

INHIBICION DE ENZIMAS POR 1,4-BENZOXAZIN-3-ONAS

Tesis
presentada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología
Facultad de Ciencias

por

FRANCISCO J. PEREZ CORREA

Profesor Patrocinante: Dr. Hermann Niemeyer M.

Junio 1987

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

FRANCISCO J. PEREZ CORREA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Junio de 1987.

Profesor Patrocinante de Tesis

Dr. Hermann Niemeyer Marich

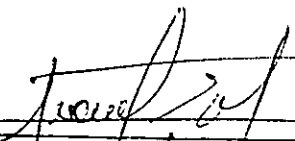
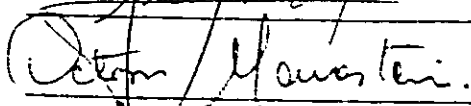
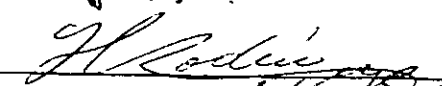

Comisión Informante de Tesis

Dr. Lionel Gil

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Hernán Rodríguez

Dr. Eduardo Silva

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Fisco-Química
Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile,
bajo la dirección del Dr. Hermann Niemeyer Marich.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. HERMANN NIEMEYER M. por su contribucion y gran entusiasmo en el desarrollo de esta Tesis.

Al Dr. OSCAR ROVERI. por sus oportunos e ilustrados comentarios.

Al Profesor HERNAN RODRIGUEZ. por sus valiosas sugerencias y comentarios.

P CONSUELO Y FRANCISCA

INDICE DE MATERIAS

	Pág
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de abreviaturas	xii
Estructuras	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii

INTRODUCCION

Metabolitos secundarios de plantas	1
Biosíntesis de Hx	2
Actividad biológica de los Hx	4
Bases bioquímicas de la actividad biológica	5
Propiedades químicas de los Hx	6
Análisis estructural	6
Síntesis	7
Estabilidad	8
Análisis cuantitativo	10
Propiedades quelantes	10
Detoxificación de herbicidas y pesticidas	11
Reactividad química	12
Planteamiento del problema	15

<u>MATERIALES Y METODOS</u>	16
ESTUDIOS FISICOQUIMICOS	16
Aislamiento del DIMBOA	16
Origen de los Reactivos	16
Síntesis de análogos	16
2-Nitro-5-metoxifenol	18
2-Amino-5-metoxifenol	18
2-Nitrofenoxiacetato de metilo	18
5-Metoxi-2-nitrofenoxiacetato de metilo	19
4-Hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	19
7-Metoxi-4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	19
2-Bromo-4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	20
2,4-Dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	21
2-Hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	21
Descripción de las cinéticas	23
Reacción del DIMBOA con el etanotiol	23
Experimento de resonancia de espín electrónico	23
Determinación de pKa	24
Reacción del DIMBOA con la butilamina	24
ESTUDIOS ENZIMATICOS	25
Origen de la papaina y de los reactivos	25
Activación de la papaina	25
Ensayo enzimático	26
Inactivación de la papaina por el DIMBOA	26
Titulación del grupo sulfhidrilo de la papaina	27

Análisis de aminoácidos	27
Reversión de la inactivación por DDT	28
Productos de la reacción	28
<u>RESULTADOS</u>	29
ESTUDIOS FISICOQUIMICOS	29
Reacción del DIMBOA con aminoácidos	29
Reacción del DIMBOA con tioles	30
Reacción del DIMBOA con etanotiol	31
Efecto del pH sobre la reacción	32
Análisis espectroscópico	32
Análisis cinético	33
Efecto del grupo metoxilo del DIMBOA	37
Estudio de resonancia de espín electrónico	38
Reacción del DIMBOA con aminas	38
Reacción del DIMBOA con la butilamina	38
Productos de la reacción	39
Análisis cinético	39
Efecto del pH sobre la reacción	41
Efecto del borato sobre la reacción DIMBOA + lisina	43
ESTUDIOS ENZIMATICOS	46
Reacción del DIMBOA con la papaína	46
Análisis cinético	47
Efecto de la temperatura	51
Efecto de sustratos	52
Titulación del grupo SH de la papaína	53

Análisis de aminoácidos	54
Efecto del pH sobre la inactivación	55
Efecto del pH sobre la asociación	57
Reversión de la inactivación por DDT	57
Productos de la reacción	57
Reacción de análogos del DIMBOA con la papaína	60
<u>DISCUSION</u>	63
Reacción del DIMBOA con tioles	63
Reacción del DIMBOA con la papaína	65
Residuo reactivo: Cys-25	65
Análisis cinético	65
Protección por sustratos	66
Efecto del pH	67
Mecanismo de la reacción	70
Reacción del DIMBOA con aminas	73
<u>REFERENCIAS</u>	74

Lista de Tablas

Tabla 1.	Propiedades físicas y espectroscópicas del DIMBOA y compuestos análogos	22
Tabla 2.	Reactividad del DIMBOA frente a aminoácidos	29
Tabla 3.	Comparación de los valores directo y ajustado de la fase lineal de la inactivación de la papaína por el DIMBOA	50
Tabla 4.	Análisis de aminoácidos de la papaína sin y con modificar por DIMBOA	54
Tabla 5.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la inactivación de la papaína por el DIMBOA	58
Tabla 6.	Comparación entre parámetros cinéticos de la inactivación de la papaína por el DIMBOA y por el compuesto 8	61

Lista de Figuras

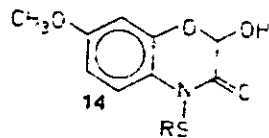
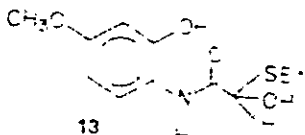
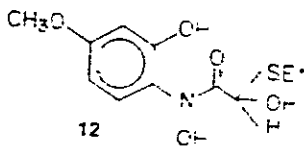
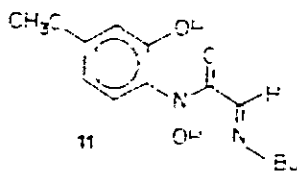
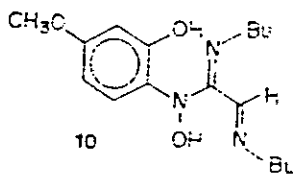
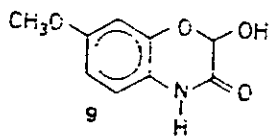
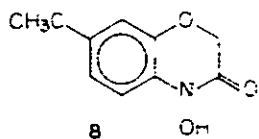
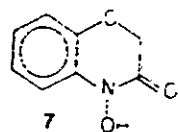
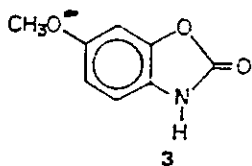
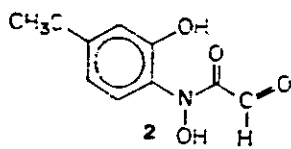
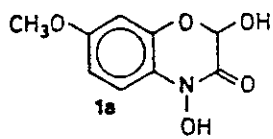
Figura 1.	Reactividad del DIMBOA hacia distintos tioles	30
Figura 2.	Efecto del pH sobre la reactividad del DIMBOA hacia mercaptoetanol	34
Figura 3.	Efecto del pH sobre k_2^{app} , para la reacción del DIMBOA con mercaptoetanol y con Cys-ME	35
Figura 4.	Relación lineal de energía libre entre k_2 para reacción del DIMBOA con tioles y pKa del tiol	36
Figura 5.	Comparación de la reactividad del DIMBOA y del DIBOA hacia la cisteína	37
Figura 6.	Reactividad del DIMBOA hacia butilamina	41
Figura 7.	Efecto del pH sobre k_2^{app} en la reacción del DIMBOA con lisina	43
Figura 8.	Efecto del pH sobre la reactividad del DIMBOA con lisina en presencia de borato	44
Figura 9.	Efecto del pH sobre la constante de velocidad de segundo orden para la reacción del DIMBOA con lisina en presencia y ausencia de borato	45
Figura 10.	Efecto del pH sobre la constante de velocidad de segundo orden para la reacción del DIMBOA con la N- α -acetil-lisina en presencia de borato	45
Figura 11.	Inactivación de la papaína para la fase lineal de la inactivación de la papaína por el DIMBOA	47
Figura 12.	Gráfico de dobles recíprocos de la porción lineal de las curvas de inactivación de la	

	papaína por el DIMBOA en tampón fosfato pH 6,8	
Figura 13.	Gráficos de Arrhenius para la inactivación de la papaína por el DIMBOA	51
Figura 14.	Efecto de sustratos sobre la inactivación de la papaína por el DIMBOA	52
Figura 15.	Relación entre pérdida de actividad y pérdida de grupos sulfhidrilo titulables por acción del DIMBOA sobre la papaína	53
Figura 16.	Efecto del pH sobre la inactivación de la papaína por el DIMBOA	56
Figura 17.	Recuperación de actividad por agregado de DDT a la papaína inactivada por el DIMBOA	59
Figura 18.	Efecto de la concentración de DDT agregado sobre la recuperación de actividad de la papaína inactivada por el DIMBOA	60
Figura 19.	Inactivación de la papaína por el compuesto 8	62

Lista de abreviaturas

BAEE	éster etílico de la N-carbobenciloxiarginina
BG	N-benzoilglicina
BGEE	éster etílico de la N-carbobenciloxiglicina
Cys-Me	éster metílico de la cisteína
DIBOA	2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (1b)
DIMBOA	2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (1a)
DMSO	dimetilsulfóxido
DTNB	ácido ditio-bis-2,4-dinitobenzoico
DTT	ditiotreitól
2-H-DIBOA	4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (7)
2-H-DIMBOA	7-metoxi-4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (8)
Hx	ácidos hidrxámicos de gramíneas
MBOA	6-metoxi-benzoxazolin-2-ona (3)
ME	mercaptoetanol
N-CBZ	N-carbobenciloxiglicina

ESTRUCTURAS



RESUMEN

El DIMBOA, el principal ácido hidroxámico aislado de extractos de cereales como maíz y trigo, es un factor de resistencia de la planta contra el ataque de diversos organismos. La amplia toxicidad del DIMBOA ha sido atribuida a su efecto inhibitorio sobre diversas fases del metabolismo energético, tanto de mitocondrias como de cloroplastos. Se ha sugerido que dichos efectos se deberían a la reacción del DIMBOA con grupos sulfhidrilo u otros nucleófilos de enzimas que participan en esas funciones.

Con el objeto de explorar esta proposición, en esta tesis se recurrió al uso de modelos: se estudió la reacción del DIMBOA con tioles en solución acuosa, y luego la reacción del DIMBOA con un tiol ubicado en una proteína. Para esto se eligió la papaina, que posee un único residuo de cisteína libre, aquel del sitio activo (Cys-25), y cuya estructura y mecanismo de catálisis es conocido.

La reacción del DIMBOA con tioles en solución acuosa condujo al producto de reducción 9 y a los productos de adición 12 y 13. Los estudios del efecto del pH y del efecto del pKa de diversos tioles sobre la velocidad de reacción indicaron que las especies reactivas son DIMBOA sin disociar y el anión tiolato. Estudios de resonancia de espín electrónico señalaron que la reacción ocurre a través de una vía heterolítica. La reactividad del DIMBOA fue mayor que la de su análogo demetoxilado. Estos resultados permitieron postular el siguiente mecanismo para la reacción del

DIMBOA con tioles: ataque nucleofílico del anión tiolato sobre el nitrógeno hidroxámico con formación del intermediario 14, y reacción de éste con otra molécula de tiol para generar el disulfuro y la lactama correspondiente.

El DIMBOA inactivó a la papaína. La disminución de la actividad de la papaína fué proporcional a la disminución del título de tiol. El análisis de aminoácidos mostró que sólo el contenido de cisteína varió significativamente cuando la enzima fué inactivada. Estos resultados indicaron que la inactivación de la enzima se debe a la reacción entre la Cys-25 de la papaína y el DIMBOA. Por otra parte, en tanto el compuesto 8 inhibió la papaína en forma comparable a como lo hizo el DIMBOA, el compuesto 9 no la alteró. Estos resultados, junto a estudios del efecto del pH sobre la constante de inactivación y de asociación de la papaína con el DIMBOA, indicaron que la Cys-25 reacciona con el nitrógeno-hidroxámico del DIMBOA, y que el mecanismo de la reacción es similar al que ocurre en solución acuosa.

Se postuló que el mecanismo de reacción de la papaína con el DIMBOA consistiría en : i) asociación del inactivador a la enzima por fuerzas hidrofóbicas, y por fuerzas electrostáticas entre la Cys-25 y el nitrógeno-hidroxámico y la Gln-19 y el oxígeno-hidroxámico; y ii) inactivación propiamente tal, con ataque del grupo sulfhidrilo de la Cys-25 sobre el nitrógeno-hidroxámico y formación de un intermediario semejante a 14. La reversión de la inactivación por DTT es consistente con este mecanismo.

Los estudios de la reacción del DIMBOA con tioles en una

enzima sugieren que la toxicidad del DIMBOA se debe a la reacción de éste con grupos sulfhidrilo de enzimas ya sea del metabolismo energético o de otra ruta metabólica esencial.

Se demostró además que el DIMBOA reacciona con nucleófilos no reductores como aminos, a través de su tautómero de cadena abierta, 2, generando bases de Schiff. Esta reacción no fué estudiada con grupos amino de enzimas, pero también podría contribuir a explicar la amplia toxicidad del DIMBOA.

ABSTRACT

DIMBOA, the main hydroxamic acid isolated from extracts of cereals such as maize and wheat, is a plant resistance factor against various organisms. The wide toxicity exhibited by DIMBOA has been attributed to its inhibitory effect over various phases of energy metabolism in mitochondria as well as in chloroplasts. It has been suggested that those effects are due to the reaction of DIMBOA with sulfhydryl groups or other nucleophiles in enzymes participating in such functions.

We have explored in this thesis this proposition with the aid of model systems. The reaction of DIMBOA with thiols in aqueous solutions and the reaction of DIMBOA with a thiol on an enzyme were studied. Papain was chosen since it has a single free cysteine, that of the active site (Cys-25), and its structure and mechanism of catalysis are known.

The reaction of DIMBOA with thiols in aqueous solutions lead to the reduction product 9 and the addition products 12 and 13. The effect of pH and of pKa of various thiols on the reaction rate indicated that the reactive species were undissociated DIMBOA and thiolate anion. Electron spin resonance studies pointed to a heterolytic reaction mechanism. The reactivity of DIMBOA was higher than that of its demethoxylated analogue. These results lead to the proposal of the following reaction mechanism: a nucleophilic attack of thiolate anion on the hydroxamic nitrogen atom with formation of intermediate 14, followed by the

reaction of this intermediate with another thiol molecule to generate a disulfide and the corresponding lactam.

DIMBOA inactivated papain. The loss of activity was proportional to the loss of thiol titre of the enzyme. Aminoacid analysis showed that only cysteine content varied significantly upon inactivation of the enzyme. These results indicate that DIMBOA inactivated papain through reaction with Cys-25. Compound 8 inactivated papain in a way similar to DIMBOA; however, compound 9 had no effect on the activity of papain. These results, together with the pH dependence of the association constant and the rate of the inactivation step between DIMBOA and papain, indicated that Cys-25 reacts with the hydroxamic nitrogen atom of DIMBOA in a fashion similar to the reaction of DIMBOA with thiols in aqueous solution.

The following mechanism was postulated for the reaction of papain with DIMBOA: i) association of the inactivator to the enzyme by hydrophobic interactions and by electrostatic interactions between Cys-25 and the hydroxamic nitrogen atom and between Gln-19 and the hydroxamic oxygen atom; and ii) inactivation step, with attack of the sulfhydryl group of Cys-25 on the hydroxamic nitrogen atom with formation of an intermediate similar to 14. The reversion of the inactivation by DTT is consistent with this mechanism.

