurre

el tiempo de preincubación (Fig. 23). Esta desactivación aparente de la enzima sería irreversible, ya que, a pesar de la dilución del Hx (o lo que queda de él) al transferir las alícuotas, se observó cada vez menor actividad de la enzima preincubada con el inhibidor que de la ATPasa sin él (Fig. 23). A tiempo cero, la enzima es muy poco afectada en su actividad (tiene un 98,3 % de la del control), debido a que la DIMBOA se diluye más de 200 veces al colocar las alícuotas en el MR. En cambio, si se transfieren alícuotas similares a un MR con DIMBOA 5 mM, se aprecia una inhibición de un 50 % (Fig. 23). Esto indica que hay un efecto rápido (se aprecia en cuanto quedan en contacto el CF_1^+ y el Hx) que es reversible.

5.3. Reversibilidad de la inhibición por DIMBOA

En cada uno de 2 tubos se colocaron 100 μ l de amortiguador estándar con 89 μ g de CF_1^+ . Se preincubaron a 25 ° y sucesivamente se les agregó $CaCl_2$ hasta 7 mM y ATP como para tener 5 mM; además, a uno de ellos se le adicionó DIMBOA hasta 5 mM simultáneamente con el ATP. Se incubaron a dicha temperatura por 5 min y se filtraron rápidamente por centrifugación, como se describió (pág. 125). Antes y después se determinó la cantidad de proteínas así como la actividad ATPásica transfiriendo alícuotas (4,5 μ l) a 1 ml de MR e incubando por 8 min. Además, antes de

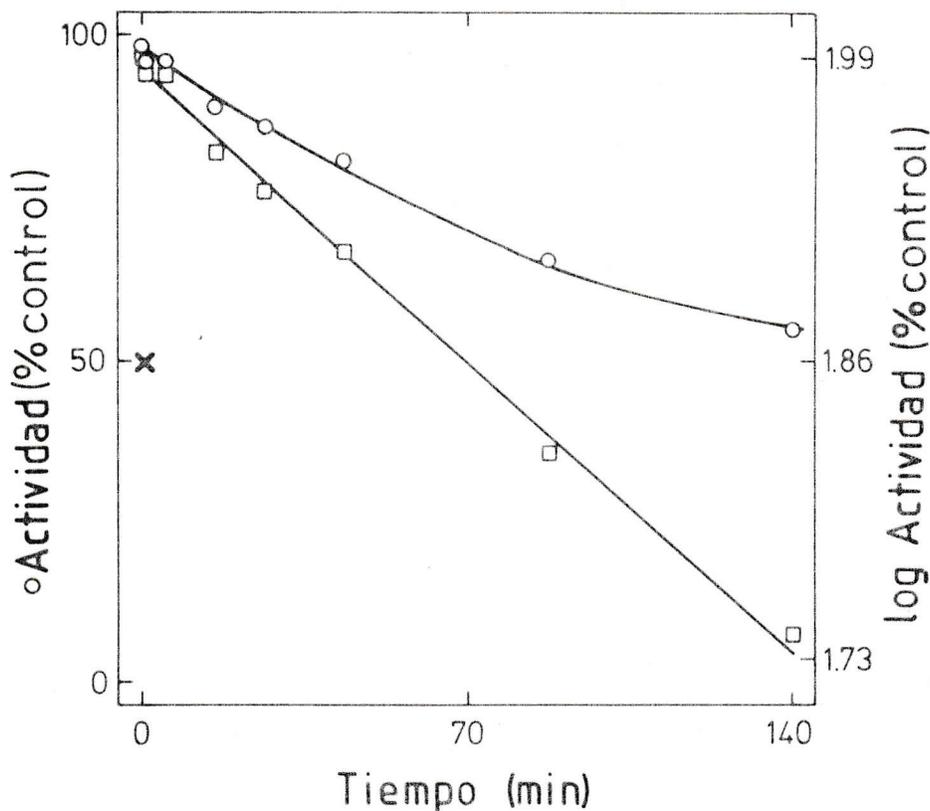


Figura 23. Dependencia del tiempo de preincubación del CF_1^+ con la DIMBOA.

Se preincubó CF_1^+ (pág. 124; 1,30 mg/ml) en Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, sin o con DIMBOA 5 mM. A los tiempos señalados se determinó la actividad ATPásica del factor acoplante, para lo cual se adicionaron alícuotas con 4,56 μ g de proteína a tubos con 1 ml de un MR conformado por Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), ATP 5 mM y $CaCl_2$ 5 mM, efectuándose la reacción por 5 min a 37° y deteniéndose con 1 ml de TCA 0,5 N. El P_i liberado se cuantificó por colorimetría (pág. 121). Se hicieron tiempos cero sin inhibidor y con DIMBOA 5 mM, siendo la actividad menor en un 1,7 % en este último caso. El punto indicado con **x** corresponde a la inhibición control con DIMBOA 5 mM en el MR. La actividad control fue de 7,79 μ moles de P_i /mg de proteína/min.

filtrar, del tubo con inhibidor se midió la actividad ATPásica en MR con DIMBOA 5 mM y, del tubo sin inhibidor, se determinó la actividad ATPásica en MR con DIMBOA 22,5 μ M.

Luego, al mezclar CF_1^+ (1 mg/ml) con DIMBOA (5 mM) en un MR (que tiene Ca^{++} -ATP) y, antes de 5 min de incubación, transferir una alícuota a un MR sin el Hx para medir la actividad ATPásica, se detectó que ésta es muy poco inferior a la observada con CF_1^+ no mezclado con la DIMBOA (Tabla X). En el primer caso, el Hx quedó diluido hasta 22,5 μ M. La actividad ATPásica medida con esta concentración de inhibidor resultó similar (Tabla X). En cambio, si se transfiere una alícuota de CF_1^+ , incubado con DIMBOA 5 mM, a un MR con la misma concentración del inhibidor, se observó una disminución de la actividad, con respecto al control, de un 50 % (Tabla X), que es igual a la observada anteriormente (Figs. 22 y 23).

Además, en la Tabla X se observa que la inhibición rápida es realmente reversible, ya que al separar la DIMBOA desde el CF_1^+ (por filtración en gel), se obtiene la misma actividad ATPásica del control.

5.4. Influencia de la concentración del sustrato sobre la inhibición por DIMBOA

En tubos dispuestos en hielo con 1 ml de Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), se colocaron distintas concentraciones de $CaCl_2$ y de ATP (en proporción 1 : 1); se preincu-

Tabla X. Reversibilidad de la inhibición por DIMBOA sobre la actividad del CF_1^+ , con períodos cortos de preincubación.

Tratamiento de las muestras	Concentración de DIMBOA (mM)		Actividad $\frac{\mu\text{moles Pi}}{\text{mg proteína} \cdot \text{min}}$
	Inicial ^a	Final ^b	
Sin filtrar	0	0	9,6
Sin filtrar	0	0,02	9,4
Sin filtrar	5	5	4,8
Filtración	0	0	9,6
Filtración	5	0	9,6
Dilución del inhibidor	5	0,02	9,3

Las concentraciones de DIMBOA se midieron durante: ^ala incubación inicial de 5 min; ^bla segunda incubación, en la cual se midió la actividad.

En cada uno de 2 tubos con 100 μl de Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0) y EDTA 2 mM se colocó CF_1^+ (89 μg) y se preincubaron a 25° por 20 seg, adicionando entonces $CaCl_2$ hasta 7 mM y ATP hasta 5 mM; a uno de los tubos se agregó DIMBOA hasta 5 mM simultáneamente con el nucleótido. Se incubaron por 5 min a 25° y se filtró la solución mediante centrifugación (pág. 125). Antes y después de filtrar se determinó la cantidad de proteínas (pág. 124) y la actividad ATPásica (pág. 124). Además, antes de filtrar, del tubo con inhibidor se midió la actividad ATPásica en MR con DIMBOA 5 mM y, del tubo sin inhibidor, se determinó la actividad hidrolítica en MR con DIMBOA 22,5 μM .

baron a 37° por 20 seg y a cada uno se le agregó $3,9 \mu\text{g}$ de CF_1^+ , efectuándose la reacción durante 8 min. Se hicieron blancos con distintas concentraciones de Ca^{++} -ATP. Lo mismo se repitió con DIMBOA 2 y 5 mM en el MR.

En la Fig. 24 se observa que la función de saturación del CF_1^+ por ATP corresponde a la cinética hiperbólica característica de la ATPasa de cloroplastos. En la misma ilustración se ve que la DIMBOA (2 y 5 mM) prácticamente no afecta ese patrón de dependencia, pero los parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ y K_m aparecen disminuidos. Esto último se confirma con la Fig. 25, donde se muestra la representación de Lineweaver-Burk. Ahí se aprecia que las rectas obtenidas se interceptan en la ordenada en un valor mayor a medida que aumenta la concentración del inhibidor; esto implica que la $V_{\text{máx}}$ es menor. También se observa que los interceptos en la abscisa aumentan en magnitud al incrementar la concentración del Hx; esto indica que la K_m adquiere valores inferiores. Los resultados de los análisis de regresión lineal aparecen en la Tabla XI, en donde se puede apreciar que tanto la K_m como la $V_{\text{máx}}$ son notoriamente menores a más altas concentraciones de la DIMBOA. Además, las rectas obtenidas poseen buenos coeficientes de correlación (r). Por otro lado, en la Fig. 25 se ve que las rectas logradas tienen pendientes ($K_m/V_{\text{máx}}$) muy similares, aunque tienden a juntarse en un punto del

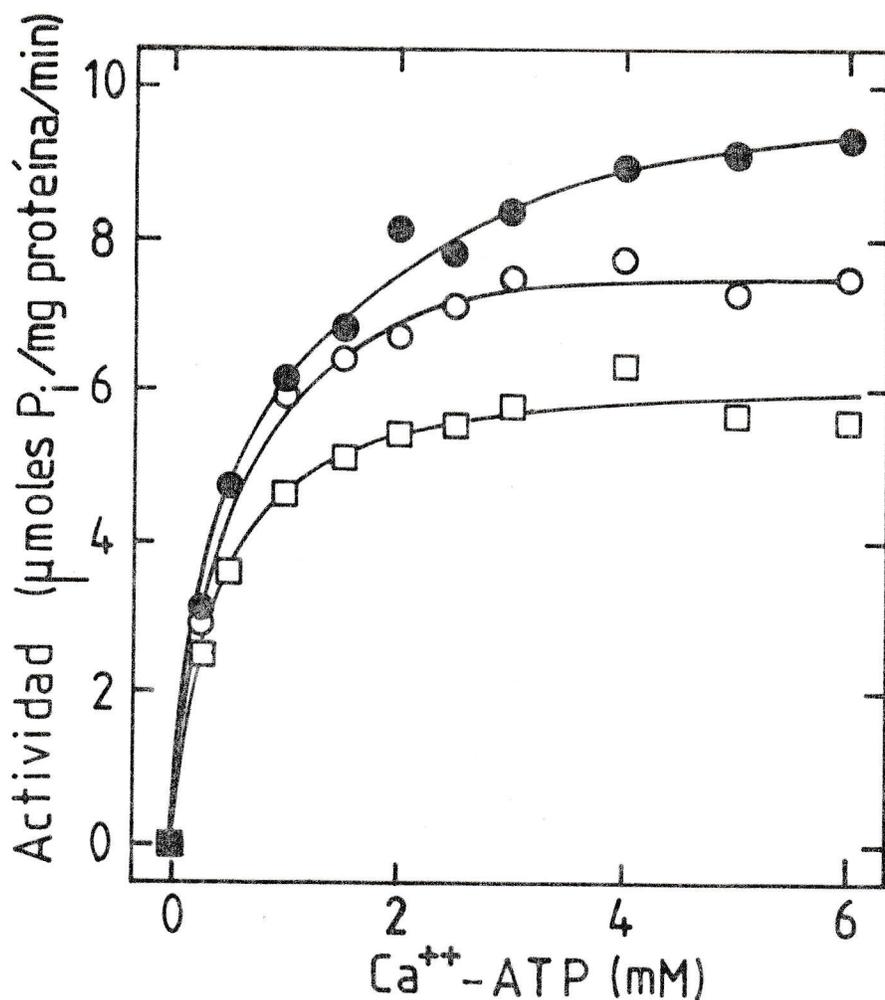


Figura 24. Efecto de la DIMBOA sobre la función de saturación del CF_1^+ .