The studies of the reactions of DIMBOA with a thiol enzyme indicate that the toxicity of DIMBOA may be due to its reaction with sulfhydryl groups of enzymes of energy metabolism or other

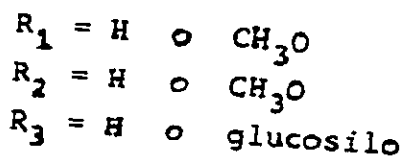
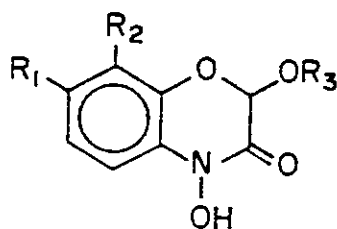
essential metabolic routes.

DIMBOA was also shown to react with non-reducing nucleophiles such as amines to give Schiff bases through the intermediate 2. The study was not pursued with amino groups in an enzyme. However, it may be postulated that this reaction also contributes to the toxicity of DIMBOA.

INTRODUCCION

Metabolitos secundarios de plantas. Las plantas frecuentemente producen una gran diversidad de compuestos químicos, lo que respondería a su falta de movilidad (Bell, 1978). Es así como se piensa que funciones esenciales para los seres vivos como defensa y comunicación, serían realizadas por las plantas por medios químicos (Harborne, 1982). A pesar de la enorme variedad de compuestos químicos encontrados en las plantas, su biosíntesis está estrechamente ligada a las rutas generales del metabolismo primario. La diversidad estructural sería fruto del drenaje de intermediarios de estas rutas generales mediante diversas reacciones catalizadas por enzimas específicas.

Dentro de la familia Gramineae, y particularmente en los cereales como maíz, trigo y centeno, se han aislado en cantidades que llegan hasta el 3% del peso seco de la planta, ácidos hidroxámicos (Hx, 1) derivados de la 1,4-benzoxazin-3-ona (Willard y Penner, 1976). Estos ácidos, al igual que muchos otros metabolitos secundarios de plantas, son acumulados y almacenados



1a DIMBOA : $R_1 = CH_3O, R_2 = R_3 = H$

1b DIBOA : $R_1 = R_2 = R_3 = H$

en la planta como glucósidos. Sin embargo, cuando el tejido vegetal es dañado, los glucósidos son hidrolizados enzimáticamente a las respectivas agluconas (Hofman y Hofmanova, 1969). Este es un fenómeno bastante común en el reino vegetal (Hosel, 1981) mediante el cual la planta almacenaría compuestos biológicamente activos. Los compuestos glicosilados difieren de sus respectivas agluconas por presentar una mayor solubilidad en agua, una menor reactividad química, y una menor actividad biológica. La interconversión entre glicósidos y agluconas puede producirse por una transglicosidación, que utiliza glicosilnucleótidos con participación de enzimas del tipo transferasas (E.C. 2.4), y una hidrólisis mediante glicosidasas (E.C. 3.2), que liberan el azúcar y la aglucona correspondiente.

Biosíntesis de Hx. La biosíntesis de los Hx ha sido relativamente poco estudiada. Estudios realizados in vivo en hojas de maíz utilizando precursores marcados (Reiman y Bjerrum, 1964) fueron concluyentes en cuanto al origen del anillo aromático (vía del ácido chiquímico), del carbono 3 del anillo oxazina (carbono 2 de la ribosa), y del grupo metoxilo del anillo aromático (transmetilación a partir de metionina). Además se sugirió que el carbono 2 del anillo oxazina provenía del carbono 1 de la ribosa, pero no se dieron pruebas directas. Utilizando técnicas similares, Tipton y col (1973) demostraron la incorporación de ^{14}C y ^{15}N del ácido antranílico en el anillo benzoxazina con una baja dilución isotópica, sugiriendo una ruta

biosintética similar a la del triptofano. Aún no ha sido demostrado si el carbono que se une al oxígeno en el anillo benzoxazina es el carbono 1 o el 3 del ácido antranílico. Leete (1986) ha iniciado estudios en este sentido utilizando ácido antranílico marcado en los átomos de carbono unidos al grupo carboxilo y amino. Por otro lado, estudios de velocidad de incorporación isotópica en los Hx utilizando 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona marcada, demostraron que la hidroxilación del nitrógeno era la reacción que ocurría en forma más rápida y extensa, seguida de la metoxilación en la posición 7 del anillo. También se demostró en plantas intactas la interconversión entre la forma oxidada (Hx) y la reducida (lactama) de las benzoxazinonas. Sin embargo, cuando este experimento fue realizado en extractos libres de células, no se observó interconversión. Este hecho fue interpretado como que el sustrato para la interconversión era el glicósido, y dado que en el extracto existiría actividad glicosidásica, el glicósido no se encontraría como tal, y por tanto no se observaría interconversión (Tipton y col., 1973).

Estudios genéticos realizados en maíz indican que la expresión génica de los Hx estaría controlada por un único gen dominante (Hamilton, 1964). Se han descrito líneas de maíz con el genotipo bxbx, que poseen menos de 0,007 milimoles/ Kg de peso fresco, y líneas con el genotipo BxBx, que poseen 2,6 milimoles/ Kg de peso fresco (Woodward y col., 1979b). Mediante análisis monosómico y otras técnicas citogenéticas, el locus bx fue

ubicado en el cromosoma 4 del genoma del maíz (Simcox y Weber, 1985).

Actividad biológica de los Hx. El aspecto de los Hx más extensamente abordado en la literatura es su actividad biológica, probablemente debido a su importancia agronómica. Es así como la toxicidad de los Hx ha sido ensayada sobre diversos organismos, particularmente aquellos que constituyen plagas y pestes para las gramíneas cultivadas. Gran parte de estos estudios se ha basado en medir los efectos de la concentración de Hx sobre variables macroscópicas como tasas de reproducción y de mortalidad en poblaciones de insectos (Long y col., 1977; Argandoña y col., 1980) y de crecimiento en hongos (ElNaghy y Linko, 1962) y bacterias (Corcuera y col., 1978), ya sea en condiciones de campo o de laboratorio. Los casos estudiados con mayor detalle son el de la larva del insecto taladrador del maíz, Ostrinia nubilalis (Klun y col., 1966) y el de los áfidos Methopolophium dirhodum (Argandoña y col., 1980), Schizaphis graminum (Argandoña y col., 1983), Rhopalosiphum maidis (Long y col., 1977), y Sitobion avenae (Bohidar y col., 1986). En estos casos se ha demostrado la existencia de relaciones inversas entre el contenido de Hx y la sobrevivencia y la tasa de reproducción de los insectos. Basados en estos resultados, estos autores han propuesto que los Hx constituirían un mecanismo de defensa de la planta contra el ataque de estos organismos.

Bases bioquímicas de la actividad biológica de los Hx. A pesar de lo extenso de la literatura en esta área, el conocimiento que se tiene sobre las bases bioquímicas de la toxicidad de estos compuestos es escaso. Dado que los Hx son tóxicos hacia una amplia gama de organismos, una estrategia seguida para abordar este problema fué estudiar su efecto sobre la cadena respiratoria. En estudios realizados en cloroplastos de espinacas se demostró que el DIMBOA, el Hx más abundante encontrado en maíz (Woodward y col., 1979b), inhibía tanto la fotofosforilación cíclica como la no cíclica, afectando el transporte de electrones acoplado, pero no el desacoplado ni el basal; también se demostró la inhibición del factor acoplante CF₁ (Queirolo y col., 1981). Estudios realizados sobre la inhibición de la actividad ATPásica de CF₁ por el DIMBOA demostraron una inhibición rápida reversible no competitiva que fué parcialmente protegida por yodoacetamida, y otra lenta e irreversible cuya naturaleza fué postulada como debido a la modificación irreversible de grupos sulfhidrilo de la enzima (Queirolo y col., 1983). En estudios realizados en partículas submitocondriales de corazón de bovino, Niemeyer y col. (1986) encontraron que el DIMBOA en concentraciones superiores a 5 mM inhibía el transporte de electrones desde succinato y NADH hasta oxígeno, y concluyeron que esta inhibición era a nivel de la cadena respiratoria, ya que el mismo efecto era observado en presencia de desacopladores. Además encontraron que a concentraciones menores que 5 mM, el DIMBOA inhibía la síntesis de ATP, el intercambio ³²P-ATP, y la

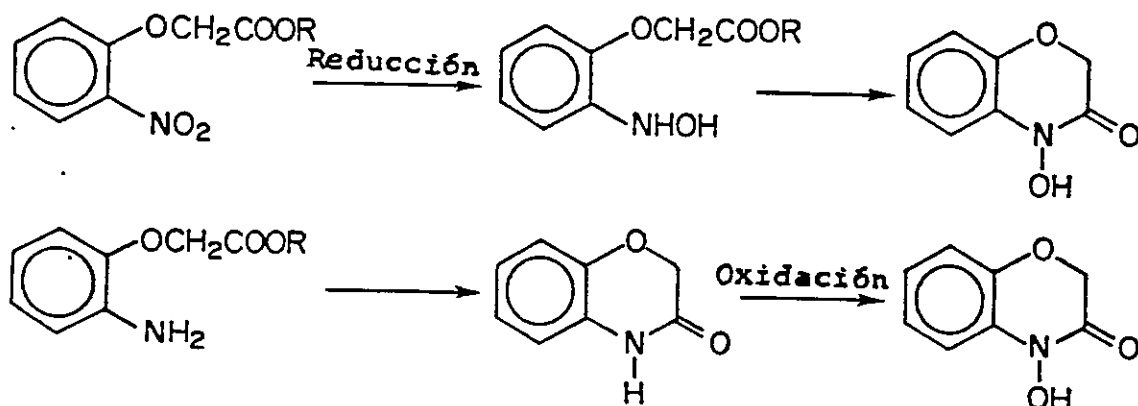
actividad ATPásica. Estas inhibiciones fueron reversibles ya que una dilución de 100 veces restablecía la actividad original. Por otra parte, la incubación previa de las partículas submitocondriales con DIMBOA, produjo inhibiciones irreversibles tanto del transporte de electrones desde succinato y NADH hasta oxígeno, como del intercambio ^{32}P -ATP. La dependencia de la velocidad de inactivación con respecto a la concentración de DIMBOA fue lineal en el primer caso e hiperbólica en el segundo. En consecuencia, el sitio modificado por el DIMBOA responsable de la inactivación de la reacción de intercambio sería necesariamente diferente del sitio responsable de la inactivación del transporte de electrones, ya que ambas inactivaciones siguen esquemas cinéticos diferentes (Niemeyer y col., 1986).

Propiedades químicas de los Hx. La química de los Hx se ha desarrollado bajo diversos aspectos : (i) análisis estructural, (ii) síntesis, (iii) estabilidad en soluciones acuosas y no acuosas, (iv) métodos analíticos de cuantificación en extractos de plantas, (v) propiedades quelantes de cationes, (vi) propiedades detoxificantes de herbicidas, y (vii) reactividad química.

Análisis estructural de los Hx. Wahlroos y Virtanen (1959) fueron los primeros en proponer una estructura para los Hx aislados de gramíneas. Estas han sido posteriormente confirmadas por espectrometría de masas (Woodward y col., 1979a), NMR de ^{13}C

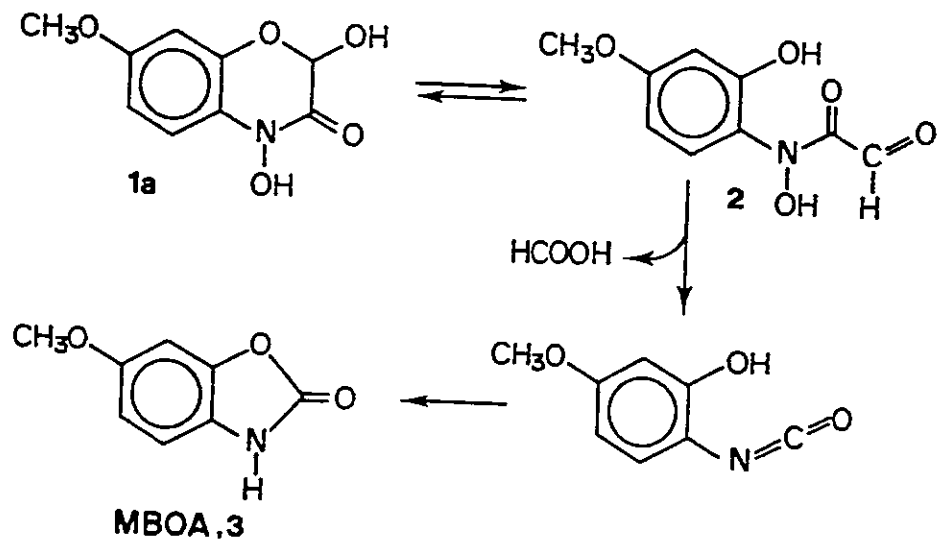
(Ioannou y col., 1980) y difracción de rayos x (Kutschabsky y col., 1982). Si el C-2 del anillo oxazina de los Hx derivados de benzoxazinonas se encuentra sustituido, constituye un centro quiral. La estereoquímica de éste fué estudiada por Nagao y col. (1985) quienes establecieron la configuración 2R para el caso de los glucósidos. En el caso de las agluconas, el C-2 es ópticamente inactivo debido a que forma parte de un hemiacetal que se interconvierte rápidamente al igual que un centro anomérico de un azúcar.

Síntesis de Hx. Honkanen y Virtanen (1960) informaron por primera vez la síntesis del DIBOA (1b), el Hx mayoritario en centeno. Existen dos estrategias generales para la síntesis de estos ácidos hidroxámicos. Una está basada en la reducción de un nitroderivado para dar la correspondiente hidroxilamina, que posteriormente se cicla para dar el respectivo ácido hidroxámico (Jernow y Rosen, 1975), y la otra en la ciclación de un aminoderivado para dar la lactama correspondiente, que por oxidación da el respectivo ácido hidroxámico (Martin y col.,



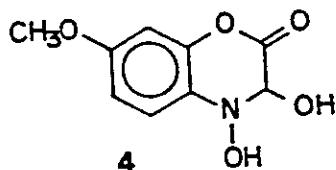
1979). Ambas estrategias conducen a bajos rendimientos, probablemente debido a que el estado de oxidación intermedio del nitrógeno en la función hidroxámica es difícil de conseguir.

Estabilidad de los Hx. Desde los primeros trabajos de Virtanen se informó que tanto el DIMBOA como su análogo demetoxilado DIBOA se descomponían en solución acuosa generando las correspondientes benzoxazolinonas (Honkanen y Virtanen, 1961). Posteriormente, este grupo propuso un mecanismo para la descomposición que incluye la deprotonación del OH hidroxámico, apertura del anillo oxazina en la función hemiacetálica, ataque nucleofílico del oxígeno-hidroxámico al carbonilo aldehídico con formación de un isocianato liberación de formato, y finalmente ciclación del isocianato para dar la benzoxazolinona correspondiente (Brenderberg y col., 1962).



Woodward y col. (1978) informaron que la descomposición del DIMBOA en soluciones acuosas de distintos pH no era cuantitativa en la producción de 6-metoxibenzoxazolinona (MBOA, 3). El efecto del pH sobre la descomposición fué posteriormente estudiado por Niemeyer y col. (1982a), quienes demostraron que la dependencia de la velocidad de descomposición con el pH era una curva tipo campana con dos puntos de inflexión en la zona de los dos pKa del DIMBOA y que las tres especies ácido - base del DIMBOA eran reactivas. Bravo y Niemeyer (1985) estudiaron esta misma reacción en solventes apróticos, encontrando que la etapa limitante de la reacción era la apertura del hemiacetal en solventes de baja donicidad, y la formación del isocianato en solventes de alta donicidad. También encontraron que la descomposición no era cuantitativa en estos solventes. Un producto secundario de la descomposición del DIMBOA en dioxano, la 3,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-2-ona (4), fué caracterizado (Bravo y Niemeyer, 1986).