En tubos (sobre hielo) con 1 ml de Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), se colocaron las concentraciones indicadas de $CaCl_2$ y de ATP (1:1); luego de preincubar (20 seg, 37°) se dio comienzo a la reacción control (●) agregando 3,9 μg de CF_1^+ (pág. 124); a los 8 min (37°) se detuvo con 1 ml de TCA 0,5 N y se midió el P_i liberado mediante colorimetría (pág. 121). Lo mismo se repitió con DIMBOA 2 mM (○) y 5 mM (□) en el MR. Se montaron blancos con diferentes concentraciones de Ca^{++} -ATP, con DIMBOA 0, 2 y 5 mM en el MR.

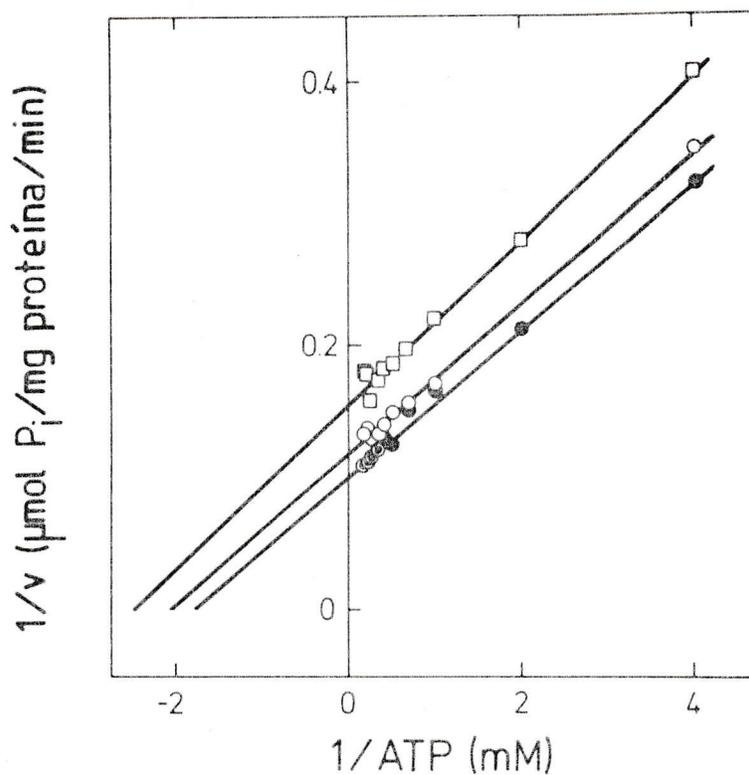


Figura 25. Gráficas de Lineweaver-Burk para la inhibición por DIMBOA de la actividad ATPásica del CF_1^+ .

Los puntos aquí mostrados fueron calculados a partir de los que aparecen en la ilustración 24. Las concentraciones usadas de DIMBOA fueron 0 (●), 2 (○) y 5 (□) mM en el MR.

Tabla XI. Parámetros de regresión lineal de las gráficas de Lineweaver-Burk de la Fig. 34.

Parámetro	D I M B O A (m M)		
	0	2	5
Intercepto (eje \bar{y})	0,1014	0,1183	0,1563
Pendiente	0,05538	0,05731	0,06187
K_m	0,546	0,484	0,396 (27,5 %)
$V_{m\acute{a}x}$	9,86	8,453	6,40 (35,1 %)
I	0,998	0,998	0,995

Los porcentajes entre paréntesis corresponden a la disminución de los parámetros pertinentes con respecto al control.

cuadrante inferior izquierdo de las coordenadas. Esta leve convergencia indica que la inhibición sería del tipo mixto, es decir, el ligando se uniría tanto a la enzima libre como a la enzima enlazada al sustrato, o sea, la DIMBOA interactúa con la ATPasa al menos en un lugar diferente del sitio de unión del sustrato. Sin embargo, dado el cuasiparalelismo de las rectas, es factible inferir que la inhibición podría ser no competitiva en gran medida, es decir, la DIMBOA se uniría a la enzima en un sitio distinto del catalítico.

5.5. Efecto de la DIMBOA sobre la inhibición alostérica por ADP

Se midió la actividad ATPásica con distintas concentraciones de Ca^{++} -ATP en un medio de reacción (1 ml) que contenía ya sea: Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), o este amortiguador más Ca^{++} -ADP 1 mM, o el tampón y DIMBOA 5 mM, o el amortiguador más Ca^{++} -ADP 1 mM y DIMBOA 5 mM. La reacción se realizó durante 5 min, iniciándose con la adición de 1,513 μg de CF_1^+ a los tubos preincubados por 20 seg.

En la Fig. 26 se muestran algunas curvas de saturación por sustrato del CF_1^+ . Se ve que al determinar la actividad ATPásica en presencia de ADP 1 mM, aparece una cinética sigmoide (Nelson et al., 1972) cuyo patrón prácticamente no se modifica al agregar, además del nucleótido inhibidor, DIMBOA 5 mM al MR, aunque en este caso se obtienen valores inferiores de actividad.

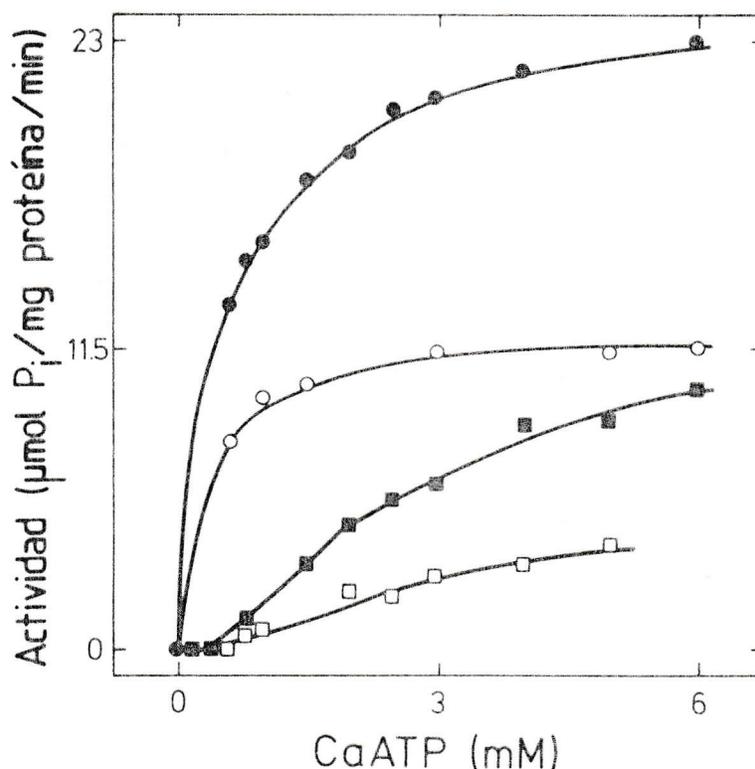


Figura 26. Efecto de la DIMBOA sobre la función de saturación del CF_1^+ en ausencia y en presencia de ADP.

Las actividades ATPásicas (5 min, 37°) se determinaron en un MR (1 ml que contenía Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), las concentraciones mostradas de $CaCl_2$ y de ATP, CF_1^+ (1,513 µg) y ya sea: DIMBOA 5 mM (○), o Ca^{++} -ADP 1 mM (■), o bien, Ca^{++} -ADP 1 mM y DIMBOA 5 mM (□), o nada (control, ●). La reacción se iniciaba agregando el CF_1^+ a los tubos preincubados (20 seg, 37°) y se detenía con 1 ml de TCA 0,5 N, midiéndose luego el P_i liberado colorimétricamente (pág. 121). Para cada curva se hicieron blancos idóneos con varias concentraciones de Ca^{++} -ATP.

En la misma ilustración están dibujadas las curvas controles sin ADP; se ve que ambas gráficas son hiperbólicas, en tanto que la actividad enzimática es menor con DIMBOA 5 mM, tal como se había encontrado previamente (Fig. 24). Al efectuar la representación de Hill, se obtuvieron rectas cuyas pendientes (correspondientes al coeficiente de Hill: n), obtenidas mediante regresión lineal, fueron 1,099 , 0,894 , 1,842 y 1,566 para las actividades determinadas en MR solo, con DIMBOA 5 mM, con ADP 1 mM, o bien, con DIMBOA 5 mM más ADP 1 mM, respectivamente. Se puede apreciar que el Hx afecta muy poco los n , disminuyendo este índice en la misma proporción en presencia y en ausencia de ADP. Esto sugiere que la interacción entre la aglucona y la enzima ocurriría en un lugar distinto del sitio alostérico, en el cual se une el ADP.

Además de los experimentos cuyos resultados ya se han señalado, se realizaron otros con la variante que en el MR se colocaba un exceso de CaCl_2 o de MgCl_2 equimolar con la concentración de DIMBOA, encontrándose que no había diferencias significativas con los experimentos ya descritos. Esta similitud en los resultados indica que la DIMBOA no inhibe la actividad ATPásica por quelación de los cationes.

6. Efecto del DTE sobre la actividad inhibitoria de la DIMBOA

6.1. Cloroplastos clase II activados por tripsina

Se activó la Ca^{++} -ATPasa en cloroplastos clase II del modo como se indica la pág. 120. La reacción de hidrólisis del ATP se realizó durante 10 min a 37° con luz ambiente, transfiriendo alícuotas con cantidades variables de DTE y fracciones de 0,1 ml del medio con la enzima activada, a 0,9 ml de un MR [Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), CaCl_2 5 mM, ATP 5 mM y DIMBOA 2 mM]. El P_i liberado se midió como se describe (pág.121).

La Fig. 27.A muestra que la inhibición rápida causada por la DIMBOA sobre la actividad de la Ca^{++} -ATPasa es revertida parcialmente por el DTE, sugiriendo que el Hx interactuaría, al menos en parte, con los grupos sulfhidrilo accesibles de la enzima activada.

Por otra parte, se ve que ya a concentraciones de 0,5 mM del reductor se tiene el máximo de desinhibición. En este caso, la prevención (20 % de la actividad con trol) por el reductor alcanza entre un 27 % (con DTE 1 mM) y un 32 % (con DTE 20 mM) de la inhibición total producida por el Hx.

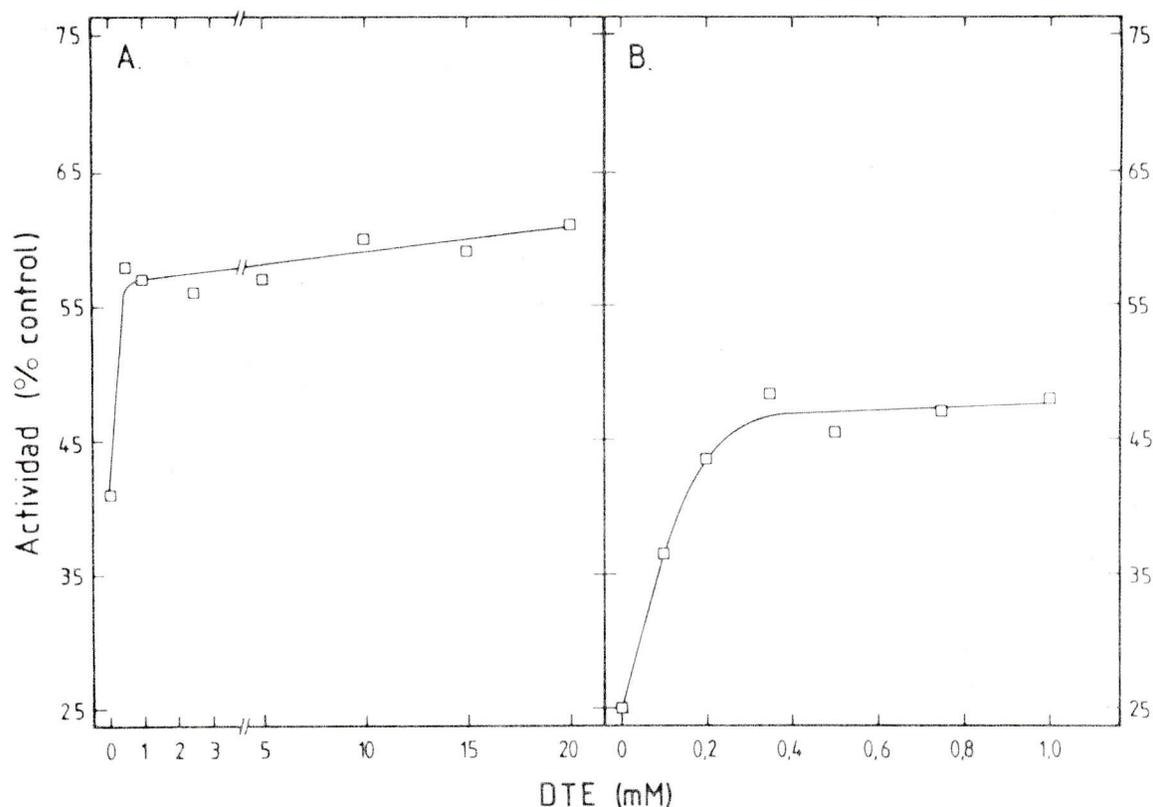


Figura 27. Prevención por DTE de la inhibición causada por la DIMBOA en CF_1 .