El tautómero de cadena abierta 2, postulado en la descomposición del DIMBOA (Brendenberg y col., 1962; Smissman y col., 1972), fué cuantificado en solución mediante técnicas polarográficas (Copaja y col., 1986).



Análisis de los Hx. El disponer de técnicas analíticas adecuadas para cuantificar Hx en extractos de plantas, ha sido una preocupación constante de los investigadores en esta área. El uso de la propiedad que presentan los ácidos hidroxámicos de formar complejos coloreados con Fe^{+2} , es quizás la técnica más empleada (Hamilton, 1964). Sin embargo, esta técnica presenta los inconvenientes de no discriminar entre diferentes Hx, y de que puede sufrir la interferencia de compuestos fenólicos en el extracto. Una técnica más sensible y capaz de discriminar entre los distintos Hx basada en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fué desarrollada por Woodward y col. (1979a, 1979b). En esta técnica es necesario silanizar los Hx antes de someterlos a análisis, debido a su baja volatilidad. Recientemente se han desarrollado técnicas que utilizan cromatografía líquida de alta presión tanto en fase directa (Gutiérrez y col., 1982) como en fase reversa (Grambow y col., 1986). En estos casos no es necesario derivatizar previamente la muestra, pero la sensibilidad del método es inferior a aquella conseguida con GC-MS.

Propiedades quelantes de los Hx. La capacidad de los ácidos hidroxámicos de formar complejos con cationes minerales es una propiedad química característica de éstos. Los ácidos hidroxámicos aislados de microorganismos presentan una alta afinidad por calcio, hierro y cobalto, y se ha demostrado su participación en el transporte de estos iones (Neilands, 1967;

Emery, 1971). La posibilidad de que los Hx. aislados de gramíneas jueguen un rol similar fué sugerido por Page (1966). Tipton y Buell (1970) determinaron las constantes de afinidad del DIMBOA y de su glucósido por ion férrico, encontrando que eran varios órdenes de magnitud menores que la de los sideróforos. Por otra parte, Dabed y col. (1983) determinaron las constantes de afinidad del DIMBOA por cobre, níquel, zinc y manganeso, e Hiriart y col. (1985) realizaron un estudio más detallado de los complejos DIMBOA-cobre. Los estudios descritos no fueron concluyentes en cuanto a la participación de los Hx en el transporte de minerales en las plantas.

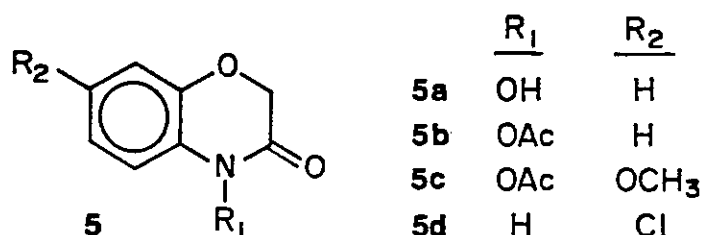
Detoxificación de herbicidas y pesticidas por Hx. Los herbicidas derivados de la s-triazina, tales como la 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina (atrazina) y la 2-cloro-4,6-bis-etilamino-s-triazina (simazina) son los herbicidas de mayor uso en los cultivos de maíz y de trigo debido a la mayor tolerancia exhibida por estos cultivos en relación a las malezas que los acosan. Se ha sugerido que la metabolización de los herbicidas por los cereales resistentes sería el mecanismo que les confiere tolerancia. Tres mecanismos de detoxificación de herbicidas derivados de la triazina han sido descritos en plantas superiores: la N-dealquilación, la hidroxilación, y la conjugación con péptidos (Shimabukuro y col., 1970). En cereales, el mecanismo que predomina es la hidroxilación, es decir, la transformación de las 2-cloro-s-triazinas en los 2-

hidroxiderivados que no poseen propiedades fitotóxicas (Hamilton y Moreland, 1962). Esta reacción es catalizada en forma no enzimática por extractos de maíz (Castelfranco y col., 1961; Roth y Kunsli, 1961). Hamilton y Moreland (1962) identificaron el factor catalítico como DIMBOA. Experimentos in vitro demostraron que el DIMBOA catalizaba la hidroxilación de la atrazina y la simazina, en tanto que experimentos in vivo demostraron que los compuestos hidroxilados eran aislados de extractos de maíz de plantas tratadas previamente con los herbicidas (Hamilton y Moreland, 1962). Además, Hamilton (1964) demostró que variedades de maíz que no contenían Hx eran susceptibles a la acción de estos herbicidas. En experimentos del mismo tipo, Malan y col. (1984), utilizando variedades de maíz con distinto contenido de Hx, encontraron una buena correlación directa entre el contenido de Hx y el grado de tolerancia a los herbicidas.

Por otra parte, Iannou y col. (1980) encontraron que el DIMBOA también catalizaba la hidrólisis de insecticidas organofosforados como el Diazinon. El mecanismo a través del cual el DIMBOA catalizaría estas reacciones no ha sido estudiado, pero posiblemente actuaría, a semejanza con el caso de las s-triazinas, como un catalizador nucleofílico, ya que sería un buen nucleófilo y a la vez un buen nucleófilo (Pearson y col., 1968).

Reactividad química de los Hx. El estudio de la reactividad química de los Hx derivados de 1,4-benzoxazinonas se ha orientado hacia la búsqueda de los fundamentos químicos de su amplia y

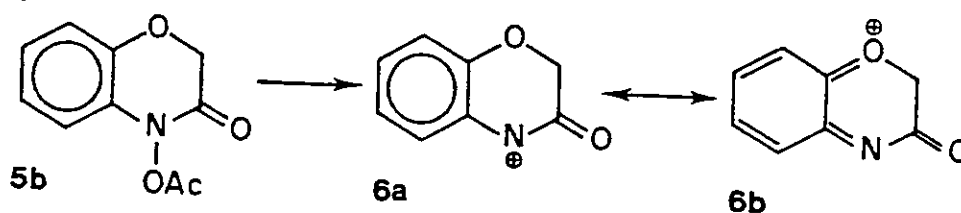
variada actividad biológica. Hashimoto y col. (1979) utilizaron moléculas modelo derivadas de la 1,4-benzoxazin-3-ona **5** para realizar estudios de reactividad química, y encontraron que **5b** y **5c** reaccionaban con nucleófilos como fenoles e indoles,



generando los respectivos productos de sustitución en las posiciones 4 y 6, dependiendo de las condiciones de reacción. Por otra parte, Ishizaki y col. (1983) utilizaron **5c** como modelo para estudiar los mecanismos de acción biológica de **1**. Para esto, realizaron estudios de reactividad química de **5c** frente a derivados de aminoácidos (Boc-L-Tyr-OEt, Boc-L-His-OMe) y de ácidos nucleicos (DNA de timo de ternero y derivados del ácido 5-deoxiguanilídico (Ishizaki y col., 1982), y encontraron que las posiciones 4 y 6 de la benzoxazinona eran atacadas por los residuos de los aminoácidos, y que **5c** se unía covalentemente a los residuos de guanina del DNA. Demostraron además que **5c** no reaccionaba con los ácidos deoxiadenilico, deoxiacetidilico y timidilico. Por otro lado, Coutts y Pound (1970) informaron que **5a** en presencia de HCl generaba **5d**, lo cual es consistente con estudios de reactividad realizados en ácidos arilhidroxámicos, que establecen que las posiciones orto y para al grupo hidroxámico son las posiciones activas frente a un ataque

nucleofílico (Ohta y col., 1978).

Este conjunto de resultados fué posteriormente racionalizado por Hashimoto y col. (1983) quienes postularon que la primera etapa en las reacciones de sustitución nucleofílica de 5b y 5c era la ruptura del enlace N-O, con formación de un intermediario del tipo ión nitrenio 6a. Este sería estabilizado por el oxígeno heterocíclico que le conferiría carácter de ión oxonio 6b. La eventual participación del oxígeno heterocíclico en la estabilización del ión nitrenio determinaría la posición donde ocurre la sustitución.



De esta forma, estos autores explicaron: a) la falta de reactividad de 5a, ya que el OH es peor grupo saliente que el acetilo; b) la mayor reactividad de 5c en relación a 5b, ya que el metoxilo en posición 7 estabilizaría el ión nitrenio; c) el ataque en la posición 6 del anillo, que se debería a la participación del oxígeno heterocíclico en la estabilización del ión nitrenio. Sugirieron además que la actividad biológica de 1 requeriría de una activación previa del grupo OH hidroxámico para transformarlo en un buen grupo saliente, el cual generaría una especie electrofílica que reaccionaría con nucleófilos de enzimas y de ácidos nucleicos.

Planteamiento del problema. Se ha sugerido que los Hx necesitarían de una derivatización previa del oxígeno-hidroxámico para poder generar una especie electrofílica que de cuenta de su actividad biológica (Hashimoto y col., 1983). Sin embargo, el tautómero de cadena abierta del DIMBOA, 2, es un intermediario muy reactivo frente a nucleófilos debido al grupo aldehído fuertemente electrofílico por efecto inductivo de la función hidroxámica adyacente. También lo es, al igual que el DIMBOA cerrado, frente a reductores, debido a la presencia de un átomo de nitrógeno especialmente electropositivo por efecto atractor de electrones de los grupos electronegativos vecinos a él. En consecuencia, es posible imaginar que la actividad biológica del DIMBOA se deba a su reactividad química intrínseca frente a nucleófilos de enzimas y de otras macromoléculas de importancia biológica, y por tanto no sea necesaria su derivatización previa para explicar sus propiedades biológicas. Los objetivos específicos de esta tesis son: i) demostrar que el DIMBOA y su tautómero de cadena abierta, 2, reaccionan con nucleófilos y reductores, caracterizar las reacciones y sus productos, y demostrar que el DIMBOA reacciona de la misma forma con aminoácidos que posean este tipo de residuos; ii) utilizar enzimas que posean en su sitio catalítico residuos de aminoácidos con las características antes señaladas, con el fin de estudiar la reactividad del DIMBOA hacia nucleófilos en una enzima y libres en solución.

MATERIALES Y METODOS

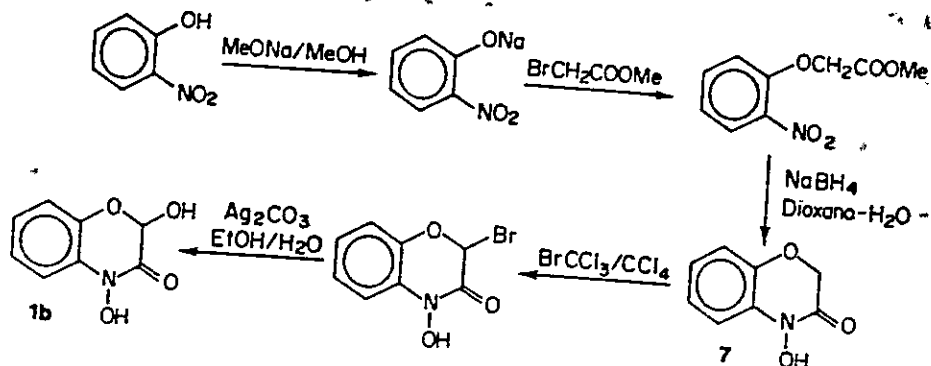
ESTUDIOS FISICOQUIMICOS

Aislamiento del DIMBOA. El DIMBOA fué aislado del extracto etéreo de plántulas de maíz Zea mays L., cv T129s de 6 días, según un método descrito (Queirolo y col., 1983).

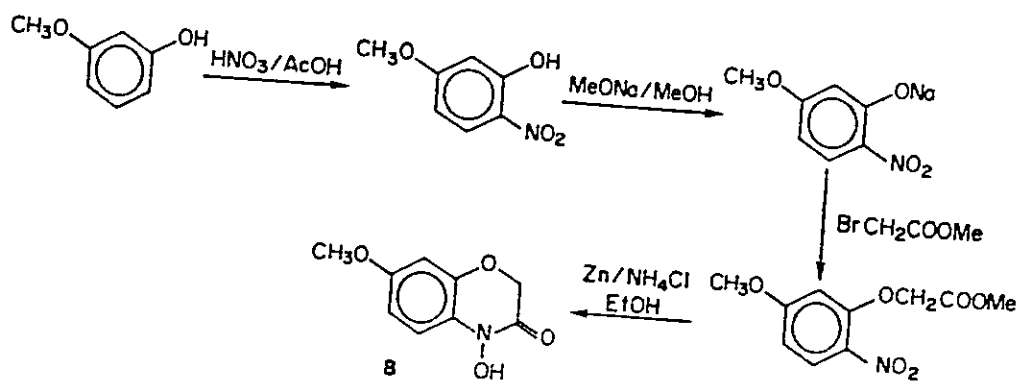
Origen de los reactivos. Los reactivos empleados en las síntesis y reacciones fueron: 3-metoxifenol (Fluka), bromoacetato de metilo (Fluka), etanotiol (Merck), bromotriclorometano (Fluka), borohidruro de sodio (Merck), cinc (Fluka), lisina (Sigma), N- ϵ -acetil-lisina (Sigma), N- α -acetil-lisina (Sigma).

Síntesis de compuestos análogos del DIMBOA. La síntesis de la 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIBOA, 1b), 4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (2-H-DIBOA, 7), y 7-metoxi-4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (2-H-DIMBOA, 8), fueron realizadas utilizando el método general de síntesis de ácidos hidroxámicos descrito por Jernow y Rosen (1975) con leves modificaciones (Esquemas 1, 2 y 3). La lactama del DIMBOA (9), fué sintetizada a partir de 3-metoxi-2-aminofenol, usando la técnica descrita por Honkanen y Virtanen (1960) para la síntesis de la lactama del DIBOA (Esquema 3).

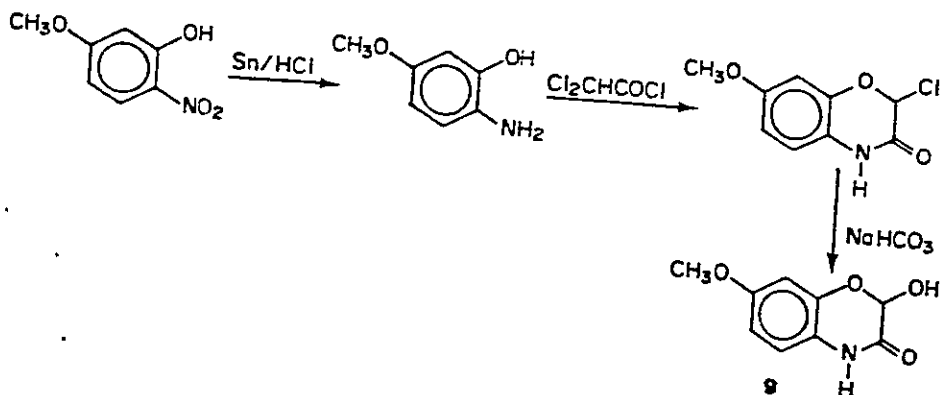
Esquema 1



Esquema 2



Esquema 3



2 - Nitro - 5 - metoxifenol. A una solución de 10 g de 3-metoxifenol en ácido acético glacial enfriada en un baño de hielo con sal, se adicionó desde un embudo de decantación una solución de HNO₃ diluida en ácido acético (1 : 3). Luego de una hora de reacción la mezcla se vertió en hielo, y el producto se destiló por arrastre con vapor de agua. El rendimiento fue 63 %.
Análisis : pf = 91°; nmr (60 MHz, CCl₄, TMS) : 8,6(m, 1H); 6,56(m, 2H); 3,96(s, 3H); a campo bajo 116 aparece la señal del protón del grupo hidroxilo.