A. CF_1 ligado a tilacoides y activado mediante digestión por tripsina. Se usó el mismo sistema que se describe en la leyenda de la Fig. 21, excepto que el MR contuvo DIMBOA 2 mM y las concentraciones aquí mostradas de DTE. La actividad del control fue 137 μ moles de P_i /mg de clorofila/h. B. PPO cíclica. Se utilizó el sistema indicado en la leyenda de la ilustración 18, excepto que en el MR hubo DIMBOA 2,5 mM y las concentraciones aquí señaladas de DTE. La actividad del control fue 3637 ± 72 μ moles de ATP/mg de clorofila/h. Tanto el inhibidor como el reductor se agregaron simultánea e inmediatamente antes de adicionar la suspensión de cloroplastos para iniciar la catálisis.

6.2. Fotofosforilación cíclica

Se procedió del modo ya descrito (pág. 118), salvo que en el MR se incluyó DIMBOA 2,5 mM y concentraciones variables de DTE.

En la Fig. 27.B se aprecia una reversión parcial por DTE de la inhibición rápida por DIMBOA sobre la PPO cíclica, con un patrón similar al del caso precedente (pág. anterior), sugiriendo que parte del efecto inhibitorio de la fotosíntesis se debería a la interacción del Hx con grupos SH de la ATPsintetasa. En este caso, la prevención alcanza al 31 % de la inhibición total que provoca la DIMBOA. Además, al igual que en el caso anterior, con una concentración de DTE 0,5 mM (o menos) ya se tiene prácticamente el máximo de la reversión.

6.3. CF_1^+

En un Erlenmeyer se colocaron 14,5 ml del MR adecuado (pág. 124) y se preincubaron por 2 min a 37 °, iniciando entonces la reacción al adicionar CF_1^+ como para tener 2,4 µg/ml. A distintos tiempos se tomaban alícuotas de 1 ml, las que se transferían a tubos con 1 ml de TCA 0,5 N dispuestos en hielo, midiéndose el P_i liberado del modo ya descrito (pág. 121). Paralelamente se hicieron los blancos respectivos (distintos tiempos de incubación sin CF_1^+ , el cual se agregaba a los 2 ml de MR y TCA mezcla-

dos). Lo mismo se repitió, pero teniendo en el MR ya sea: DIMBOA 5 mM, o DTE 5 mM, o bien, DIMBOA 5 mM más DTE 5 mM que se agregó a los 5 min de incubación.

La Fig. 28 muestra curvas de progreso de la hidrólisis de ATP por el CF_1^+ incubado en diversas condiciones. Se ve que la actividad catalítica casi no es afectada por la presencia de DTE (en los tiempos ensayados), en tanto que la DIMBOA la disminuye prácticamente desde el comienzo mismo de la reacción enzimática. En este último caso, la curva de progreso decae más rápido que en los controles, lo que podría deberse al efecto inhibitorio lento. También se puede apreciar que al agregar el reductor al tubo de CF_1^+ incubado con el inhibidor, la velocidad de reacción aumenta en los minutos siguientes y no decae como en el caso previo en que no se agregó DTE durante el transcurso de la reacción en presencia de DIMBOA. Esto último sugiere que la inhibición lenta sería parcialmente revertida por el DTE. Además, como la pendiente de la gráfica con el Hx más el DTE es menor que la pendiente de las gráficas controles (Fig. 28) entre los mismos valores de A (0,1 a 0,3), se puede decir que la reversión de la inhibición es sólo parcial. Estos resultados y otros precedentes (6.1. y 6.2.) indican que la inhibición por DIMBOA sobre la actividad del complejo CF_1 es debida, al menos en parte, a la interacción del Hx con grupos SH accesibles de la enzima (probablemente los de la subunidad γ).

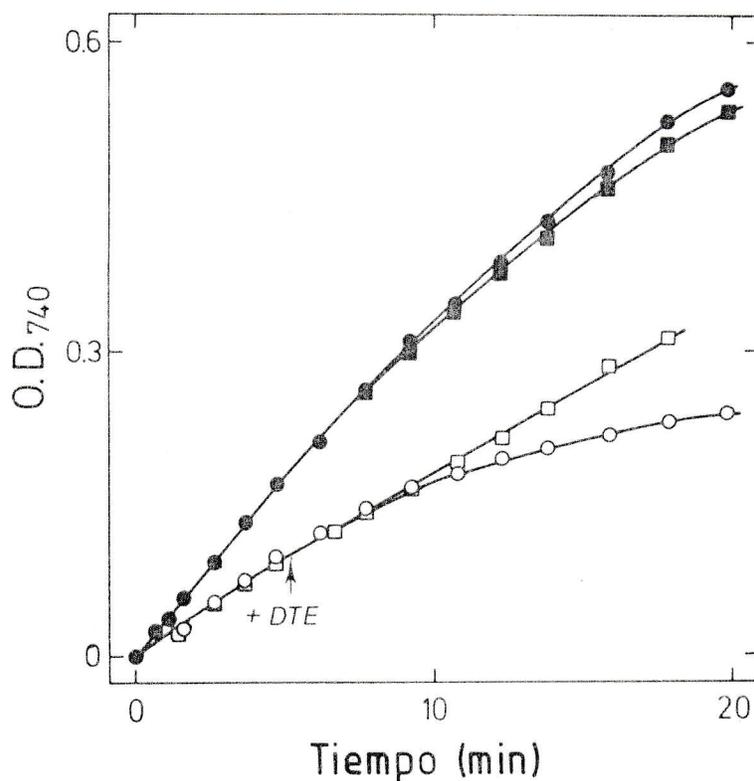


Figura 28. Reversión por DTE de la inhibición provocada por DIMBOA sobre la actividad ATPásica del CF_1^+ .

La hidrólisis del ATP se efectuó a 37° en frascos Erlenmeyer con 14,5 ml de un MR consistente en Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), ATP 5 mM, $CaCl_2$ 5 mM, CF_1^+ (2,4 μ g/ml) y ya sea DTE 5 mM (●), DIMBOA 5 mM (○), DIMBOA 5 mM con DTE 5 mM agregado donde se indica (□), o bien, nada más (control, ■). La reacción comenzaba al adicionar el CF_1^+ ; a diferentes lapsos, se extraían alícuotas (1 ml) que se mezclaban con TCA 0,5 N (1 ml), midiéndose entonces el P_i liberado (pág. 121).

7. Protección del CF_1^+ por yodoacetamida

7.1. Cinética de la protección

En 400 μ l de un medio de incubación [Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM y yodoacetamida (YAA) 10 mM] se colocaron 220 μ g de CF_1^+ y se mantuvo a 25 °. A distintos tiempos se filtraron alícuotas de 60 μ l según la técnica de Penefsky (1977; pág. 125) y a los eluidos se les determinó la actividad ATPásica (pág. 124) en un MR solo o con DIMBOA 5 mM.

Se encontró que la alquilación de los grupos SH de la enzima con YAA previene parcialmente la inhibición por DIMBOA de la actividad ATPásica del CF_1^+ . En la Fig. 29 se muestra el tiempo requerido para la máxima protección otorgada por la YAA contra la inhibición por DIMBOA 5 mM.

7.2. Inhibición por diferentes concentraciones de DIMBOA

Durante 1,35 h a 25 ° se trataron 615 μ g de CF_1^+ en 800 μ l de medio de incubación, finalizándose la modificación por YAA al filtrar por centrifugación. Luego se determinó el contenido de proteínas. Otra porción de CF_1^+ se mantuvo sin tratar con el agente alquilante. La actividad ATPásica se llevó a efecto como se explicó (pág. 124) excepto que el MR contenía, además, concentraciones variables de DIMBOA; por cada tubo se usaron 4,1 μ g de CF_1^+ o

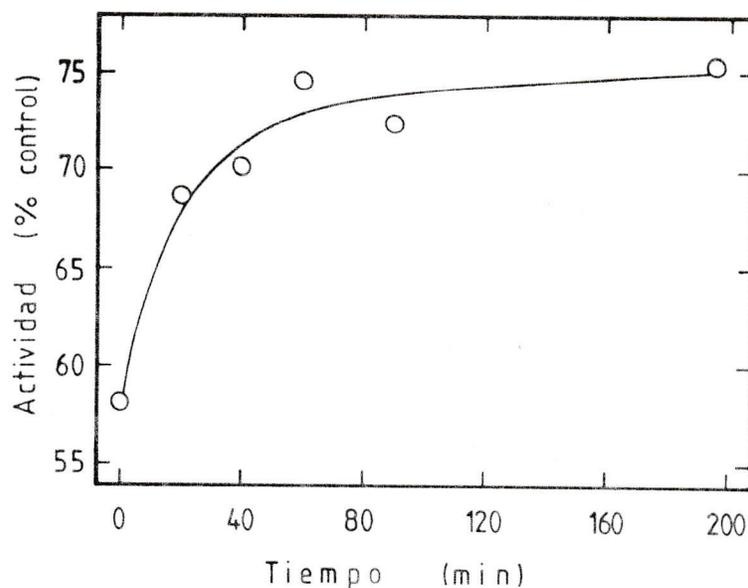


Figura 29. Cinética de la protección otorgada por la yodoacetamida contra la inhibición por DIMBOA 5 mM sobre la actividad ATPásica del CF_1^+ .

Se agregó CF_1^+ (220 μg) a 400 μl de un medio de incubación [Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM y yodoacetamida (YAA) 10 mM] equilibrado a 25°. A diferentes intervalos, se fueron extrayendo alícuotas de 60 μl , las que se filtraron usando la técnica de Penefsky (1977; pág. 125), determinándose la cantidad de proteínas existente en los eluidos (pág. 125). La catálisis enzimática se efectuaba adicionando parte de los filtrados (con 4,2 μg de CF_1^+ -YAA) a 1 ml de un MR con Tricine-NaOH 40 mM (pH 8,0), ATP 5 mM, $CaCl_2$ 5 mM y DIMBOA 5 mM. Luego de 5 min de reacción (37°), ésta se detenía al agregar TCA 0,5 N (1 ml) y el P_i liberado se cuantificaba (pág. 121). La actividad control fue 6,5 $\mu\text{moles } P_i/\text{mg proteína}/\text{min}$.

4,2 μg de CF_1^+ -YAA (CF_1 activado y luego tratado con YAA).

En la Fig. 30 se observa que sólo a concentraciones 1 mM o menos del inhibidor, se tiene protección total contra la acción del Hx. A medida que se aumenta la concentración de la aglucona hidroxámica, se tiene mayor inhibición de la actividad catalítica, existiendo siempre un impedimento parcial. La prevención de la inhibición es cada vez menor relativamente, según se desprende desde la misma ilustración.