2 - Amino - 5 - metoxifenol. Una solución de 2 g de 2 - nitro-5 - metoxifenol en agua fue tratada con Sn / HCl de acuerdo al método descrito por Vogel (1978). El rendimiento del producto de reducción fue 84%. Análisis: nmr (60 MHz, CD₃OD, TMS): 6,2-6,86(m, 3H); 4,86(s, 2H); 3,656(s, 3H); a 116 aparece la señal del grupo hidroxilo.

2 - Nitrofenoxiacetato de metilo. A una solución de 3 g de 2-nitrofenol en 50 ml de metóxido de sodio 0,5 M, MeOH, se adicionó lentamente desde un embudo de decantación 3,2 g de bromoacetato de metilo. La mezcla se dejó reaccionar con agitación magnética durante 16 horas, se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en CHCl₃.

La fase clorofórmica se lavó con agua levemente alcalina (1% de NaOH), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad. El residuo se lavó con éter de petróleo. El rendimiento fue 62%

Análisis: $pf = 84^{\circ}$; nmr (60 MHz, CCl_4 , TMS): 7,8 δ (m, 4H); 4,8 δ (s, 2H); 3,9 δ (s, 3H).

5 - Metoxi - 2 - nitrofenoxiacetato de metilo. La síntesis fué similar a la anterior, salvo que el reactivo inicial fué 2-nitro - 5 - metoxifenol. El rendimiento fué 58%. Análisis: $pf = 95^{\circ}$; nmr (60 MHz, CCl_4 , TMS): 8,1 δ (m, 1H), 7,3 δ (m, 1H); 6,5(m, 1H); 4,8 δ (s, 2H); 3,8 δ (s, 3H); 3,9 δ (s, 3H).

4 - Hidroxi - 1,4 - benzoxazin - 3 - ona (2-H-DIBOA, 7). Una solución de 100 mg de 2 - nitrofenoxiacetato de metilo en 10 ml de dioxano, se adicionó lentamente bajo corriente de nitrógeno a una suspensión acuosa de carbono activado sobre Pd al 2% (5 mg) y $NaBH_4$ (10,3 mg). Una vez terminada la adición se continuó la agitación por 15 min, se filtró, y el filtrado se acidificó con ácido acético diluido. Esta solución se extrajo con Et₂O. El extracto se secó con Na_2SO_4 anhidro y luego se concentró a sequedad. El residuo se recristalizó de una mezcla de dioxano-hexano (5 : 95). El rendimiento fué 68%. Análisis: las características físicas y espectroscópicas de este compuesto se encuentran resumidas en la Tabla 1.

7 - Metoxi - 4 - hidroxi - 1,4 - benzoxazin - 3 - ona (2-H-DIMBOA, 8). A una solución de 2,5 g de 5-metoxi-2-nitrofenoxiacetato de metilo en 180 ml de EtOH, 36 ml de H_2O y 2,2 g de NH_4Cl , se adicionó lentamente Zn en polvo (2,6 g). La

mezcla se dejó reaccionar por 4 hrs a temperatura ambiente con agitación y luego se filtró y se acidificó con HCl 6N hasta pH 2, manteniéndose la agitación por otras 2 hrs. Se extrajo con Et₂O y la fase etérea se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad. El residuo se extrajo en forma continua en un aparato Soxlet con éter de petróleo por 6 hrs. El extracto se concentró y se fraccionó en una columna de Silica - Gel GF₂₅₄, usando como eluyente una mezcla de CHCl₃ : (CH₂)₆CO (40 : 1). Las fracciones fueron analizadas con el reactivo de FeCl₃. Aquellas que dieron un resultado positivo se analizaron por cromatografía en placa (Et₂O : benceno = 4 : 1) observándose en todos los casos una única mancha bajo la lámpara uv. Estas fracciones se juntaron y se analizaron por espectroscopía nmr y espectrometría de masas (ver Tabla 1). El rendimiento fué menor de 10%.

2 - Bromo - 4 - hidroxí - 1,4 - benzoxazin - 3 - ona. Una mezcla de 1 g de 4 - hidroxí - 1,4 - benzoxazin - 3 ona y 1,2 ml de triclorobromometano en 10 ml de CCl₄ se calentó a reflujo con agitación durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado fué concentrado a sequedad. El residuo se recrystalizó en éter de petróleo. El rendimiento fué 25%. El espectro nmr (60 MHz, CCl₄, TMS) del compuesto bromado fué similar al del compuesto inicial, excepto que la señal del protón del C-2 en el compuesto inicial apareció en 4,6δ (s, 2H), mientras que en el producto se encontró desplazada hasta 4,8δ (s, 1H).

2,4 - Dihidroxi - 1,4 - benzoxazin - 3 - ona (DIBOA, 1b). Una mezcla de 100 mg de 2 - bromo - 4 - hidroxi - 1,4 - benzoxazin - 3 - ona y 42 mg de Ag_2CO_3 en 20 ml de Et_2O fué agitada por 3 hrs a temperatura ambiente. Luego se acidificó hasta pH 5, se filtró, y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se recrystalizó en éter de petróleo para dar DIBOA, que fué caracterizado por comparación de su pf, R_f , y espectro uv, con los informados en la literatura (Virtanen y Hietala, 1960).

2- Hidroxi - 7 - metoxi - 1,4 - benzoxazin - 3 - ona (lactama del DIMBOA, 9). A una solución de 1g de 2 - amino - 5 - metoxifenol en 30 ml de tetrahidrofurano seco, se adicionó desde un embudo de decantación 1,14 g de cloruro de dicloroacetilo. La mezcla se dejó reaccionar por 16 horas a temperatura ambiente. Luego se adicionó HCl diluído, la fase orgánica se lavó dos veces con H_2O y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en NaHCO_3 0,2 M y se calentó a reflujo por 30 min. Luego la solución se enfrió, se acidificó, y se extrajo con Et_2O . El extracto etéreo se secó con Na_2SO_4 anhidro, se concentró, y se cristalizó agregando benceno a la solución. El producto (25% de rendimiento) fué caracterizado por su pf, espectro uv, y de masas (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físicas y espectroscópicas del DIMBOA y compuestos análogos.

Compuesto	pf	*uv	*ir	*nmr ¹ H	*nmr ¹³ C	*esp. masas
DIMBOA	145d	262 (4)	3325	3, 8δ (s, 3H)	C-2 = 93	211 (52) M ⁺
		290 (3, 8)	3150	5, 7δ (s, 1H)	C-3 = 157	195 (19)
			2950	6, 8-7, 4δ	C-5 = 114	165 (100)
			1670	(m, 3H)	C-6 = 108	154 (19)
			1610		C-7 = 156	150 (52)
					C-8 = 104	138 (49)
					C-9 = 122	110 (62)
				C-10 = 142		
DIBOA	152d	255 (3, 9)				
		282 (3, 7)				
Lactama de DIMBOA	189°	256 (4)	3150	3, 7δ (s, 3H)	C-2 = 91	195 (42) M ⁺
		282 (3, 8)	1680	5, 5δ (s, 1H)	C-3 = 162	166 (100)
			1510	6, 6-6, 9δ	C-5 = 116	150 (13)
			1160	(m, 3H)	C-6 = 108	138 (25)
			1030	8δ (s, 1H)	C-7 = 156	124 (40)
				10, 7δ (s, 1H)	C-8 = 104	110 (46)
				C-9 = 120		
				C-10 = 142		
2-H- DIBOA	204°	257 (3, 8)		4, 6δ (s, 2H)	C-2 = 68	165 (85) M ⁺
		286 (3, 6)		7, 5δ (m, 4H)	C-3 = 160	120 (100)
				9, 9δ (s, 1H)	C-5 = 123	106 (10)
					C-6 = 116	93 (50)
					C-7 = 124	78 (31)
					C-8 = 113	65 (88)
				C-9 = 130		
				C-10 = 144		
2-H- DIMBOA		267		3, 3δ (s, 3H)		195 (8) M ⁺
		290		4, 3δ (s, 2H)		179 (73)
				6, 2-6, 9δ		167 (23)
				(m, 3H)		165 (27)
						149 (100)
					136 (48)	

a: espectros uv tomados en EtOH (nm, log ε)

b: espectros ir KBr (cm⁻¹)

c: espectros nmr 60 MHz, DIMBOA, lactama de DIMBOA, 2-H-DIMBOA tomados en acetona-d₆, y 2-H-DIBOA en CCl₄ con TMS, (δ)

d: espectros de ¹³C 20,15 MHz tomados en DMSO-d₆ (ppm)

e: espectros de masas de impacto electrónico, con

introducción directa, 70 ev (m/e, intensidad relativa)

DIMBOA: espectros uv, ir, nmr ¹H y de masas (Woodward y col., 1978), espectro nmr ¹³C (Ioannou y col., 1980)

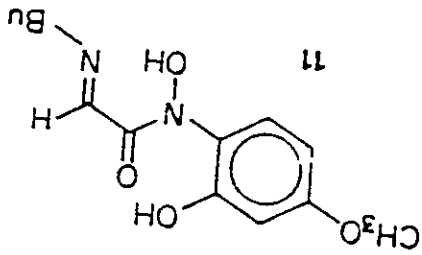
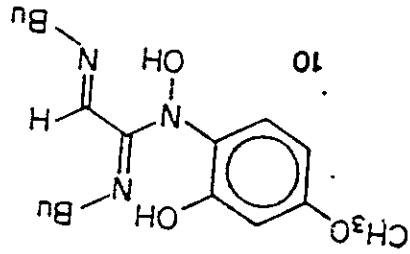
lactama de DIMBOA: (Nagao y col., 1985)

Descripción de las cinéticas.

Las cinéticas de reacción del DIMBOA fueron estudiadas por dos métodos. El primero se fundamenta en la propiedad de los ácidos hidroxámicos de formar con FeCl_3 complejos coloreados con un máximo de absorción en 590 nm ($\epsilon = 1.600 \cdot 1/\text{mol cm}$) (Hamilton, 1964). Este método fue utilizado en el estudio cinético de las reacciones del DIMBOA con distintos aminoácidos (Niemeyer y col., 1982b). El segundo método se fundamenta en la presencia en el DIMBOA de un cromóforo con un máximo de absorbancia en 290 nm ($\epsilon = 10.100 \cdot 1/\text{mol cm}$). Este segundo método, por ser más sensible que el anterior, se utilizó en la mayor parte de los estudios cinéticos de las reacciones del DIMBOA con tioles y con aminas (Pérez y Niemeyer, 1985).

Reacción del DIMBOA con etanotiol. Se disolvió el DIMBOA (200 mg) en tampón fosfato 50 mM pH 8, y se dejó reaccionar en una ampolla cerrada a 45° por 24 hrs con un exceso de 15 veces de etanotiol. La mezcla de reacción fue extraída con Et_2O , separada por cromatografía en placa fina y analizada por espectroscopía uv, ir, y espectrometría de masas (Niemeyer y col., 1982b).

Experimento de resonancia de espín electrónico. El espectro ESR de una solución de DIMBOA 0,02M y ME 1M en borato 0,1 M pH 8, fue tomado en un espectrómetro Varian V 4502. Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente con $H_0 = 3340$ Gauss y $\nu_0 = 9,5 \times 10^9$ Hz.



Determinaciones de pKa.

Estos parámetros fueron determinados espectroscópicamente según un método descrito (Albert y Serjeant, 1984). El primer pKa del DIMBOA y del DIBOA fueron determinados a 44°, ya que a esa temperatura se realizaron los estudios de reactividad relativa con la cisteína (Pérez, y Niemeyer, 1985). Los pKa de 2-H-DIBOA (7) y de 2-H-DIMBOA (8) fueron determinados a 28°.

Reacción del DIMBOA con la butilamina. Una mezcla de DIMBOA con butilamina (1 : 100) se dejó reaccionar en EtOH a temperatura ambiente por 16 horas. Luego se concentró, y la mezcla fue separada por cromatografía en placa (benceno : Et₂O : CHCl₃ = 1 : 1 : 1) obteniéndose dos productos, MBDA, que fue caracterizado por comparación de su R_f y espectro uv con el del compuesto puro, y el compuesto 10 (rendimiento 53%), que fue caracterizado por sus espectros uv, ir, ¹H nmr, y de masas.

El espectro uv de 10 presenta un máximo de absorción en 340 nm ($\epsilon = 10,900 \text{ l/mol cm}$) característico de grupos imino (Dudek y Dudek, 1971). Cuando el compuesto 10 se redujo con NaBH₄, la absorción en 340 nm desapareció, indicando la reducción del

grupo imino. El espectro ir (KBr, cm^{-1}): 3300, 2950, 1570 y 1470, no presentó absorciones para grupos carbonilo, y las absorciones en 1570 y 1470 son características del grupo imino (Silverstein y col., 1974). El espectro nmr (60 MHz, CCl_4 , TMS), 1,06(m, 6H); 1,66 (m, 12H); 5,26(s, 3H); 5,9-6,96(m, 3H). El espectro de masas (impacto electrónico, introducción directa, 70 ev: m/e (intensidad relativa)): 321 (18) M+; 320 (20) M-H; 278 (35) M-C₂H₄, es consistente con la estructura propuesta. En estas condiciones experimentales no se detectó el compuesto 11.

ESTUDIOS ENZIMATICOS

Origen de la papaina y de los reactivos.

La papaina (dos veces recristalizada), el éster p-nitrofenilico de la N-carbobenciloxiglicina (N-CRZ), el éster etilico de N-benzil-L-arginina (BAEE), el ácido 5,5'-diticbis - 2 nitrobenzoico (DTNB), el ditiotreitol (DTT), y la N-benzilglicina (BG), fueron adquiridos en Sigma. El éster etilico de la N-benzilglicina (BGEE) fue preparado por esterificación de la BG.

Activación de la papaina.

La papaina fue activada por incubación a 30° por 30 min en una solución de tampón acetato (0,05 M; pH 5,2), cisteína 0,02 M, y EDTA 0,001 M. La papaina activa fue filtrada en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo tampón sin cisteína, con el objeto de eliminar el exceso del activador. La concentración de la papaina fue calculada a partir

del coeficiente de extinción - mojar a 278 nm, ($\epsilon = 52.000 \text{ l/mol cm}^2$), y un peso molecular de 23.700 D (Glazer y Smith, 1971). La papaína activa dió un título de tici entre 0,5 y 0,6 moles de SH / mol de proteína, medido por el método de Ellman (1959). Este valor concuerda con valores informados en la literatura (Jolley y Yankeelov, 1972).

Ensayo enzimático. La actividad hidrolítica de la papaína fue medida a 28° usando N-CBZ como sustrato, en tampón acetato 0,05 M pH 5,2. Se midió el incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la liberación de p - nitrofenol (Kirsch e Ingelstrom, 1966). La solución de sustrato 0,02 M fue preparada diariamente en acetónitrilo de calidad espectroscópica. La concentración de acetónitrilo en la mezcla de ensayo fue de 3%. La hidrólisis enzimática del sustrato fue considerada usando sustrato en la celda de referencia.

Inactivación de la papaína por el DIMBOA. Las reacciones de inactivación fueron estudiadas en condiciones de pseudo - primer orden, en presencia de exceso de DIMBOA, tomando alícuotas de la mezcla de reacción a intervalos apropiados de tiempo, y midiendo la disminución de la actividad enzimática por el procedimiento previamente descrito. La dilución de las alícuotas para el ensayo enzimático fue de a lo menos 20 veces.

Titulación del grupo sulfhidrilo de la papaína. De una mezcla de

reacción de 1 ml que contenía papaína 1×10^{-4} M activada y filtrada por Sephadex, DIMBOA 1×10^{-4} M, y tampón acetato $0,05$ M pH 5, se tomaron alícuotas de $0,1$ ml a diferentes intervalos de tiempo y se diluyeron con $0,7$ ml de tampón Tris - HCl $0,1$ M, pH 8. Previo a la adición del reactivo de tinció DTNB, fue necesario filtrar cada alícuota a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo tampón Tris, ya que se encontró que el DIMBOA reaccionaba con el DTNB. En cada una de las alícuotas filtradas se determinó la concentración de proteína, y se adicionó DTNB ($0,1$ ml $0,001$ M) leyéndose, luego de 5 min, la absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 13.600$ l/mol cm). A los mismos intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 10 μ l y se midió la actividad enzimática por el procedimiento ya descrito.