Los resultados precedentes sugieren que los residuos de cisteína periféricos no son los únicos grupos que reaccionan con la DIMBOA para causar la inhibición observada, inferencia que es apoyada por los resultados de prevención por DTE (sección 6.).

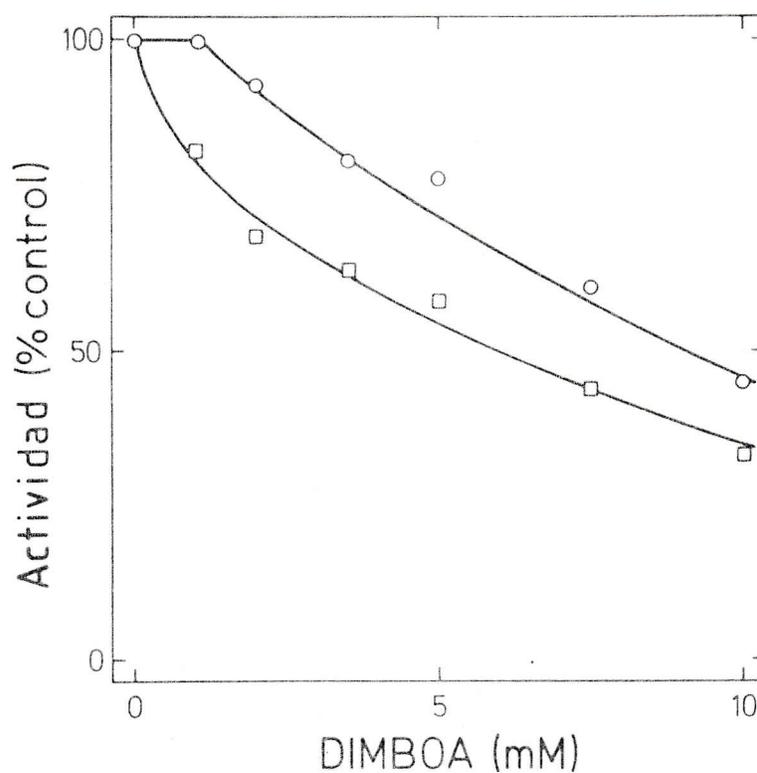


Figura 30. Protección con yodoacetamida contra la inhibición por DIMBOA sobre la actividad ATPásica del CF_1^+ .

Se incubó CF_1^+ (90 min; 615 μ g en 800 μ l de medio de incubación) con yodoacetamida, se filtró y el e-luido se le determinó la cantidad de proteínas y su actividad ATPásica (○), concorde con lo descrito en la leyenda de la ilustración precedente. Otra solución de CF_1^+ se trató igual, salvo que no se incluyó yodoacetamida (□). Las actividades control fueron 7,4 y 8,4 μ moles de P_i /mg de proteína/min, respectivamente.

C. CINÉTICAS DE REACCIÓN DE LA DIMBOA CON AMINOÁCIDOS

Todos los experimentos fueron realizados en un baño oscuro y termorregulado a $31 \pm 0,5^\circ$. Se usaron tubos en los que se colocaron 10 mg de DIMBOA. Las reacciones se iniciaron adicionando 10 ml de amortiguador fosfato 70 mM (solo o con alanina o cisteína) a pH 8,0 y disolviendo la DIMBOA lo más rápidamente posible en un agitador de giro excéntrico (Vórtex). Cada cierto tiempo se tomaban 2 alícuotas de 0,3 ml del medio de reacción, agregándose una de ellas a 2,7 ml del reactivo de FeCl_3 (pág. 68) y la otra a 2,7 ml de una mezcla control (consistente en 2,43 ml de etanol 95 % v/v, 0,24 ml de agua desionizada y 0,03 ml de HCl 37 % p/v, o sea, solvente solo del reactivo de FeCl_3). Luego se midieron las A a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20, utilizándose como blancos 3 ml del reactivo colorante o 3 ml de la mezcla control, respectivamente.

Se estudió la reactividad de DIMBOA con alanina y con cisteína, observando la desaparición de ácidos hidroxámicos (con reactivo de FeCl_3) con respecto al tiempo de reacción. Se usaron algunas condiciones similares a las utilizadas en la determinación de las actividades catalíticas relativas a la fotosíntesis (PPO, transporte de electrones, actividades ATPásicas). En la Fig. 31 se mues

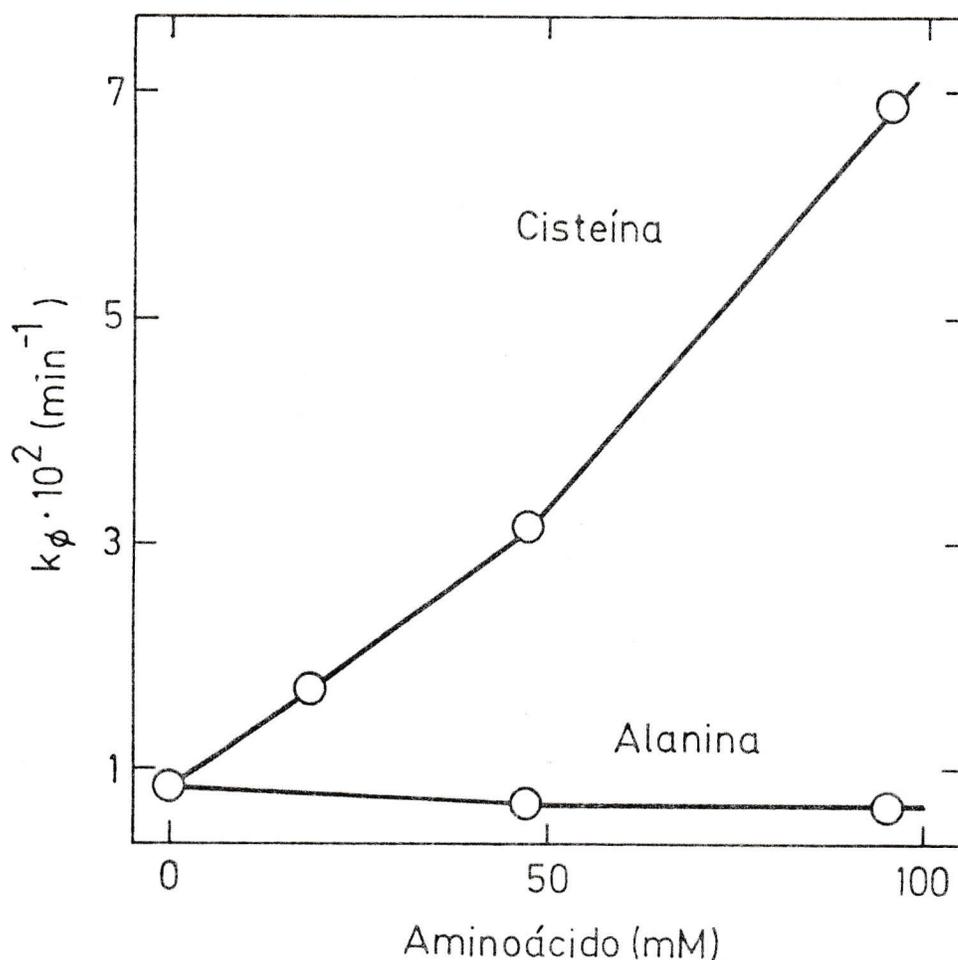


Figura 31. Efectos de aminoácidos sobre la descomposición de DIMBOA.

Se muestran las constantes de velocidad de pseudoprimer orden observadas para la desaparición de ácidos hidroxámicos desde soluciones de DIMBOA (4,74 mM) con aminoácidos. Las reacciones se efectuaron a $31 \pm 0,5^{\circ}$ en oscuridad en un amortiguador fosfato 70 mM (pH 8,0) y se siguieron por al menos 2 vidas medias. El intercepto corresponde a la constante de velocidad para la degradación espontánea de la DIMBOA.

tra la variación de la constante aparente de las reacciones de pseudo primer orden, ante el aumento de la concentración de aminoácidos. Se ve que: i) la DIMBOA se descompone mucho más rápido en presencia de cisteína que en ausencia de ella; ii) en presencia de alanina, la constante observada para la degradación del Hx es muy poco mayor, aunque se observó una reacción clara entre el aminoácido y la aglucona (se coloreaba la solución).

Los resultados encontrados muestran que la DIMBOA interactúa con grupos SH de manera relativamente lenta (del orden de minutos a horas, dependiendo de la concentración de tioles), dando productos en que la función hidroxámica desaparece. Con el procedimiento de medición empleado no se puede determinar reacciones rápidas que no involucren la desaparición de la función hidroxámica, como es el caso de las reacciones de adición de tioles a grupos aldehído, como el que posee la DIMBOA en su estado acíclico (Fig. 33; pág. 182). De manera que el Hx puede estar reaccionando con grupos tiol, amino u otros sin que la función hidroxámica sea destruida, debido a lo cual, con reactivo de FeCl_3 , no se detectaría la desaparición del reaccionante (DIMBOA). Estos resultados fueron confirmados posteriormente, demostrándose que la DIMBOA reacciona con tioles formando productos de adición y/o de reducción (Niemeyer et al., 1982).

D I S C U S I O N

La DIMBOA inhibe el crecimiento poblacional de bacterias, de hongos y de insectos, y provoca efectos tóxicos en plantas (Tabla I), desconociéndose su modo de acción a nivel molecular. Se puede suponer entonces que la DIMBOA afecta uno o varios sistemas metabólicos importantes y generales para los organismos mencionados. En esta tesis se describieron los efectos de la DIMBOA, de su glucósido y de los carbamatos BOA y MBOA sobre reacciones de transducción de energía, así como la influencia de diversas circunstancias sobre la concentración de Hx en el maíz.

A. EFECTOS DE Hx Y BENZOXAZOLINONAS SOBRE LA ETAPA LUMINOSA DE LA FOTOSINTESIS

Se escogió el sistema de la fotofosforilación tanto por su ubicuidad, por su semejanza funcional con otras vías metabólicas de preponderante importancia biológica, como por el grado de conocimiento que se tiene de él y la facilidad con que se lo trabaja.

Se estudió entonces el efecto de los Hx DIMBOA-Glc y DIMBOA y de las benzoxazolinonas BOA y MBOA sobre la fotofosforilación (PPO) y sobre el transporte de electrones en una suspensión de tilacoides de espinaca, encontrándose se que los 4 compuestos inhiben las reacciones de transducción de energía (Izawa y Good, 1972) en ese sistema. En contraste, otros ácidos hidroxámicos bloquean el transporte de electrones en tripanosomas patógenos africanos (Clarkson y Grady, 1982). Estos autores observaron que los ácidos hidroxámicos heterocíclicos y los de cadena lipofílica larga inhiben la glicólisis simulando la ubiquinona, un transportador de electrones intermediario en el sistema glicerofosfato oxidasa de los parásitos.

También se ensayaron los Hx sobre el complejo enzimático ATPasa, tanto en una preparación de tilacoides activados por tripsina como en CF_1 soluble y purificado a homogeneidad activado por tripsina o por calor, viéndose que la aglucona inhibe más que el glucósido en los 3 casos. El efecto de ambos Hx fue mayor en cloroplastos que en el CF_1 aislado, lo cual muestra que en el CF_1 mismo tiene lugar la inhibición, total o parcial; el primer caso es factible, ya que la proteína puede cambiar su conformación al ser liberada, de manera que se hace menos sensible al efecto de la DIMBOA. También es factible que parte de la inhibición en los cloroplastos sea a nivel del F_0 , posibilidad que no fue examinada.

La influencia inhibitoria de la DIMBOA no se debería al secuestro de cationes, a pesar de sus propiedades quelantes, ya que al adicionar exceso de Ca^{++} o de Mg^{++} , no apareció una mayor actividad de los cloroplastos clase II ni de las ATPasas.