Análisis de aminoácidos.

Una solución de 1 ml de papaína activada ($12,5$ mg) se filtró en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato $0,05$ M pH 6,8 y se separó en dos fracciones de $0,5$ ml. A la primera fracción se adicionaron 10 μ l de una solución $0,107$ M de ácido yodacético, y a la segunda 5 μ l de una solución $0,5$ M de DIMBOA en DMSO. Ambas fracciones fueron incubadas por 2 hr a 28° . Después de este período de incubación ambas fracciones no poseían actividad enzimática. Se filtraron ambas fracciones en una columna de Sephadex G-25, con el objeto de eliminar el exceso de inactivadores. A la fracción incubada con DIMBOA se adicionó ácido yodacético en la misma

que a la primera fracción, y se repitió la filtración. Luego las proteínas de ambas fracciones fueron hidrólizadas con HCl 6N a 110° por 20 hr, y sometidas a análisis de aminoácidos.

Reversión por DTT de la inactivación de la papaína por el DIMBOA.

Una solución de 1 ml de papaína de actividad específica 8,9 $\mu\text{moles/min mg proteína}$ en tampón fosfato 50 mM, pH 6,8, fue inactivada con 20 μl de una solución 0,5 M de DIMBOA en DMSO. Una vez que la enzima perdió totalmente su actividad, fue filtrada a través de Sephadex G-25 con el objeto de eliminar el exceso de DIMBOA. Posteriormente se adicionó DTT en concentraciones que fluctuaron entre 0,025 y 5 mM y se estudió la cinética de recuperación de la actividad enzimática a cada una de las concentraciones.

Productos de la reacción de la papaína con el DIMBOA. Los productos de la reacción de una mezcla estequiométrica de papaína activa y DIMBOA, y de ME y DIMBOA, fueron analizados por cromatografía líquida de alta presión, usando un detector uv de longitud de onda fija (254 nm), y una columna de sílica de fase reversa RP-C₁₈ (3 mm x 20 cm). El solvente utilizado fue H₂O : MeOH (9:1), con una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. En estas condiciones, los tiempos de retención fueron : MBOA (1,4 min), DIMBOA (1,9 min), lactama 9 (4,5 min), y disulfuro del mercaptacetanal (5,6 min).

RESULTADOS

ESTUDIOS FISICOQUIMICOS

Reacción del DIMBOA con aminoácidos. Se exploró la posible reactividad del DIMBOA frente a aminoácidos de diferentes características químicas, siguiendo la cinética de descomposición del DIMBOA en presencia de ellos (Tabla 2). Se encontró que el DIMBOA se descomponía más rápidamente en presencia de cisteína.

Tabla 2. Reactividad del DIMBOA frente a aminoácidos*

Aminoácido	$k_{obs} \times 10^2$ (min^{-1})
ninguno	5,7 + 0,41
DL-Serina	5,5
L-Histidina	5,2
DL-Alanina	5,4
L-Hidroxi prolina	6,2'
L-Cisteína	46,7
L-Lisina	5,8
L-Arginina*	--

- * Las condiciones fueron: (Aminoácido) = 71,1 mM; (DIMBOA) = 4,7 mM; temperatura = 31°; pH = 8, tampón fosfato.
- * La reacción con arginina no se pudo analizar por este método debido a la formación de compuestos que interferían en la medición.
- * Las desviaciones estandard de las cinéticas en presencia de aa no fueron calculadas, pues se realizó sólo una por aa.

Reacción del DIMBOA con tioles. Las cinéticas de desaparición de la función hidroxámica desde soluciones de DIMBOA (4,7 mM) en tampón fosfato (50 mM, pH 8) en presencia de los tioles cisteína (Cys), mercaptoetanol (ME) y ditioneitol (DTT) fueron seguidas colorimétricamente con FeCl_3 . Se obtuvieron gráficos de primer orden en todos los casos, a lo menos hasta dos periodos de semi-desaparición, con constantes de velocidad proporcionales a las concentraciones de los tioles (Fig. 1). De las pendientes de

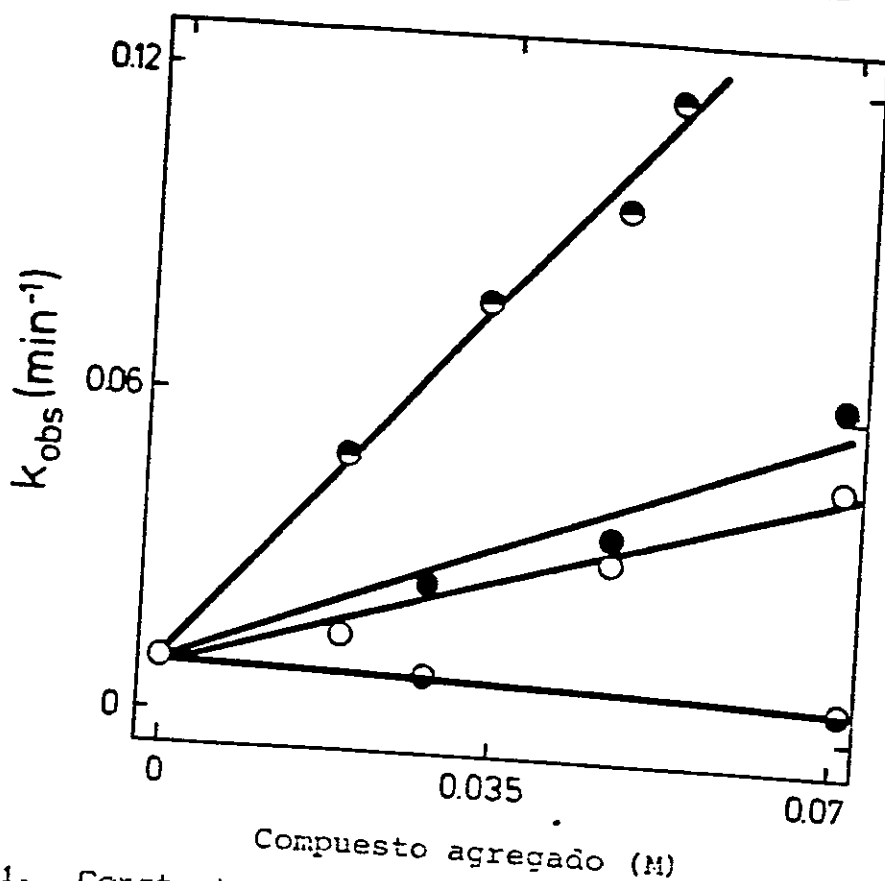
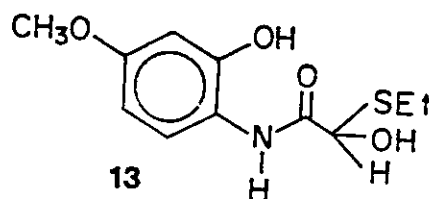
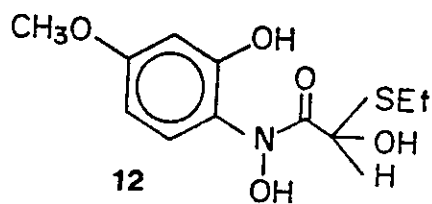


Fig 1. Constantes de velocidad de pseudo-primer orden para la desaparición de la función hidroxámica desde soluciones de DIMBOA (4,7mM) en presencia de DTT (●), ME (●) y Cys (○) en tampón fosfato 50 mM, pH 8 y 28°. La intersección con el eje de las ordenadas corresponde a la constante de velocidad para la descomposición espontánea del DIMBOA. La alanina (●) se usó para comprobar que los grupos NH_2 y COOH de un aminoácido no alteraba significativamente la velocidad observada.

estos gráficos se obtuvieron las constantes aparentes de segundo orden para las reacciones del DIMBOA con cisteína ($0,54 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$), ME ($0,73 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y DTT ($0,98 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$), este último valor corregido por la presencia de dos grupos sulfhidrilo.

Reacción del DIMBOA con etanotiol. Con el objeto de estudiar los productos de la reacción del DIMBOA con tioles se eligió el etanotiol, por ser éste un tiol de estructura simple. Su volatilidad impidió realizar estudios cinéticos en las mismas condiciones realizadas con los tioles anteriores. De la mezcla de reacción se aislaron los productos 9, 12, y 13, que fueron analizados por espectroscopia uv, ir, y espectrometría de masas (Niemeyer y col., 1982b).



Estos compuestos presentaron espectros uv similares al de DIMBOA, sugiriendo la presencia de cromóforos semejantes. Los espectros uv e ir obtenidos del compuesto 9 fueron idénticos a los informados en la literatura para la lactama del DIMBOA (Tipton y col., 1967). La estructura fué además confirmada por síntesis independiente del compuesto (ver Materiales y Métodos). El análisis de los espectros de masas obtenidos para estos compuestos indican que tanto los iones moleculares como los

patrones de fragmentación, son consistentes con las estructuras propuestas (Niemeyer y col., 1982b).

Efecto del pH sobre la reacción. La reacción del DIMBOA con tioles fué estudiada entre pH 5 y 12 a través de los cambios espectrales observados en la región entre 240 y 310 nm. En este intervalo de pH, el producto principal en todos los casos fué la lactamã 9.

Análisis espectroscópico. A valores de pH alrededor de 8, el espectro inicial de la mezcla de reacción era el del DIMBOA disociado con λ_{max} en 290 nm. A medida que la reacción transcurría, esta absorción desaparecía gradualmente y una absorción a 259 nm, correspondiente a la lactama 9, aumentaba gradualmente, obteniéndose un punto isosbético en 271 nm. A valores de pH bajo 6, el espectro inicial de la mezcla de reacción era el del DIMBOA sin disociar con un λ_{max} en 263 nm y otro en 286 nm, de tal forma que la absorción del producto en 259 nm quedaba parcialmente oculta por los reaccionantes. A valores de pH sobre 9, el anión tiolato, que absorbe fuertemente bajo los 280 nm (Friedman, 1973), ocultaba la absorción del producto. Si esta solución se acidificaba hasta pH 8 una vez terminada la reacción, se revelaba la absorción del producto en 259 nm.

En consecuencia, en todos los casos la cinética de la reacción fué seguida a 290 nm, longitud de onda en la cual el

producto 9 presenta una absorción despreciable. Alrededor de pH 8 la reacción también pudo ser seguida en forma equivalente en 259 nm.

Análisis cinético. Las cinéticas de reacción del DIMBOA frente a un exceso de tiol fueron de pseudo-primer orden en todo el intervalo de pH estudiado. La ley de velocidad para la reacción estuvo dada por la ecuación 1 :

$$-d(DH_2)_t / dt = k_{obs} (DH_2)_t = k_1 (DH_2)_t + k_2 (DH_2)_t (RSH)_t \quad (1)$$

donde DH_2 representa al DIMBOA como un ácido diprótico y RSH representa un tiol; los k_1 son las constantes de velocidad para la descomposición dependiente del pH del DIMBOA (Niemeyer y col., 1982a) y los k_2 son las constantes aparentes de segundo orden para la reacción del DIMBOA con tioles. Estas fueron determinadas de las pendientes de gráficos k_{obs} vs concentración de tiol (Fig. 2).

La variación de las constantes aparentes de segundo orden con el pH, a una concentración dada de tiol, están representadas en la Fig 3. La curva tiene un máximo a pH 8,3 para la reacción con ME, y a 6,7 para la reacción con el éster metílico de la cisteína (Cys-Me).

Las distribuciones de las especies presentes en soluciones de DIMBOA + ME y DIMBOA + Cys-Me fueron calculadas usando valores de pK_a de la literatura (Friedman, 1973). Los productos

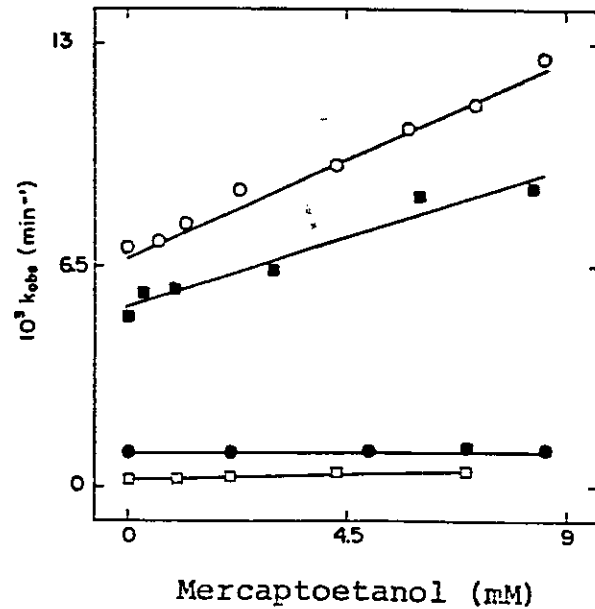


Fig. 2. Variación de la constante observada de pseudo-primer orden para la reacción del DIMBOA (0,08mM) con ME, con la concentración de ME a pH 5,0 (□); 12,1 (●); 7,2 (■); 8,1 (○), a 28°.

$(DH_2)(RS^-)$ y $(DH^-)(RSH)$ variaron con el pH de la misma forma que la curva experimental de la Fig. 3. En consecuencia, fué posible establecer las siguientes identidades, donde los subíndices "e" indican concentraciones efectivas, k_2 representa la constante verdadera de segundo orden independiente del pH, k^{app}_2 la constante de segundo orden aparente dependiente del pH, y f las fracciones molares.

$$k^{app}_2 (DH_2)_e (RSH)_e = k_2 (DH_2)_e (RS^-)_e \quad \text{o} \quad k_2 (DH^-)_e (RSH)_e \quad (2)$$

$$k_2 = k^{app}_2 / f_{DH_2} f_{RS^-} \quad \text{o} \quad k^{app}_2 / f_{DH^-} f_{RSH} \quad (3)$$

$$k_2 = k^{app}_2 \left(\frac{(H^+)^2 + K_1 (H^+) + K_1 K_2}{(H^+)^2} \right) \left(\frac{(H^+) + K_2}{K_2} \right) \quad (4)$$

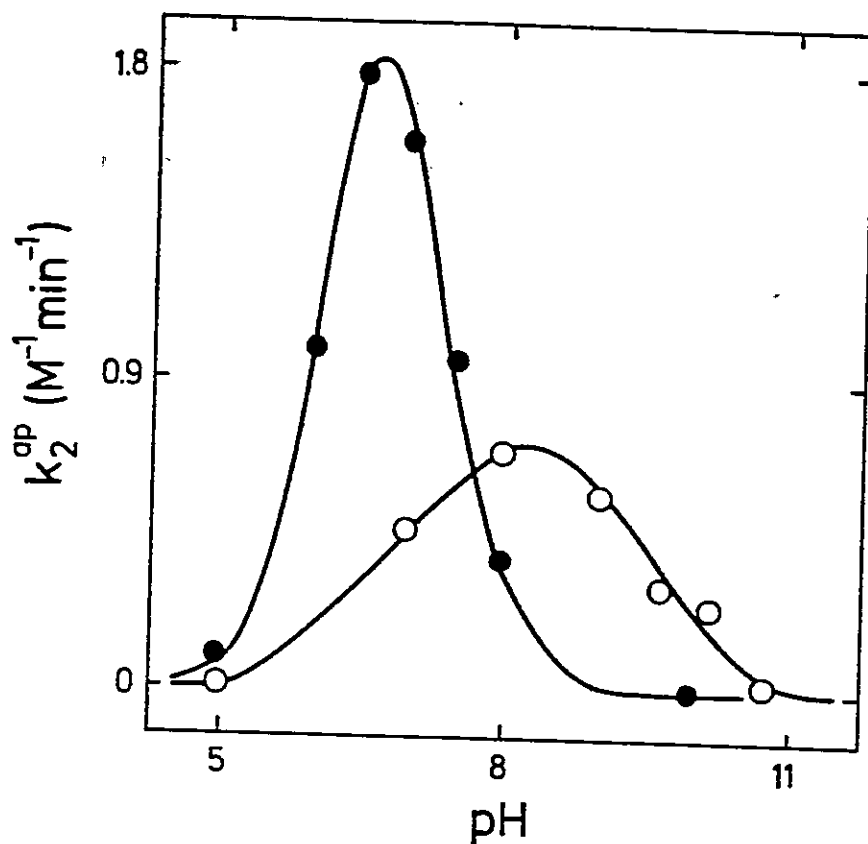


Fig. 3. Variación con el pH de la constante de velocidad aparente de segundo orden para la reacción del DIMBOA 0,08 mM con mercaptoetanol 8mM (○), o con el éster metílico de la cisteína 8mM (●) a 28°. Los valores de k_2^{app} fueron determinados de la pendiente de un gráfico de k_2^{app} vs. concentración de tiol (ver Fig. 2). Las curvas dibujadas corresponden al ajuste de cuadrados mínimos de los valores experimentales a la ecuación 4.

Los valores de las constantes verdaderas de segundo orden k_2 , fueron determinadas para la reacción del DIMBOA con diversos tioles. Para ME y Cys-Me, los valores de k_2 fueron obtenidos por un ajuste de cuadrados mínimos de los puntos experimentales presentados en la Fig. 3, a la ecuación 4. Para cisteína, DTT, ácido tioláctico y ácido mercaptoacético, los valores de k_2 se obtuvieron a partir de la ecuación 4 usando sólo un punto

experimental. Al graficar el logaritmo de la constante verdadera de segundo orden para la reacción del DIMBOA con tioles vs. los pK_a de los distintos tioles (Friedman, 1973) se obtuvo una correlación lineal de Bronsted (Fig. 4), que indica que las especies reactivas en solución son el DIMBOA sin disociar y el anión tiolato.

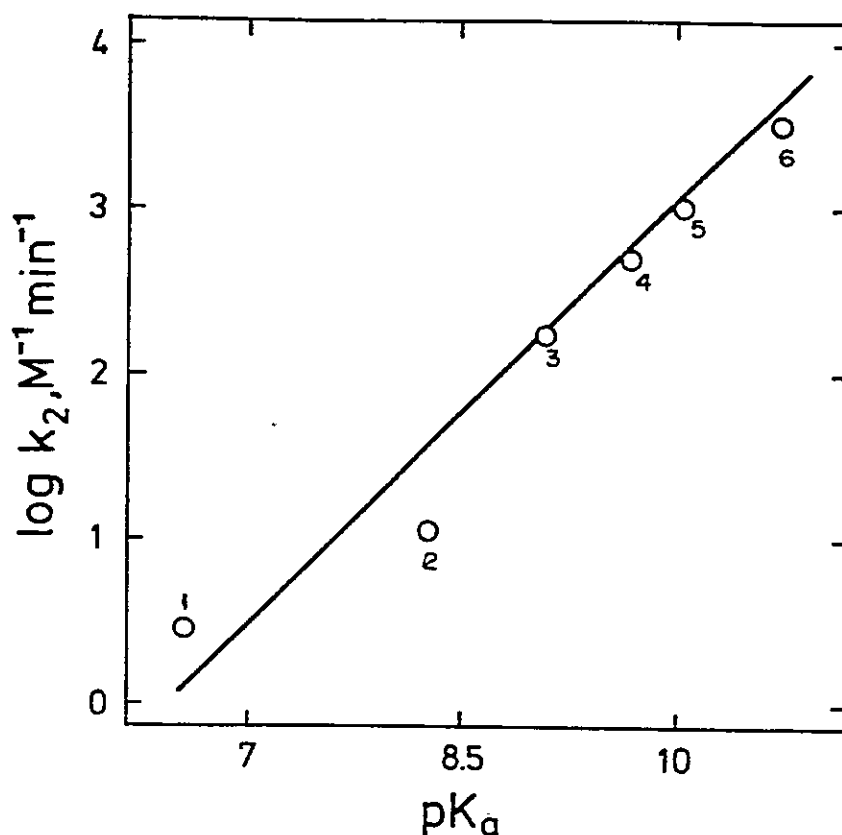


Fig.4. Variación del logaritmo de la constante verdadera de segundo orden para la reacción del DIMBOA con tioles, con el pK_a del tiol. La constante verdadera de segundo orden, k_2 , para cada tiol fué determinada a partir de la ecuación 4, donde $K_1 = 1.25 \times 10^{-7}$ y $K_2 = 1.26 \times 10^{-11}$ son las constantes de disociación del DIMBOA (Niemeyer y col., 1982a) y K_3 la constante de disociación del tiol. Los tioles usados fueron cisteína metil éster (1), cisteína (2), DTT (3), ME (4), ácido tioláctico (5), ácido mercaptoacético (6)

Efecto del grupo metoxilo del DIMBOA. Con el fin de poder realizar estudios de reactividad comparada entre el DIMBOA y su análogo demetoxilado DIBOA 1b, se determinaron los pKa del DIMBOA ($6,74 \pm 0,05$) y del DIBOA ($6,79 \pm 0,04$). La similitud de estos valores permite suponer que la reactividad relativa de ambos ácidos hidroxámicos (constantes verdaderas de segundo orden, k_2) son directamente comparables a través de las constantes aparentes de segundo orden, a cualquier pH. Un gráfico de k_{obs} vs. concentración de cisteína (Fig. 5) muestra la influencia del grupo metoxilo del DIMBOA sobre su reactividad hacia tioles.

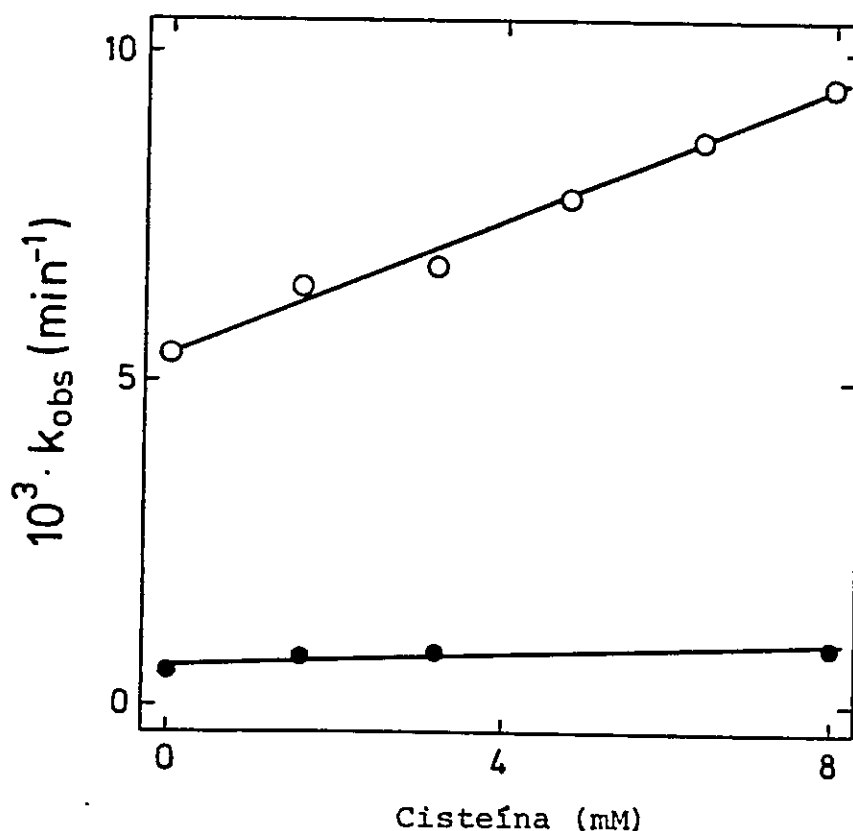


Fig. 5. Variación de la constante de velocidad observada para la reacción del DIMBOA 0,08 mM (○) y del DIBOA 0,08 mM (●), con la cisteína en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5 a 44°.

Estudios de resonancia de espín electrónico. Con el objeto de analizar la posibilidad de que la reacción del DIMBOA con tioles ocurriera vía radicales libres, una solución de DIMBOA (0,02 M) y ME (1 M) en tampón borato 0,1 M pH 8, fué sometida a análisis. No se detectó señal en el ESR durante la reacción, lo que sugiere el predominio de una vía heterolítica.

Reacción del DIMBOA con aminas. El tautómero de cadena abierta del DIMBOA, 2, puede reaccionar con nucleófilos no reductores a través del grupo aldehído. Esta posibilidad fué explorada estudiando la reacción del DIMBOA con aminas primarias, como butilamina y lisina, en soluciones etanólicas y acuosas.

La cinética de la reacción del DIMBOA con estas aminas fué estudiada espectrofotométricamente en la región entre 240 y 400 nm. A medida que la reacción transcurría, se observó la desaparición del cromóforo del DIMBOA a 290 nm, y la aparición de un nuevo cromóforo en 340 nm, produciéndose un punto isosbético en 317 nm. Una vez terminada la cinética, la mezcla de reacción fué tratada con NaBH_4 , y se observó la desaparición del cromóforo en 340 nm junto con la reaparición del cromóforo en 290 nm (ver Materiales y Métodos).

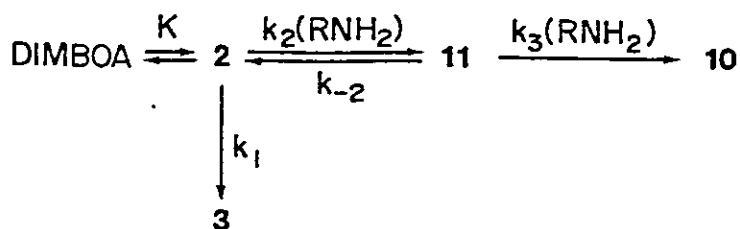
Reacción del DIMBOA con la butilamina. Se eligió para un estudio más acabado la reacción del DIMBOA con la butilamina ya que ésta es una amina simple, de baja volatilidad y suficiente solubilidad.

Productos de la reacción. Se hizo reaccionar el DIMBOA con la butilamina en proporción 1:100 en etanol. De la mezcla de reacción se aislaron dos productos: MBOA 3, que es el producto de descomposición del DIMBOA (Bravo y Niemeyer, 1985), y el compuesto 10, que fué caracterizado por espectroscopía uv e ir, nmr de protones, y espectrometría de masas. No fué posible detectar el compuesto 11.

Análisis cinético. El análisis de productos de la reacción entre el DIMBOA y la butilamina demostró que el producto aislado, 10, proviene del ataque nucleofílico de la amina a los dos grupos carbonilo del tautómero de cadena abierta del DIMBOA, 2. En consecuencia, fué de interés analizar el orden de esta reacción con respecto a la amina. Se estudió la cinética de la reacción en condiciones de pseudo-primer orden a distintas concentraciones de butilamina. Se encontró que la constante observada variaba linealmente con la concentración de amina (Fig. 6), lo que demostró que la reacción es de primer orden con respecto a la amina.

La reacción entre el DIMBOA y la butilamina puede ser representada por el esquema 4. Si en este modelo cinético

Esquema 4



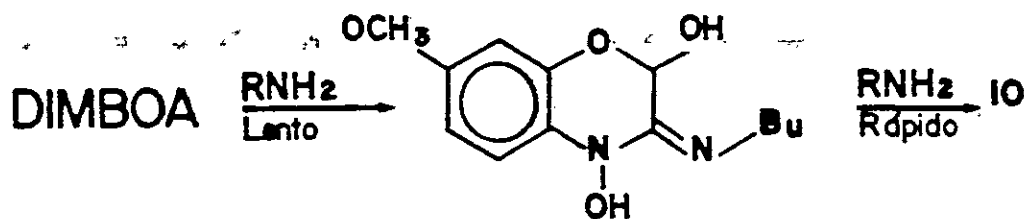
se supone que 11 se encuentra en baja concentración (no fue detectado experimentalmente) en estado estacionario, y que la formación de 10 es la etapa lenta de la reacción (la reacción entre un aldehído reactivo y una amina es una reacción de equilibrio rápido (Martin, 1964), la expresión de velocidad para la formación de 10 queda definida por la ecuación 5. Si $k_2 \gg k_{-2}$, esta ecuación se reduce a la ecuación 6.

$$v = \frac{d(10)}{d(t)} = \frac{k_2 k_3 K(\text{DIMBOA}) (\text{RNH}_2)^2}{k_{-2} + k_2 (\text{RNH}_2)} \quad (5)$$

$$v = \frac{d(11)}{d(t)} = k_2 K(\text{DIMBOA}) (\text{RNH}_2) \quad (6)$$

En condiciones de pseudo-primer orden, en que $(\text{RNH}_2) \gg (\text{DIMBOA})$ la velocidad toma la forma $v = k_{obs} (\text{DIMBOA})$, y $k_{obs} = k_2 K (\text{RNH}_2)$. En consecuencia, la pendiente del gráfico de la Fig. 6 representa la constante de segundo orden para la reacción entre el DIMBOA y la butilamina multiplicada por la constante de equilibrio para la apertura del hemiacetal del DIMBOA, y la intersección de dicho gráfico representa la descomposición del DIMBOA en etanol ($k = 9,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$). Este valor sería algo más alto que el valor determinado experimentalmente para la descomposición del DIMBOA en etanol ($k = 3,2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) debido a la asociación ácido-base entre el DIMBOA y la butilamina, que aumenta la reactividad del oxígeno hidroxámico.

Otro mecanismo que daría cuenta de los resultados cinéticos



se descartó ya que el compuesto 8 no reaccionó con aminas.

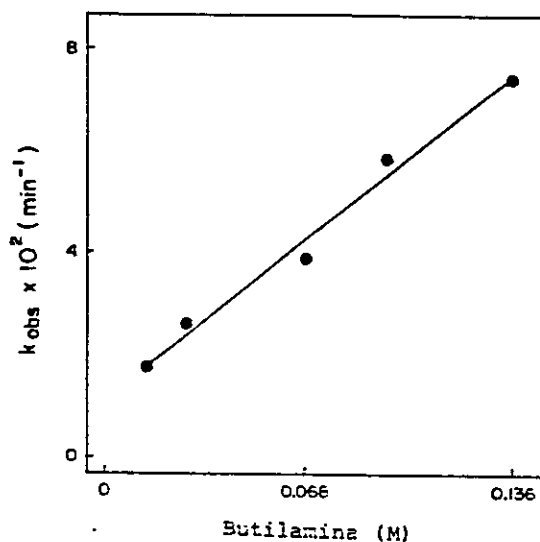


Fig. 6. Variación de la constante de velocidad observada para la reacción del DIMBOA con la butilamina en etanol, con la concentración de la amina. El valor de la constante de segundo orden determinada de la pendiente de este gráfico fué $0,49 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$, y el valor de la constante de velocidad para la descomposición espontánea del DIMBOA en etanol determinada de la intersección de este gráfico fué $9,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

Efecto del pH sobre la reacción del DIMBOA con aminas. Los estudios del efecto del pH sobre la reacción del DIMBOA con aminas fueron realizados con la lisina, debido a que es un aminoácido de importancia en el proceso de catálisis de muchas enzimas. La desaparición del DIMBOA en presencia de un exceso de lisina (100:1) fué seguida espectrofotométricamente en la región

entre 240 y 400 nm. Las cinéticas fueron de pseudo-primer orden en el rango de pH estudiado (pH 7 a 12). La ley de velocidad está dada por la ecuación 7, donde DH_2 representa al DIMBOA, los subíndices "t" indican concentraciones totales, los k_1 son las constantes de primer orden para la descomposición espontánea del DIMBOA a los distintos pH, y los k^{ap}_2 son las constantes aparentes de segundo orden para la reacción del DIMBOA con la lisina, que en este caso incluyen la constante de equilibrio entre el DIMBOA y la especie 2.

$$-\frac{d(DH_2)}{d(t)} = k_{obs}(DH_2)_t = k_1(DH_2)_t + k^{ap}_2(DH_2)_t(RNH_2)_t \quad (7)$$

Conociendo los valores de los k_1 a los distintos pH, es posible determinar los valores de los k^{ap}_2 . Cuando estas constantes fueron graficadas en función del pH (Fig. 7), se obtuvo una curva tipo campana con un máximo en pH 10,8. A pH \leq 8,5 el valor de k_{obs} fué igual al valor de k_1 , indicando que el DIMBOA no reacciona con la lisina a esos pH ($k^{ap}_2 = 0$). DIMBOA es un ácido diprótico, por lo que la constante de velocidad aparente de segundo orden puede descomponerse en la siguiente expresión :

$$k^{ap}_2 = k_a(DH_2)(RNH_2) + k_b(DH^-)(RNH_2) + k_c(D^{--})(RNH_2) \quad (8)$$

El ajuste a la ecuación 8 de los puntos experimentales de k^{ap}_2 a los distintos pH, se logró cuando se usó en el cálculo de

la distribución de especies los pKa del DIMBOA y el pKa del grupo ϵ -amino de la lisina. Este resultado sugiere que el DIMBOA sólo reacciona con el grupo ϵ -amino de la lisina. Esto fué comprobado estudiando la reacción del DIMBOA con N- α -acetil-lisina a pH $>$ 8,5, que genera una curva similar a la de la lisina (Fig. 7).