Durante la activación del CF_1 por calor (Fig. 32) se aprecia una interconversión de óxido reducción entre un puente disulfuro y dos grupos sulfhidrilo libres (Vallejos et al., 1977; Andreo et al., 1979; Ravizzini et al., 1980). Si la enzima se activa por incubación prolongada con tioles, aparecen 2 nuevos grupos sulfhidrilo accesibles como consecuencia de la reducción de un puente disulfuro en la subunidad γ (Arana y Vallejos, 1982; Vallejos, 1981). Esto, junto a otras evidencias (Andreo, 1976), sugiere que los grupos tiol juegan un rol preponderante en la actividad de la enzima. En un experimento preliminar (no mostrado) se activó la ATPasa ligada a cloroplastos mediante luz y ditioeritritol (DTE), agente que reduce puentes disulfuro, y luego se inhibió tal actividad con DIMBOA; parte de la actividad perdida se recuperó al agregar un exceso de DTE, sugiriendo que los Hx interactuarían con grupos sulfhidrilo de la enzima. Apoyan esta sugerencia los resultados en que la inhibición por la DIMBOA, tanto sobre la PPO cíclica como sobre la Ca^{++} - ATPasa ligada a tilacoides y activada por tripsina, es

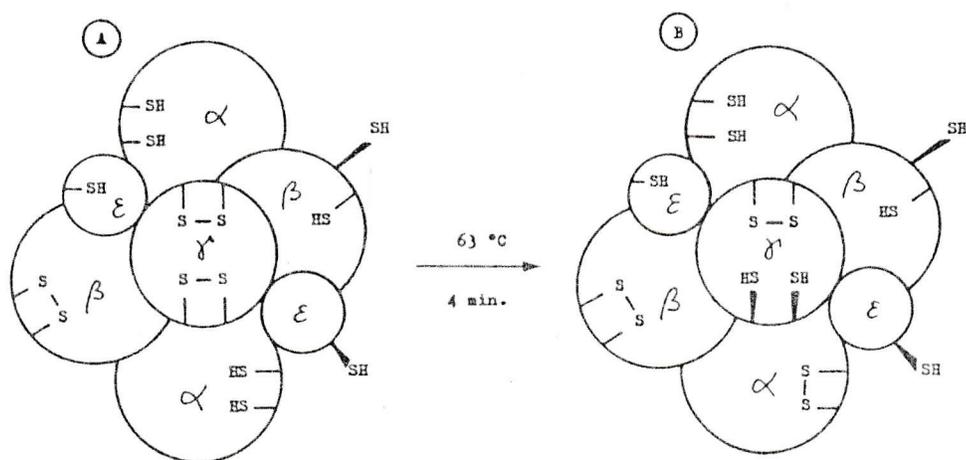


Figura 32. Distribución de grupos sulfhidrilo en CF_1 .

A. CF_1 nativo. B. CF_1 activado térmicamente. Los grupos sulfhidrilo accesibles están representados con trazo grueso. La subunidad δ , que no tiene grupos sulfhidrilo, no se muestra por simplicidad. Durante el proceso de activación, se observa el intercambio de un disulfuro entre la subunidad δ y una α (Vallejos et al., 1977; Andreo et al., 1979; Ravizzini et al., 1980).

revertida parcialmente por la adición de DTE. Además, el CF_1 purificado y activado por incubación prolongada con tioles (CF_1^+), que posee 4 grupos sulfhidrilo periféricos (Arana y Vallejos, 1982; Vallejos, 1981), también resulta inhibido en su actividad ATPásica por los 4 compuestos estudiados, siendo la DIMBOA el más activo.

Por otra parte, la DIMBOA se equilibra rápidamente en soluciones acuosas con el compuesto de cadena abierta 2 (Fig. 33). La función aldehído de esta especie es un electrófilo altamente reactivo ya que tiene un grupo carbonilo adyacente que le drena la densidad electrónica. Además, el átomo de nitrógeno en 2 tiende a ser atacado por agentes reductores debido a la atracción de electrones desde los grupos carbonilo adyacentes. Más aún, los grupos funcionales 2-OH y 7-metoxi aumentan la reactividad del enlace N-O (Hashimoto et al., 1979). Así, en la presencia de nucleófilos, la DIMBOA debería dar lugar, reversible y rápidamente, a productos de adición. En la presencia de agentes reductores, el átomo de nitrógeno hidroxámico puede ser lentamente reducido a un nitrógeno amídico. Los tioles son tanto buenos nucleófilos como buenos agentes reductores y las reacciones descritas precedentemente ocurren entre DIMBOA y tioles en soluciones acuosas (Fig. 31; Niemeyer et al., 1982; Argandoña et al., 1982). Es concebible entonces que la inhibición de la en

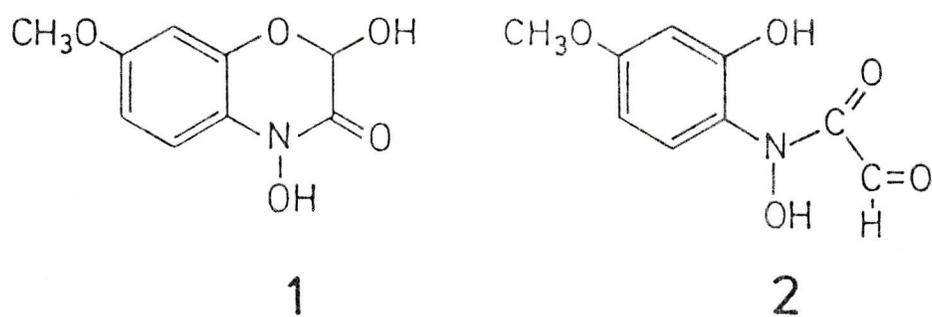


Figura 33. Isómeros de la DIMBOA posibles de hallar en soluciones acuosas.

zima causada por la DIMBOA sea parcialmente debida a su reacci3n con grupos sulfhidrilo de la prote3na. Aunque los grupos sulfhidrilo son normalmente m3s nucleof3licos que los grupos amino o hidroxilo (Friedman, 1973), que normalmente est3n presentes en las enzimas, estos 3ltimos tambi3n podr3an reaccionar con el Hx.

Los experimentos realizados en la presente tesis muestran que la DIMBOA caus3 una inhibici3n r3pida y reversible de la enzima. Este efecto se revirti3 parcialmente ante la adici3n de un tiol y se previno en parte mediante la alquilaci3n con yodoacetamida de los grupos sulfhidrilo de la enzima. Adem3s, la inhibici3n por DIMBOA fue pr3cticamente incompetitiva, consistente con la ausencia de residuos de ciste3na en el sitio de uni3n del sustrato; a la vez, no afect3 mayormente la sigmoidicidad de la funci3n de saturaci3n de la ATPasa en presencia de ADP, indicando que el Hx no se une en el lugar en que lo hace este nucle3tido. Luego, es probable que la reacci3n de la DIMBOA con grupos sulfhidrilo de la prote3na induzca un cambio conformacional en la enzima por el cual 3sta pierde su actividad normal. Con tiempos m3s largos de reacci3n entre la DIMBOA y la enzima, aparece un proceso de inhibici3n irreversible, consistente con una probable 3xido-reducci3n entre grupos SH de la prote3na y el Hx, aunque la naturaleza de esta reacci3n no ha sido clarificada.

Así, siendo la ATPsintetasa una enzima ubicua entre los seres vivos y siendo la DIMBOA deletérea para un variado rango de organismos, su actividad como un inhibidor de la transducción de energía puede dar cuenta de su amplia toxicidad. De hecho, experimentos preliminares con preparaciones mitocondriales de corazón de bovino (no mostrado), indican que esos organelos son alrededor de la mitad de sensibles frente a DIMBOA con respecto a los cloroplastos de espinaca. Los complejos ATPasas que catalizan la síntesis de ATP en mitocondrias y cloroplastos difieren tanto inmunológicamente como en sensibilidad hacia otros inhibidores. Por ejemplo, los dos bien conocidos inhibidores de la fosforilación oxidativa, oligomicina y aurovertina, no afectan la fotofosforilación (Ravizzini et al., 1975), aun cuando la aurovertina inhibe la ATPasa soluble (Lardy et al., 1964). Sin embargo, ellos son similares con referencia a peso molecular, composición de subunidades y actividad acoplante (Nelson, 1976; Penefsky, 1974).

Más aún, se ha mostrado que la DIMBOA inhibe la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa de riñón (Villarreal et al., 1982). En experimentos preliminares (no mostrado) se vio que el potencial de acción de nervios ciáticos de rana (Calyptocephallella caudiverbera) era eliminado irreversible y completamente luego de varias horas de exposición a DIMBOA 5 mM.

Luego, es probable que la DIMBOA ejerza un efecto tóxico por un mecanismo de acción generalizada, como es la síntesis de ATP. Así, a la luz de los resultados expuestos, sería deseable estudiar el efecto de los Hx sobre otras ATP sintetetasas, especialmente sobre aquéllas de organismos que son afectados por estos compuestos.

Por otra parte, ya que la DIMBOA reacciona con tioles, es posible esperar que otras enzimas sean también inhibidas por este compuesto. De hecho, se ha mostrado que otros ácidos hidroxámicos inhiben ciertas enzimas. Griffith y Musher (1973) piensan que los hidroxamatos son inhibidores efectivos y específicos de la ureasa bacteriana. Ellos habían comprobado que el ácido acetohidroxámico era levemente bacteriostático contra Proteus. Blakeley et al. (1969) habían estudiado la ureasa (hexámero de ~ 480.000 daltones), que tiene 4 u 8 grupos SH poco reactivos y esenciales para su actividad y ~ 47 grupos sulfhidrilo totales; encontraron que la ureasa es inhibida por los ácidos aceto- y cloroaceto-hidroxámico de manera reversible y pareciera que (formalmente) competitiva. Fishbein (1982) mostró que los ácidos formo-, aceto-, propio- e iso-hidroxámico inhiben la ureasa bacteriana en ratones. Gale y Atkins (1969) ensayaron alrededor de 60 ácidos hidroxámicos con la ureasa, viendo que sólo 5 no la inhibían; casi todos los que la afectaban, lo hacían también dentro de

células intactas, atravesando la pared y la membrana celulares; encontraron que los hidroxamatos alifáticos inhibían de manera no competitiva y los aromáticos de modo mixto (la DIMBOA presenta un patrón más bien no competitivo); observaron que el tratamiento del complejo E-I (enzima-ácido hidroxámico) con tioglicolato a pH 8, en que se reduce el hidroxamato a la amida correspondiente, restauraba la actividad enzimática. Algunos ácidos hidroxámicos se parecen estructuralmente a la DIMBOA, de modo que es probable que al menos algunos de esos compuestos estén inhibiendo la ureasa por reacciones con los grupos SH accesibles que ésta tiene.

Por lo anterior, resultaría interesante ensayar los Hx cíclicos con otras enzimas que posean grupos SH accesibles. Sin embargo, se debe hacer notar que la DIMBOA aparentemente reacciona con otros residuos aminoacídicos (pág. 176; Pérez, F. J., com. pers.). Además, algunos ácidos hidroxámicos reaccionan con grupos del sitio activo de enzimas: la hidroxiiurea y la dihidroxiiurea inhiben la ureasa, siendo a la vez sustratos de la enzima (Blakeley et al., 1960); ácidos α -aminohidroxámicos inhiben enzimas descarboxilantes (Smisman y Warner, 1972).

Por otro lado, en estudios enzimáticos realizados con extractos crudos de gramíneas, es necesario considerar la probable presencia de Hx, los cuales podrían interferir en la actividad de las enzimas ensayadas.

B. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE Hx EN PLANTULAS DE MAIZ

LH Rinconada

Otro aspecto relevante al rol que la DIMBOA desempeña ría *in vivo* como agente antipatógeno es el de las concentraciones que alcanza en la planta. Se encontró que los Hx no existen en los frutos del maíz. Wahlroos y Virtanen (1959b) tampoco hallaron DIMBOA-Glc en semillas de trigo. Virtanen y Hietala (1955) no detectaron actividad antifúngica en semillas de centeno no germinado, por lo que no habría BOA, DIBOA ni DIBOA-Glc. Por lo tanto, los Hx se sintetizan durante la ontogenia del vegetal (Figs. 17 y 18; Klun y Robinson, 1969). El hecho que estos metabolitos secundarios se encuentren en los tejidos de la planta antes que ésta tenga nomófilos fotosintéticamente activos (sea en plántulas etioladas o crecidas en la luz), indica que esos compuestos se forman a partir de precursores ya existentes en el grano (metionina, glicina, ribosa) a través de la vía anabólica del ácido shiquímico (Reimann y Eyerrum, 1964). Posteriormente, al ocurrir la fotosíntesis, se proveería nuevo material para la formación de estos metabolitos.

El que el contenido total de Hx en cada plántula vaya en aumento desde la germinación, señala que esos compuestos continúan sintetizándose durante la ontogenia,

aun cuando aparece una disminución de la concentración de Hx luego del máximo alcanzado alrededor de los 3 - 4 días de edad. Klun y Robinson (1969), mediante dilución isotópica, encontraron resultados similares a través del desarrollo completo de 5 variedades de maíz, tanto para DIBOA como para DIMBOA.

La baja con la edad en las concentraciones de Hx de un tejido cualquiera de la planta podría deberse a: i) transporte de los glucósidos hidroxámicos hacia los tejidos nuevos; ii) dilución, por crecimiento celular, de los compuestos ya sintetizados; y/o iii) variaciones en las velocidades relativas de síntesis y degradación.

El hecho que la aparición de los Hx coincida con la germinación (emergencia del eje embrionario desde la cariópside) y continúe una síntesis neta de estos factores antimicrobianos (Tabla II) hasta el momento en que normalmente el coleoptilo surge en la superficie de la tierra, sugiere que tales compuestos podrían jugar un importante rol en la defensa de la plántula contra el ataque de potenciales patógenos habitantes del suelo. Dada la elevada densidad de microbios que usualmente existen en los suelos húmedos, de las altas concentraciones de Hx alcanzadas en las plántulas de algunas variedades se puede inferir la ventaja ecológica de tales razas sobre otras que poseen menos (o no tienen) Hx y que no dispo-

nen de otros sistemas químicos de defensa. Las concentraciones de benzoxazinonas hidroxámicas (especialmente de DIMBOA en trigo, maíz y Coix y de DIBOA en centeno) pueden ser, en el estado de plántula, aproximadamente de 5 mM, lo cual es cerca de un 3,6 % del peso seco si se considera la forma glucosilada (Corcuera et al., 1982; Klun y Robinson, 1969; Virtanen et al., 1957), llegando, en maíz LH Rinconada, hasta casi 20 mM (Fig. 18.A). Tales valores son válidos si se toma en cuenta la planta in toto, pero se encontró que tanto la concentración de Hx como el contenido total difieren entre los diversos órganos de un mismo individuo (Tabla VI; Argandoña et al., 1981; Corcuera et al., 1982; Virtanen et al., 1957), llegando incluso a 28 mM en los nomófilos de plántulas de 5 días (Tabla VI), cifra que puede ser superior en individuos de 3-4 días de edad.

Por otra parte, al realizar cultivos en diferentes condiciones, se vio que la concentración de Hx aumentó tanto con menor temperatura como con menor disponibilidad hídrica, en tanto que el contenido por plántula disminuyó. Además, en los individuos que crecieron a la luz, la concentración de Hx se incrementó, no así la cantidad total; tales diferencias se deben a la distinta proporción (en masa) de los diversos órganos existente entre plántulas etioladas y verdes. Esta explicación sería válida tanto para la parte aérea como para la porción radical.

Luego, con los experimentos de cuantificación, se demuestra que la concentración de Hx en maíz depende de las condiciones de cultivo (temperatura, luz, riegos), así como de la edad y del órgano analizado, con lo cual deberían considerarse estos factores en los estudios cuantitativos de Hx en gramíneas, especialmente en lo que se refiere a su correlación con agentes patógenos. El contenido total de Hx en la planta no es directamente proporcional a la concentración de Hx, ya que depende también del peso del vegetal y de sus partes, parámetro que, a su vez, varía según las circunstancias del crecimiento.

Debe notarse que en las plantas intactas existen los glucósidos de Hx. La mayor estabilidad de estos compuestos sería ventajosa para las plantas, ya que podrían ser acumulados, más aún siendo inhibidores menos activos y poco difusibles a través de membranas. Por otro lado, la DIMBOA inhibió la síntesis de ATP en cloroplastos de espinaca, una planta que carece de este Hx. Los efectos de esta benzoxazinona sobre cloroplastos de gramíneas no son conocidos, aun cuando se sabe que la DIMBOA causa clorosis en hojas de cebada (Argandoña, V. H., com. pers.) y efectos tóxicos en trigo (Elnaghy y Linko, 1962). También algunas benzoxazolinonas afectan a especies de trigo (BOA y MBOA; Elnaghy y Linko, 1962) y a avena (BOA; Virtanen et al., 1957). Lo anterior, junto a la existencia del

DIMBOA-Glc y de la β -glucosidasa in vivo, así como las concentraciones naturalmente existentes de ese Hx y benzoxazinas relacionadas (más de 10 mmoles/Kg de TF)(Fig. 18; Argandoña et al., 1981), comparadas con las que resultaron inhibitorias en esta tesis, sugieren una compartimentalización a los niveles celular y/o tisular en tal forma que ellos no afectan el metabolismo en gramíneas. En relación con la restricción de la distribución de Hx, es posible que la DIMBOA atravesase membranas, a pesar de la relativamente baja K de asociación con micelas ($K = 10^3$; Davagnino, J., com. pers.), ya que su estructura es parecida a la de otros ácidos hidroxámicos que sí lo hacen (Gale y Atkins, 1969). Mas, dado su carácter altamente hidrofílico, es poco probable que el DIMBOA-Glc pase a través de membranas celulares, a excepción de que lo haga mediante transportadores. Luego, sería también deseable estudiar la compartimentalización de los Hx in vivo, para lo cual las técnicas de obtención de protoplastos y de organelos intactos ofrecen buenas posibilidades de realizarlo.

Por otra parte, al romperse una célula ante el ataque por un patógeno, se liberaría la aglucona hidroxámica, la cual podría causar la necrosis localizada de las células hospedante y vecinas debido a su posible acción sobre importantes vías metabólicas (fotosíntesis, respiración, y

otras). Esta muerte celular conllevaría una falta de nutrientes en la zona afectada y, por ende, aislamiento del patógeno en la porción necrótica.

Por lo tanto, es dable suponer que en la planta existe un doble mecanismo químico de defensa por Hx contra microorganismos patógenos: i) inhibición directa de los Hx sobre los organismos atacantes, y ii) aislamiento y deficiencia nutricional del patógeno por la necrosis localizada de las células atacada y adyacentes.

C. CONCLUSIONES

La DIMBOA y el DIMBOA-Glc son inhibidores de reacciones de transducción de energía, pues reaccionan con CF_1 .

La DIMBOA reacciona con tioles.

Sólo una parte de la inhibición del CF_1 por la DIMBOA se debería a su reacción con tioles. El resto se desconoce, aunque es probable que se deba a la reacción del Hx con otros grupos nucleofílicos de la enzima.

El DIMBOA-Glc se encuentra en los tejidos de maíz en concentraciones suficientes para provocar efectos tóxicos.

L I S T A D E R E F E R E N C I A S

- Anderson, W. P. 1972. Ion transport in the cells of higher plant tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23 : 51 - 72.
- Andreo, C. S. 1978. Inhibitions of energy - transducing functions of chloroplasts by spegazzinine. *Arch. Biochem. Biophys.* 186 : 416 - 421.
- Andreo, C. S. 1976. Estudios sobre los mecanismos biológicos de transferencia de energía. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- Andreo, C. S.; Ravizzini, R. A. y Vallejos, R. H. 1979. Sulphydryl groups in photosynthetic energy conservation. V. Localization of the new disulfide bridges formed by o-iodosobenzoate in coupling factor of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 547 : 370 - 379.
- Arana, J. L. y Vallejos, R. H. 1982. Involvement of sulfhydryl groups in the activation mechanism of the ATPase activity of chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* 257 : 1125 - 1127.
- Arcaya, G.; Corcuera, L. J. y Traverso, G. A. 1978. Descomposición fotoquímica de un ácido hidroxámico cíclico (DIMBOA) de Zea mays L.. *Arch. Biol. Med. Exper.* 11 : 10. Resumen.
- Argandoña, V. H.; Luza, J. G.; Niemeyer, H. M. y Corcuera, L. J. 1980. Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry* 19 : 1665 - 1668.
- Argandoña, V. H.; Niemeyer, H. M. y Corcuera, L. J. 1981. Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by the aphid Schizaphis graminum. *Phytochemistry* 20 : 673 - 676.
- Argandoña, V. H.; Peña, G. F.; Niemeyer, H. M. y Corcuera, L. J. 1982. Effect of cysteine on stability and toxicity to aphids of a cyclic hydroxamic acid from Gramineae. *Phytochemistry* 21 : 1573 - 1574.

- Brandes, W. y Heitefuss, R. 1971. Nebenwirkung von Herbiziden auf Erysiphe graminis y Cercospora herpotrichoides an Weizen. II. Physiologische und biochemische Ursachen des veränderten Befalls der Pflanze. Phytopath. Z. 72 : 34 - 52.
- Bravo, H. R.; Niemeyer, H. M. y Corcuera, L. J. 1983. Descomposición de la 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona en solventes no acuosos. Bol. Soc. Chil. Quím. 28 : 422 - 424.
- Bredenberg, J. B-son; Honkanen, E. y Virtanen, A. I. 1962. The kinetics and mechanism of the decomposition of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one. Acta Chem. Scand. 16 : 135 - 141.
- Clark, R. B.; Tiffin, L. O. y Brown, J. C. 1973. Organic acids and iron translocation in maize genotypes. Plant Physiol. 52 : 147 - 150.
- Clarkson, Jr., A. B. y Grady, R. W. 1982. The use of hydroxamic acids to block electron transport in pathogenic African trypanosomes. En Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids. H. Kehl (Ed.), Karger A. G. (Nueva York). pp 130 - 139.
- Corbett, M. D. y Chipko, B. R. 1978. Purification of hydroxamic acids by the use of ferric SP-Sephadex. J. Chromatogr. 151 : 379 - 383.
- Corcuera, L. J. 1974. Identification of the major active component present in corn extracts inhibitory to soft rot Erwinia species. Ph. D. thesis. University of Wisconsin-Madison, U. S. A..
- Corcuera, L. J.; Argandoña, V. H. y Niemeyer, H. M. 1982. Effect of cyclic hydroxamic acids from cereals on aphids. En Biology and Chemistry of Hydroxamic Acids. H. Kehl (Ed.), Karger A. G. (Nueva York). pp 111 - 118.
- Corcuera, L. J.; Woodward, M. D.; Helgeson, J. P.; Kelman, A. y Upper, C. D. 1978. 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from Zea mays with differential activity against soft rotting Erwinia species. Plant Physiol. 61 : 791 - 795.
- Cornish-Bowden, A. 1976. Principles of Enzyme Kinetics. Butterworths, Londres.

- Couture, R. M.; Routley, D. G. y Dunn, G. M. 1971. Role of cyclic hydroxamic acids in monogenic resistance of maize to Helminthosporium turcicum. Physiol. Plant Pathol. 1 : 515 - 521.
- Dabed, R.; Toral, M. I.; Corcuera, L. J. y Niemeyer, H. M. 1983. Complexes of bivalent cations with a hydroxamic acid from maize extracts. Polyhedron. En prensa.
- Davis, W. B.; Mc Caule, M. J. y Byers, B. R. 1971. Iron requirements and aluminum sensitivity of hydroxamic acid requiring strain of Bacillus megaterium. J. Bacteriology 105 : 589 - 594.
- Dawe, D. H. 1973. The relation of 1,4-benzoxazolinone and related compounds in Zea mays to Helminthosporium maydis resistance. Ph. D. thesis, Iowa State University. 87 pp (aparecido en Dissertation Abstracts International Section B 34 : 3031 - 3032.).
- Dische, Z. 1962. Color reactions for carbohydrates. En Methods in Carbohydrates Chemistry 1 : 477. Whistler, R. L. y Wolfrom, M. L. (Ed.), Academic Press, Nueva York.
- Elnaghy, M. A. y Linko, P. 1962. The role of 4-O-glucosyl-2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in resistance of wheat to stem rust. Physiol. Plant. 15 : 764 - 771.
- Elnaghy, M. A. y Shaw, M. 1966. Correlation between resistance to stem rust and the concentration of glucoside in wheat. Nature 210 : 417.
- Emery, T. F. 1971. Hydroxamic acids of natural origin. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 35 : 135 - 185.
- Farron, F. y Racker, E. 1970. Studies on the mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active adenosine triphosphatase. Biochemistry 9 : 3829 - 3836.
- Fishbein, W. N. 1982. Hydroxamic acids as urease inhibitors for medical and veterinary use. En Chemistry and Biology of Hydroxamic acids. H. Kehl (Ed.), Karger A. G. (Nueva York). pp 94 - 103.
- Friedman, M. 1973. The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins. Pergamon Press, Oxford .