Efecto del borato sobre la reacción entre el DIMBOA y la lisina. El borato cataliza la descomposición del DIMBOA a través de la formación de un complejo con el tautómero de cadena abierta del DIMBOA, 2. Este complejo catalizaría la reacción de

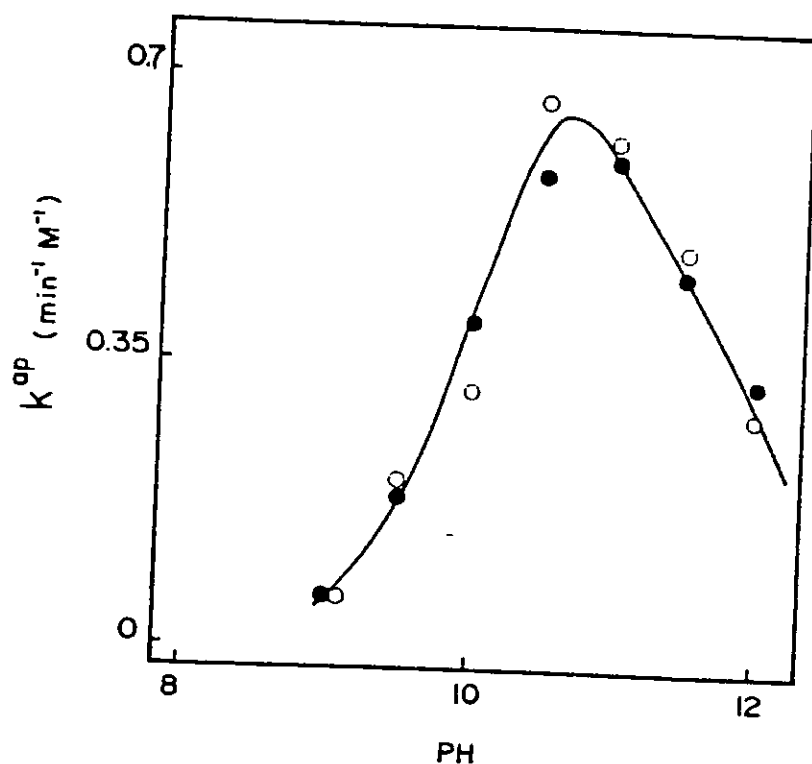


Fig. 7. Efecto del pH sobre la constante aparente de segundo orden para la reacción del DIMBOA con lisina (●) y con N- α -acetil-lisina (○). Los valores de k^{ap} , para cada pH fueron determinados a partir de la ecuación 7. La curva representa el ajuste de los puntos experimentales a la ecuación 8.

descomposición del DIMBOA ya sea desplazando el equilibrio del DIMBOA hacia su tautómero de cadena abierta, o aumentando la polarización del carbonilo aldehídico del DIMBOA abierto (Pérez y Niemeyer, 1986).

La velocidad de la reacción entre el DIMBOA y la lisina en presencia de 50 mM borato fué estudiada a distintos pH en función de la concentración de lisina (Fig. 8). En todos los pH estudiados la constante de velocidad observada varió linealmente con la concentración de la lisina, indicando que la reacción es de primer orden con respecto a ésta. De las pendientes del gráfico de la Fig. 8 se determinó la constante de velocidad

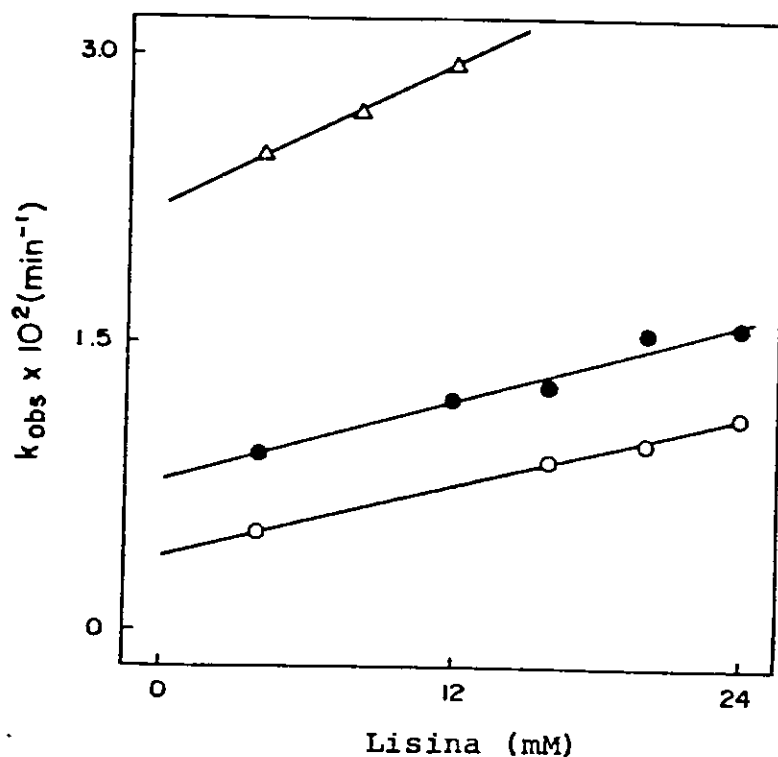


Fig. 8. Variación de la constante observada de pseudo-primer orden para la reacción del DIMBOA 0,08 mM con lisina, con la concentración de lisina a pH 7,5 (●); 8,5 (Δ); 11 (○).

aparente de segundo orden. Al graficar estas constantes en función del pH (Fig. 9) se obtuvo una curva más compleja que en ausencia de borato. Además, en presencia de borato el DIMBOA reacciona con la lisina hasta valores de pH más bajos que en ausencia de borato. Los datos sugieren que en estas condiciones reacciona el grupo α -amino de la lisina. Para comprobarlo, se hizo reaccionar el DIMBOA con N- ϵ -acetil-lisina en presencia de 50 mM borato entre pH 7 y 12. Al graficar la constante aparente de segundo orden en función del pH se obtuvo una curva tipo campana con un máximo centrado en pH 8,5 (Fig. 10), que indica que en presencia de borato, el grupo α -amino de la lisina reacciona con el DIMBOA.

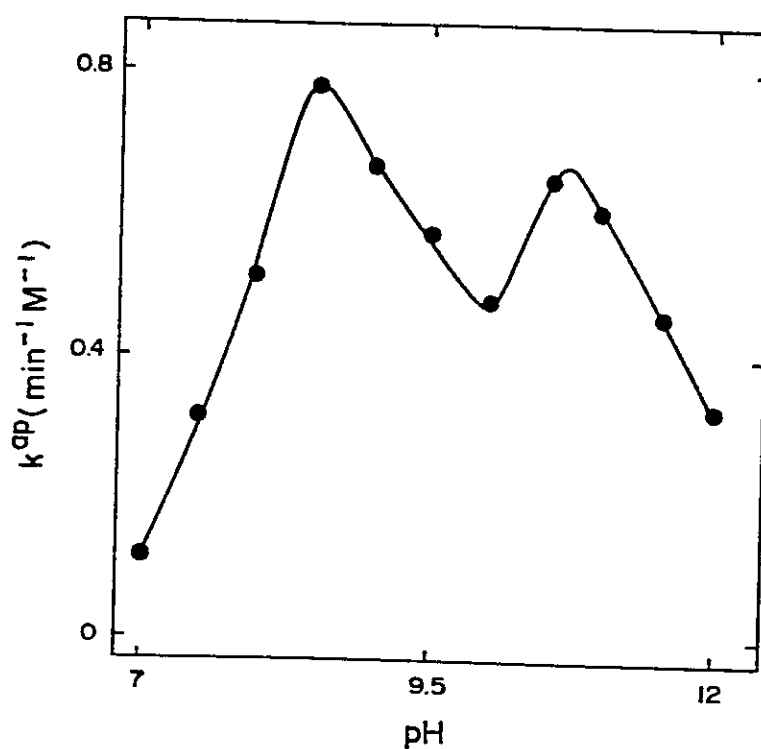


Fig. 9. Variación con el pH de la constante de velocidad aparente de segundo orden para la reacción del DIMBOA 0,08 mM con lisina 8 mM en presencia de borato 50 mM.

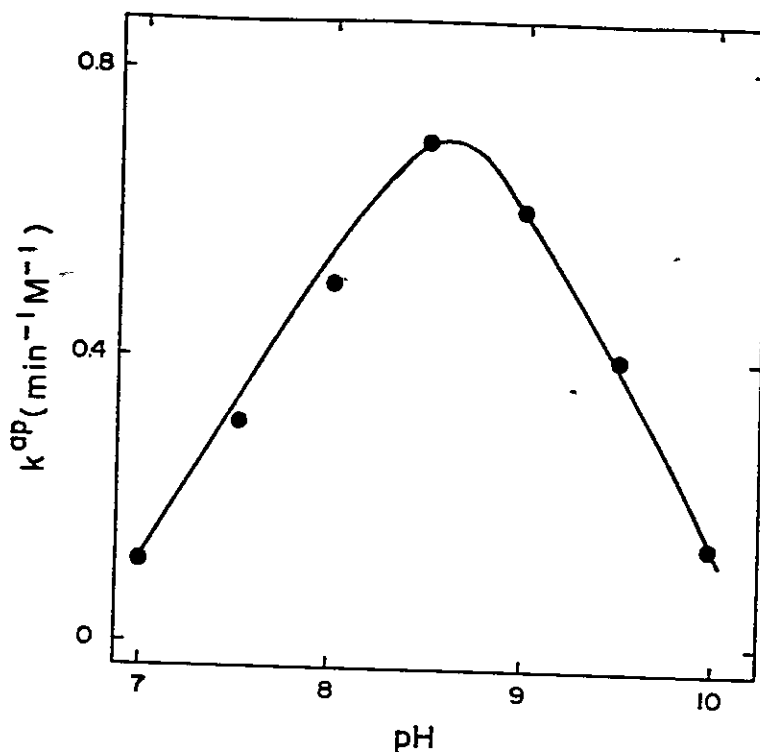


Fig. 10. Efecto del pH sobre la constante de velocidad aparente de segundo orden para la reacción del DIMBOA 0,08 mM con N- α -acetil-lisina 8 mM a 28°, en presencia de borato.

ESTUDIOS ENZIMATICOS

Reacción del DIMBOA con la papaina. Para estudiar la reacción del DIMBOA con grupos sulfhidrilo en un enzima, se eligió como modelo la papaina (EC 3.4.22.2), por presentar esta enzima un único residuo de cisteína libre en la molécula, ubicado en el sitio activo (Cys-25), y por conocerse con detalle su estructura y su mecanismo de catálisis (Lowe, 1976).

Análisis cinético. A concentraciones de DIMBOA mayores que 5 mM, el logaritmo de la actividad residual decrece linealmente con el tiempo. A concentraciones menores que 5 mM, los gráficos semi-logarítmicos producen curvas con pendientes que aumentan con el tiempo (Fig. 11).

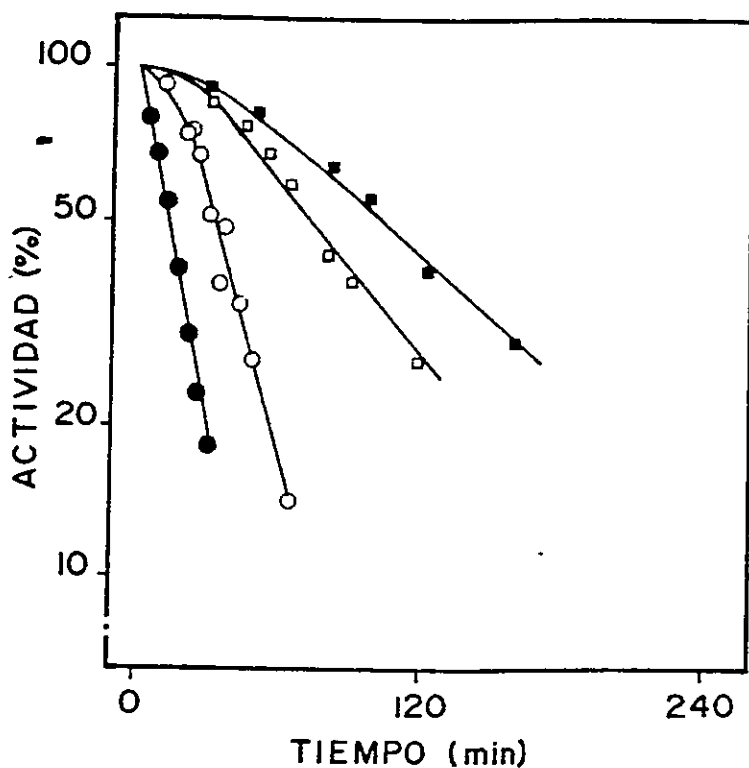


Fig. 11. Cinéticas de inactivación de papaina a diferentes concentraciones de DIMBOA: 0,5 (■), 1 (○), 3 (△), 8 (●) mM en tampón fosfato 50 mM, $I = 0,1$, $pH = 6,8$ a 28° . La mezcla de reacción consistió de $1,1 \times 10^{-5}$ M papaina, 2×10^{-4} M EDTA y DIMBOA. Las curvas dibujadas corresponden a ajustes de cuadrados mínimos de los puntos experimentales a la ecuación 9.

Las constantes de velocidad observadas determinadas de la porción lineal final de las curvas, muestran un efecto de saturación con la concentración del DIMBOA. Un gráfico de dobles

recíprocos con k_{inact} y concentración del DIMBOA genera una línea recta (Fig. 12).