- Gahagan, H. E. y Mumma, R. O. 1967. The isolation of 2-(2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one)- β -D-glucopyranoside from Zea mays. Phytochemistry 6 : 1441 - 1448.
- Gale, G. R. y Atkins, L. M. 1969. Inhibition of urease by hydroxamic acids. Arch. Int. Pharmacodyn. 180 : 289 - 299.
- Gomita, Y.; Ichimaru, Y.; Minehiro, M.; Fukamachi, K.; Uchikado, K.; Araki, Y.; Fukuda, T. y Koyama, T. 1981. Behavioral and electroencephalographic effects of coixol (6-methoxybenzoxazolone) of the components in Coix lachryma jobi var. ma yuen. Folia Pharmacol. Jpn. 77: 245 - 260. En japonés, sumario en inglés (aparecido en Biol. Abstr. 72 : 5666).
- Gould, J. M. 1976. Inhibition by triphenyltin chloride of a tightly bound membrane component involved in photo phosphorylation. Eur. J. Biochem. 62 : 567 - 575.
- Griffith, D. P. y Musher, D. M. 1973. Prevention of infected urinary stones by urease inhibition. Invest. Urol. 11: 228 - 233.
- Hamilton, R. H. 1964a. Tolerance of several grass species to 2-chloro-s-triazine herbicides in relation to degradation and content of benzoxazinone derivatives. J. Agric. Food Chem. 12 : 14 - 17.
- Hamilton, R. H. 1964b. A corn mutant deficient in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one with an altered tolerance of atrazine. Weeds 12 : 27 - 30.
- Hamilton, R. H.; Bandurski, R. S. y Reusch, W. H. 1962. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamate from Zea mays. Cereal Chem. 39 : 107 - 113.
- Hartman, J. R. 1971. Differences in soft rot Erwinia spp. in pathogenicity to corn and sensitivity to an inhibitory fraction from corn. Ph. D. thesis, University of Wisconsin, 93 pp.
- Hashimoto, Y.; Shudo, K.; Okamoto, T.; Nagao, M.; Takahashi, Y. y Sugimura, T. 1979. Mutagenicities of 4-hydroxy-1,4-benzoxazinones naturally occurring in maize plants and of related compounds. Mutation Res. 66 : 191 - 194.

- Hietala, P. K. y Wahlroos, Ö. 1956. The synthesis of 6 - methoxy-2(3)-benzoxazolinone. Acta Chem. Scand. 10 : 1196 - 1197.
- Hietala, P. K. y Virtanen, A. I. 1960. Precursors of benzoxazolinone in rye plants. II. Precursor I, the glucoside. Acta Chem. Scand. 14 : 502 - 504.
- Hiriart, V.; Corcuera, L. J.; Crivelli, I. y Andrade, C. 1978. Aspectos bioinorgánicos de complejos metálicos de ácidos hidroxámicos, DIMBOA-Cu(II). Congreso Latinoamericano de Química, Lima, Perú.
- Hofman, J. y Hofmanová, O. 1969. 1,4-benzoxazine derivatives in plants. Sephadex fractionation and identification of a new glucoside. Eur. J. Biochem. 8 :
- Hofman, J. y Hofmanová, O. 1971. 1,4-benzoxazine derivatives in plants. Absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3/4H/-one from uninjured Zea mays plants. Phytochemistry 10 : 1441 - 1444.
- Hofman, J.; Hofmanová, O. y Hanuš, V. 1969. 1,4-benzoxazine derivatives in plants. A new glucosidic derivative from Zea mays. Tetrahedron Lett. 57 : 5001 - 5002.
- Hofman, J.; Hofmanová, O. y Hanuš, V. 1970. 1,4-benzoxazine derivatives in plants. A new type of glucoside from Zea mays. Tetrahedron Lett. 37 : 3213 - 3214.
- Hofman, J. y Masojdtková, M. 1973. 1,4-benzoxazine glucosides from Zea mays. Phytochemistry 12 : 207 - 208.
- Honkanen, E. y Virtanen, A. I. 1960a. On the structure of the precursors of benzoxazolinone in rye plants. III. Synthesis of the reduction product of the aglucone $C_8H_7O_4N$. Suomen Kemistilehti B 33 : 9 - 10.
- Honkanen, E. y Virtanen, A. I. 1960b. The synthesis of precursor II of benzoxazolinone in rye plants, and the enzymic hydrolysis of precursor I, the glucoside. Acta Chem. Scand. 14 : 504 - 507.
- Honkanen, E. y Virtanen, A. I. 1960c. Synthesis of some 1,4-benzoxazine derivatives and their antimicrobial activity. Acta Chem. Scand. 14 : 1214 - 1217.
- Honkanen, E. y Virtanen, A. I. 1961. On the reaction of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one to 2(3)-benzoxazolinone. Acta Chem. Scand. 15 : 221.

- Ioannou, Y. M.; Dauterman, W. C. y Tucker, W. P. 1980. Degradation of Diazinon by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in maize. *Phytochemistry* 19 : 1607 - 1612.
- Izawa, S. y Good, N. E. 1972. Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Methods Enzymol.* 24 : 355 - 374.
- Johann, H. y Dickson, A. D. 1945. A soluble substance in corn-stalks that retards growth of *Diplodia zeae* in culture. *J. Agric. Res.* 71 : 89 - 110.
- Klun, J. A. y Brindley, T. A. 1966. Role of 6-methoxy - benzoxazolinone in inbred resistance of host plant (maize) to first-brood larvae of European corn borer. *J. Econ. Entomol.* 59 : 711 - 718.
- Klun, J. A.; Guthrie, W. D.; Hallauer, A. R. y Russel, W. A. 1970a. Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven maize inbreds. *Crop Science* 10 : 87 - 90.
- Klun, J. A. y Robinson, J. F. 1969. Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plants and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer. *J. Econ. Entomol.* 62 : 214 - 220.
- Klun, J. A.; Tipton, C. L. y Brindley, T. A. 1967. 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European corn borer. *J. Econ. Entomol.* 60 : 1529 - 1533.
- Klun, J. A.; Tipton, C. L.; Robinson, J. F.; Ostrem, D. L. y Beroza, M. 1970b. Isolation and identification of 6,7-dimethoxy-2-benzoxazolinone from dried tissues of *Zea mays* (L.) and evidence of its cyclic hydroxamic acid precursor. *J. Agr. Food Chem.* 18 : 663 - 665.
- Knott, D. R. y Kumar, J. 1972. Test of the relationship between a specific phenolic glucoside and stem rust resistance in wheat. *Physiol. Plant. Pathol.* 2 : 393 - 399.
- Koyama, T. 1955. Studies on the constituents of *Coix* species. On the chemical structure of coixol. *J. Pharmaceut. Soc. Japan* 75 : 702 - 704.

- Koyama, T. y Yamato, M. 1955. Studies on the constituents of Coix species. I. On the constituents of the root of Coix lachryma-jobi L.. J. Pharmaceut. Soc. Japan 75 : 699 - 701.
- Koyama, T.; Yamato, M. y Kubota, K. 1956a. Studies on the constituents of Coix species. III. Synthesis of coixol and its related compound. J. Pharmaceut. Soc. Japan 76 : 1002 - 1005.
- Koyama, T.; Yamato, M. y Kubota, K. 1956b. Studies on the constituents of Coix species. IV. Paper partition chromatography of coixol. J. Pharmaceut. Soc. Japan 76 : 1077 - 1078.
- Koyama, T.; Yamato, M. y Kubota, K. 1957. Studies on the constituents of Coix species. V. Methylation of coixol. J. Pharmaceut. Soc. Japan 77 : 989 - 992.
- Lacy, G. H.; Hirano, S. S.; Victoria, J. I.; Kelman, A. y Upper, Ch. D. 1979. Inhibition of soft-rotting Erwinia spp. strains by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in relation to their pathogenicity on Zea mays. Phytopathology 69 : 757 - 763.
- Lankford, C. E. 1973. Bacterial assimilation of iron. CRC Critical Reviews in Microbiology 2 : 273 - 331.
- Lardy, H. A.; Connelly, J. L. y Johnson, D. 1964. Antibiotics as tools in metabolic studies. II. Inhibition of phosphoryl transfer in mitochondria by oligomycin and aurovertin. Biochemistry 3 : 1961 - 1968.
- Läuchli, A. 1972. Translocation of inorganic solutes. Ann. Rev. Plant Physiol. 23 : 197 - 218.
- Lien, S. y Racker, E. 1971. Preparation and assay of chloroplast coupling factor CF₁. Methods Enzymol. 23 : 547-555.
- Livne, A. y Racker, E. 1968. A new coupling factor for photophosphorylation. Biochem. Biophys. Research Comm. 32 : 1045 - 1049.
- Long, B. J.; Dunn, G. M.; Bowman, J. S. y Routley, D. G. 1977. Relationship of hydroxamic acid content in corn and resistance to the corn leaf aphid. Crop Sci. 17 : 55 - 58.

- Long, B. J.; Dunn, G. M. y Routley, D. G. 1974. Rapid procedure for estimating cyclic hydroxamate (DIMBOA) concentration in maize. *Crop Sci.* 14 : 601 - 603.
- Long, B. J.; Dunn, G. M. y Routley, D. G. 1975. Relationship of hydroxamic acid content in maize and resistance to northern corn leaf blight. *Crop Sci.* 15 : 333 - 335.
- Long, B. J.; Dunn, G. M. y Routley, D. G. 1978. Relationship of hydroxamate concentration in maize and field reaction to Helminthosporium turcicum. *Crop Sci.* 18 : 573 - 575.
- Loomis, R. S.; Beck, S. D. y Stauffer, J. F. 1957. The European corn borer, Pyrausta nubilalis (Hübner), and its principal host plant. V. A chemical study of host plant resistance. *Plant Physiol.* 32 : 379 - 385.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265 - 275.
- Lucero, H.; Ravizzini, R. A. y Vallejos, R. H. 1976. Inhibition of spinach chloroplasts photophosphorylation by the antibiotics leucinostatine and efrapentine. *FEBS Lett.* 68 : 141 - 144.
- McCarty, R. E.; Guillory, R. J. y Racker, E. 1965. DIO-9, an inhibitor of coupled electron transport and photophosphorylation in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 240 : 4822 - 4823.
- McCarty, R. E.; Pittman, P. R. y Tsuchiya, Y. 1972. Light dependent inhibition of photophosphorylation by N-ethylmaleimide. *J. Biol. Chem.* 247 : 3048 - 3051.
- McCarty, R. E. y Racker, E. 1967. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation II. The inhibition and stimulation of photophosphorylation by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 242 : 3435 - 3439.
- McCarty, R. E. y Racker, E. 1968. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation III. Activation of adenosine triphosphatase and ³²P-labeled orthophosphate exchange in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 243 : 129 - 137.

- Molot, P. 1965. Effect of 6-methoxybenzoxazolinone on the growth of Helminthosporium turcicum and Gibberella zeae, in vitro. (En Francés). Comptes Rendus des Séances de L'Académie de Sciences 260 : 4595 - 4598. (Citado en Chemical Abstracts 63 : 15467e).
- Neilands, J. B. 1967. Hydroxamic acids in nature. Science 156 : 1443 - 1447.
- Neilands, J. B. 1981. Microbial iron compounds. Ann. Rev. Biochem. 50 : 715 - 731.
- Nelson, N. 1976. Structure and function of chloroplast ATPase. Biochim. Biophys. Acta 456 : 314 - 338.
- Nelson, N.; Nelson, H. y Racker, E. 1972. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XI. Magnesium adenosine triphosphatase properties of heat-activated coupling factor I from chloroplasts. J. Biol. Chem. 247 : 6505 - 6510.
- Niemeyer, H. M.; Bravo, H. R.; Peña, G. F. y Corcuera, L. J. 1982. Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy - 2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one, a hydroxamic acid from Gramineae. En Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids. H. Kehl (Ed.), Karger A. G. (Basel). pp 22 - 28.
- Niemeyer, H. M.; Corcuera, L. J. y Pérez, F. J. 1982. Reaction of a cyclic hydroxamic acid from Gramineae with thiols. Phytochemistry 21 : 2287 - 2289.
- Page, E. R. 1966. Sideramines in plants and their possible role in iron metabolism. Biochem. J. 100 : 34 p.
- Penefsky, H. S. 1974. Mitochondrial and chloroplasts ATP ases. En The Enzymes. P. D. Boyer (Ed.) Academic Press (Nueva York). 3^a Ed. 10 : 375 - 394.
- Penefsky, H. S. 1977. Reversible binding of P_i by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 252 : 2891 - 2899.
- Ravizzini, R. A.; Andreo, C. S. y Vallejos, R. H. 1977. Peptide alkaloids as inhibitors of photophosphorylation in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 18 : 701 - 706.
- Ravizzini, R. A.; Andreo, C. S. y Vallejos, R. H. 1980. Subunit distribution of sulfhydryl groups and disulfide bounds in chloroplast coupling factor and ATPase activity. Biochim. Biophys. Acta 591 : 135 - 141.

- Ravizzini, R. A.; Lescano, W. I. M. y Vallejos, R. H. 1975. Effects of aurovertine on energy transfer reactions in R. rubrum chromatophores. FEBS Lett. 58 : 285 - 288.
- Reimann, J. E. y Byerrum, R. U. 1964. Studies on the biosynthesis of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one. Biochemistry 3 : 847 - 851.
- Roth, W. y Knüsli, E. 1961. Beitrag zur Kenntnis der Resistenzphänomene einzelner Pflanzen gegenüber dem Phytotoxischen Wirkstoff Simazin. Experientia 17 : 312 - 313.
- Sagino, Y. y Niyoshi, M. 1964. The specific precipitation of orthophosphate and some biochemical applications. J. Biol. Chem. 239 : 2360 - 2364.
- Salgado, M. 1980. Alcohol bencílico en cebada y su efecto sobre áfidos. Tesis de Magister, Universidad de Chile, Santiago.
- Sam, J.; Valentine, J. L. y Richmond, C. W. 1968. 3-substituted-2-benzoxazolinones. J. Pharm. Sci. 57 : 1763 - 1768.
- Sanders, E. M.; Gardner, P. D.; Berger, P. J. y Negus, N. C. 1981. 6-methoxybenzoxazolinone: A plant derivative that stimulates reproduction in Microtus montanus. Science 214 : 67 - 69.
- Scism, A. J.; BeMiller, J. N. y Caskey, A. L. 1974. Determination of 2,4-dihydroxy-1,4(2H)-benzoxazin-3-one glucosides in corn (Zea mays L.). Anal. Biochem. 58 : 1 - 13.
- Smisman, E. E.; Corbett, M. D.; Jenny, N. A. y Kristiansen, O. 1972. Mechanism of the transformation of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones and 2-hydroxy-2-methyl-4-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one to 2-benzoxazolinone. J. Org. Chem. 37 : 1700 - 1703.
- Smisman, E. E.; LaPidus, J. B. y Beck, S. D. 1957. Isolation and synthesis of an insect resistance factor from corn plant. J. Amer. Chem. Soc. 79 : 4697 - 4698.
- Smisman, E. E. y Warner, V. D. 1972. Specificity in enzyme inhibition. 2. α -aminohydroxamic acids as inhibitors of histidine decarboxylase and 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase. J. Med. Chem. 15 : 681 - 682.

- Spector, T. 1978. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for $\leq 0,5$ to 50 μg of protein. Anal. Biochem. 86 : 142 - 146.
- Tang, C. S.; Chang, S. H.; Hoo, D. y Yanagihara, K. H. 1975. Gas chromatographic determination of 2(3)-benzoxazolinones from cereal plants. Phytochemistry 14 : 2077 - 2079.
- Taussky, H. y Shorr, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. 202 : 675 - 685.
- Thompson, Jr., L.; Slife, F. W. y Buther, H. S. 1970. Environmental influence on the tolerance of corn atrazine. Weed Science 18 : 509 - 514.
- Tiffin, L. O. 1966. Iron translocation. I. Plant culture, exudate sampling, iron-citrate analysis. Plant Physiol. 41 : 510 - 514.
- Tipton, C. L. y Buell, E. L. 1970. Ferric iron complexes of hydroxamic acids from maize. Phytochemistry 9 : 1215 - 1217.
- Tipton, C. L.; Husted, R. R. y Tsao, F. H. C. 1971. Catalysis of simazine hydrolysis by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. J. Agr. Food Chem. 19 : 484 - 486.
- Tipton, C. L.; Klun, J. A.; Husted, R. R. y Pierson, M. D. 1967. Cyclic hydroxamic acids and related compounds from maize. Isolation and characterization. Biochemistry 6 : 2866 - 2870.
- Vallejos, R. H. 1981. Chemical modification of chloroplast coupling factor 1. En Energy Coupling in Photosynthesis. Selman, B. R. y Selman-Reimer, S. (Ed.), Elsevier/North Holland (Nueva York). pp 129 - 139.
- Vallejos, R. H.; Ravizzini, R. A. y Andreo, C. S. 1977. Sulphydryl groups in photosynthetic energy conservation. IV. Inhibition of the ATPase of chloroplasts coupling factor 1 by sulphydryl reagents. Biochim. Biophys. Acta 459 : 20 - 26.
- Vambutas, V. K. y Racker, E. 1965. Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent Ca^{++} dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts. J. Biol. Chem. 240 : 2660 - 2667.

- Venis, M. A. y Watson, P. J. 1978. Naturally occurring modifiers of Auxin-Receptor interaction in corn. Identification as benzoxazolinones. *Planta* 142 : 103 - 107.
- Viale, A.; Vallejos, R. H. y Jagendorf, A. T. 1981. Hydrogen exchange into soluble spinach chloroplast coupling factor during heat activation of its ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 637 : 496 - 503.
- Villarroel, A. A.; Cecchi, X.; Corcuera, L. J. y Niemeyer, H. M. 1982. Inhibición de la (Na-K)-ATPasa por un ácido hidroxámico de gramíneas. XIII Jornadas Chile - nas de Química, La Serena, 18 - 21 de Enero.
- Virtanen, A. I. 1961. Some aspects of factors in the maize plant with toxic effects on insect larvae. *Suomen Kemistilehti B* 34 : 29 - 31.
- Virtanen, A. I. y Hietala, P. K. 1955. 2(3)-benzoxazolinone an antifusarium factor in rye seedlings. *Acta Chem. Scand.* 9 : 1543 - 1544.
- Virtanen, A. I. y Hietala, P. K. 1959a. On the structures of the precursors of benzoxazolinone in rye seedlings. *Suomen Kemistilehti B* 32 : 138.
- Virtanen, A. I. y Hietala, P. K. 1959b. On the structure of the precursors of benzoxazolinone in rye plants II. *Suomen Kemistilehti B* 32 : 252.
- Virtanen, A. I. y Hietala, P. K. 1960. Precursors of benzoxazolinone in rye plants. I. Precursor II, the α -glucone. *Acta. Chem. Scand.* 14 : 499 - 502.
- Virtanen, A. I.; Hietala, P. K. y Wahlroos, Ö. 1956a. An antifungal factor in maize and wheat plants. *Suomen Kemistilehti B* 29 : 143.
- Virtanen, A. I.; Hietala, P. K. y Wahlroos, Ö. 1956b. Additional note on the antifungal factor in maize and wheat plants. *Suomen Kemistilehti B* 29 : 171.
- Virtanen, A. I.; Hietala, P. K. y Wahlroos, Ö. 1957. Antimicrobial substances in cereals and fodder plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 69 : 486 - 500.
- Virtanen, A. I. y Wahlroos, Ö. 1958. On the antifungal activity of wheat and rye seedlings. *Suomen Kemistilehti B* 31 : 402.
- Virtanen, A. I. y Wahlroos, Ö. 1963. Absence of 6-methoxy benzoxazolinone in uninjured maize tissue. *J. Pharm. Sci.* 52 : 713 - 714.

- Wahlroos, Ö. y Virtanen, A. I. 1959a. On the formation of 6-methoxybenzoxazolinone in maize and wheat plants. Suomen Kemistilehti B 32 : 139 - 140.
- Wahlroos, Ö. y Virtanen, A. I. 1959b. The precursors of 6-methoxybenzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties. Acta Chem. Scand. 13 : 1906 - 1908.
- Wahlroos, Ö. y Virtanen, A. I. 1964. Free 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one in maize. J. Pharm. Sci. 53 : 844 - 845.
- Whatley, F. R. y Arnon, D. I. 1963. Photosynthetic phosphorylation in plants. Methods Enzymol. 2 : 308 - 313.
- Wheater, D. W. F. y Snow, G. A. 1966. Assay of the mycobactins by measurement of the growth of Mycobacterium johnei. Biochem. J. 100 : 47 - 49
- Whitney, N. J. y Mortimore, C. G. 1959a. An antifungal substance in the corn plant and its effect on growth of stalk-rotting fungi. Nature 183 : 341.
- Whitney, N. J. y Mortimore, C. G. 1959b. Isolation of the anti-fungal substance, 6-methoxybenzoxazolinone, from field corn (Zea mays L.) in Canada. Nature 184 : 1320.
- Whitney, N. J. y Mortimore, C. G. 1961. Effect of 6-methoxybenzoxazolinone on the growth of Xanthomas stewartii (Erw. Smith) Dowson and its presence in sweet corn (Zea mays var. saccharata Bailey). Nature 189 : 596 - 597.
- Whitney, N. J. y Mortimore, C. G. 1962. Evaluation of a bioassay of ether extracts from corn (Zea mays L.) as a means of screening inbreds for resistance to root and stalk rot. Can. J. Plant Science 42 : 302 - 307.
- Willard, J. I. y Penner, D. 1976. Benzoxazinones: cyclic hydroxamic acids found in plants. Residue Rev. 64 : 67 - 76.
- Woodward, M. D. 1975. Biological and chemical properties of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one and related compounds from maize. Ph. D. thesis, University of Wisconsin-Madison.
- Woodward, M. D.; Corcuera, L. J.; Helgeson, J. P.; Kelman, A. y Upper, Ch. D. 1978b. Factors that influence the activity of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one on Erwinia species in growth assays. Plant Physiol. 61 : 803 - 805.

- Woodward, M. D.; Corcuera, L. J.; Helgeson, J. P.; Kelman, A. y Upper, Ch. D. 1979b. Quantitation of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize by gas-liquid chromatography. Plant Physiol. 63 : 14 - 19.
- Woodward, M. D.; Corcuera, L. J.; Helgeson, J. P. y Upper, Ch. D. 1978a. Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in aqueous solutions. Plant Physiol. 61 : 796 - 802.
- Woodward, M. D.; Corcuera, L. J.; Schnoes, H. K.; Helgeson, J. P. y Upper, Ch. D. 1979a. Identification of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize extracts by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. Plant Physiol. 63 : 9 - 13.
- Zúñiga, G. E. 1982. Acidos hidroxámicos en gramíneas cultivadas y silvestres. Tesis de Licenciatura, Universidad de Santiago, Chile.