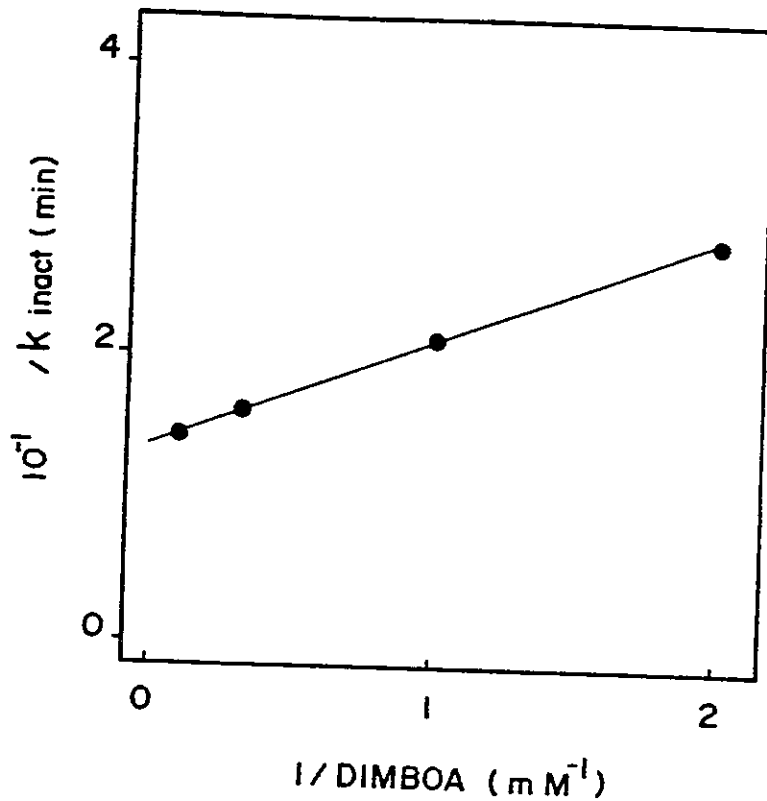
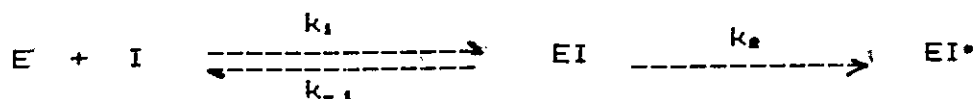


Fig. 12. Gráfico de dobles recíprocos de la porción lineal de las curvas de inactivación de la papaína por el DIMBOA en tampón fosfato 50 mM, $I = 0,1$, pH 6,8 a 28°.

Este comportamiento cinético fué similar en todo el intervalo de pH entre pH 3,5 y 10. Un modelo cinético que da cuenta de estas observaciones se muestra en el esquema 5. En éste se postula la formación reversible de un complejo entre la enzima y el inactivador, que posteriormente reacciona para dar la enzima modificada irreversiblemente (Kitz y Wilson, 1962).

Esquema 5



La solución matemática general para este modelo cinético está dada por la ecuación 9 (Childs y Bardsley, 1974), donde m_1 y m_2

$$\frac{(E + EI)}{(E)_0} = \frac{k_1 k_2 (I)}{m_1 (m_1 - m_2)} e^{-m_1 t} + \frac{k_1 k_2 (I)}{m_2 (m_1 - m_2)} e^{-m_2 t} \quad (9)$$

son los recíprocos de los tiempos de relajación (constantes de velocidad observada para cada una de las etapas del modelo), y están relacionadas con las constantes microscópicas a través de las ecuaciones 10 y 11 (Cornish - Bowden, 1979).

$$m_1 = 1/2 (k_1 (I) + k_{-1} + k_2 + \sqrt{(k_1 (I) + k_{-1} + k_2)^2 - 4k_1 k_2 (I)}) \quad (10)$$

$$m_2 = 1/2 (k_1 (I) + k_{-1} + k_2 - \sqrt{(k_1 (I) + k_{-1} + k_2)^2 - 4k_1 k_2 (I)}) \quad (11)$$

El ajuste de los puntos experimentales a pH 5 (Fig. 11) a la ecuación 9, a través de un método de regresiones no lineales, dió los valores $k_1 = 9,5 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$, $k_{-1} = 0,042 \text{ min}^{-1}$ y $k_2 = 0,065 \pm 0,044 \text{ min}^{-1}$. Los valores de las constantes de velocidad observadas de la fase lineal obtenidos gráficamente, fueron consistentes con los valores obtenidos por el método de ajuste (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de las constantes de velocidad observadas de la fase lineal de la inactivación de la papaina por el DIMBOA en tampón acetato pH 5, 28°, obtenido gráficamente (Fig. 11), y por ajuste de los puntos experimentales a la ecuación 9.

DIMBOA, mM	m_2 (min ⁻¹) ^a	m_2 (min ⁻¹) ^b
8	0,065	0,068
3	0,055	0,062
1	0,049	0,047
0,7	0,034	0,036

^a valores calculados por ajuste de los puntos experimentales a la ecuación 9.

^b valores calculados gráficamente.

Cuando uno de los términos exponenciales de la ecuación 9 predomina sobre el otro, la constante de velocidad observada toma la forma de la ecuación 12, que se reduce a la ecuación 13 cuando $k_1(I) \gg k_2$ (Childs y Bardsley, 1974). De la forma recíproca de esta ecuación, 14, es posible calcular el valor de la constante de disociación para el complejo enzima - sustrato, K_s , y el valor de la constante de inactivación, k_2 .

$$k_{obs} = \frac{k_2 (k_1(I) - k_2)}{k_1(I) + k_{-1} - k_2} \quad (12)$$

$$k_{obs} = \frac{k_2}{1 + K_s / (I)} \quad (13)$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_d}{k_2} \quad (14)$$

Efecto de la temperatura sobre la inactivación de la papaína por el DIMBOA. Se estudió el efecto de la temperatura sobre la constante de inactivación k_2 , y la constante de disociación K_d , para la inactivación de la papaína por el DIMBOA, a pH 5 y pH 10. Los valores de las constantes fueron calculados usando la ecuación 14, para lo cual se realizaron experimentos de inactivación a distintas concentraciones de DIMBOA para cada temperatura y pH. Los gráficos de Arrhenius tanto para el $\ln k_2$ como para el $\ln k_2/K_d$ a ambos pH fueron lineales (Fig. 13). Esto

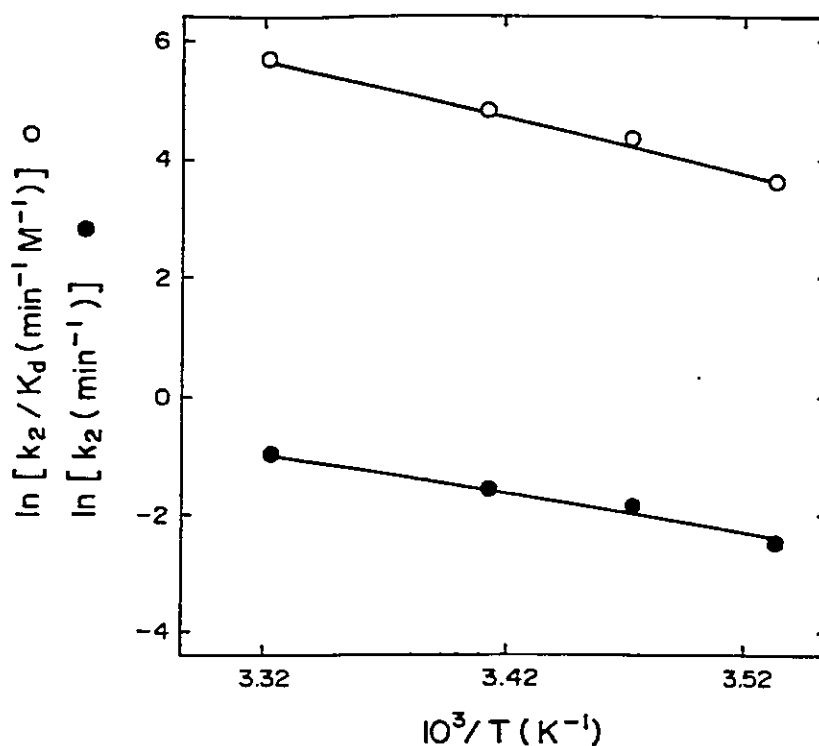


Fig. 13. Gráficos de Arrhenius para la inactivación de la papaína por el DIMBOA a pH 10. Los valores a pH 5 resultaron también lineales.

indica que no se producen cambios de mecanismo en la reacción del DIMBOA con la papaína a las distintas temperaturas (Roberts, 1977), y por consiguiente, que el DIMBOA reaccionaría con un único residuo de aminoácido de la enzima.

Efecto de sustratos sobre la inactivación de la papaína por el DIMBOA. La velocidad de inactivación de la papaína por 5 mM DIMBOA, en presencia de diferentes concentraciones de los sustratos BAEE y BGEE, fué estudiada a pH 6,8 (Fig. 14). El BAEE entre 0,02 y 0,3 M no protegió a la enzima contra la inactivación por 5 mM DIMBOA, mientras que el BGEE la protegió casi

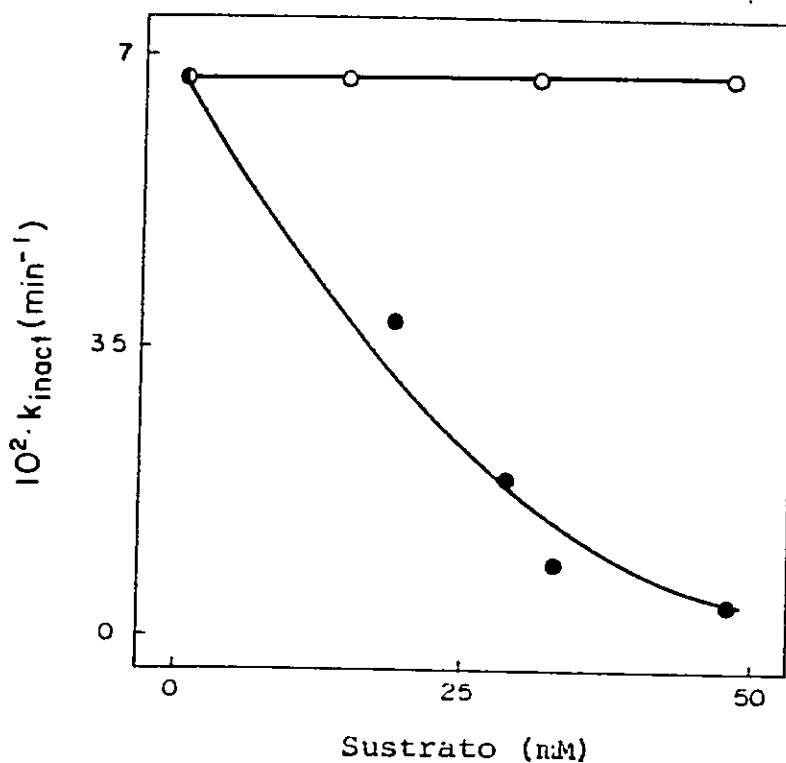


Fig. 14. Cinéticas de inactivación de la papaína por DIMBOA 5 mM DIMBOA en presencia de diferentes concentraciones de BAEE (○) y BGEE (●), en tampón fosfato 50 mM pH 6,8, a 28°.

completamente a la concentración 0,05 M. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sluyterman (1968) para la inactivación de la papaína por ácido cloroacético, y sugieren que, tal como sucede en ese caso, el DIMBOA reacciona con algún residuo de aminoácido del sitio activo de la enzima.

Titulación del grupo sulfhidrilo de la papaína. La papaína fue incubada con el DIMBOA, y tanto el título de tiol como la actividad fueron medidas en forma paralela. Se obtuvo una correlación lineal entre estas dos variables con una pendiente cercana a uno (Fig. 15). Este resultado sugiere que la

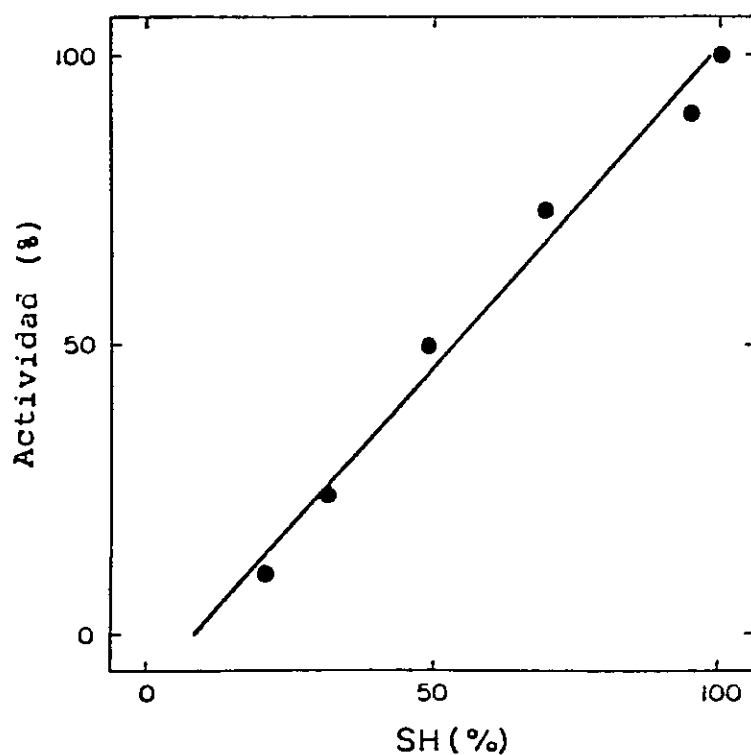


Fig. 15. Proporcionalidad entre la actividad y la pérdida del título de tiol de la papaína, expresado como porcentaje de los valores iniciales, durante la inactivación de la enzima por DIMBOA 10 mM. La actividad específica inicial fue 8,9 μ moles/min mg proteína y el título de tiol 0,57 moles de SH/mol de enzima.

inactivación de la papaína por el DIMBOA proviene de la reacción de este compuesto con el residuo Cys-25 de la enzima.

Análisis de aminoácidos de la papaína y de la papaína modificada por el DIMBOA. Con el objeto de comprobar que el DIMBOA al reaccionar con la papaína sólo modifica el residuo Cys-25, se realizaron análisis de aminoácidos tanto de la papaína como de la papaína modificada por el DIMBOA (Tabla 4). Para esto la enzima activa fué carboximetilada con ácido yodoacético y posteriormente sometida a análisis. Otra fracción activa de la enzima fué inactivada por el DIMBOA, luego carboximetilada con ácido

Tabla 4. Número de residuos de algunos aminoácidos en la papaína y en la papaína modificada por el DIMBOA.

Aminoácidos	I	II	III
Try	nd	nd	5
Lys	9.5	10.4	10
Arg	12.0	12.0	12
CM-Cys	1.5	0.5	1
Asp	19.7	19.6	19
Thr	6.5	7.7	8
Ser	3.5	9.1	13
Glu	20.0	20.0	20
Pro	7.8	9.6	10
Gly	26.8	27.8	28
Ala	14.0	14.8	14
Val	17.0	16.8	18
Ile	10.3	12.0	12
Leu	11.3	11.0	12
Tyr	19.3	19.3	19
Phe	4.2	4.1	4

I: Papaína tratada con ácido yodoacético.

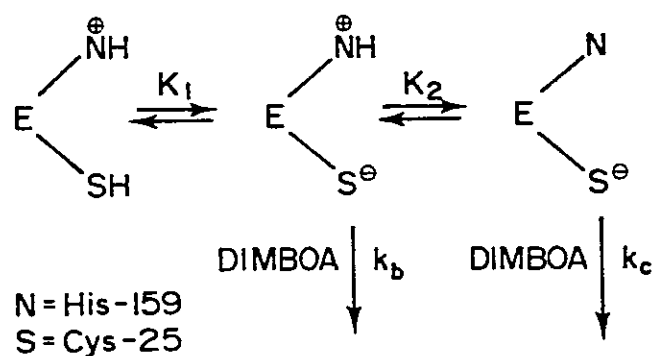
II: Papaína inactivada con DIMBOA y luego tratada con ácido yodoacético.

III: Glazer y Smith (1971).

yodoacético y posteriormente sometida a análisis. El cambio más significativo es el de la cisteína, que disminuye considerablemente en la enzima inactivada por DIMBOA (Tabla 4). En las condiciones experimentales empleadas, la determinación de serina no es confiable (Glazer y col., 1975).

Efecto del pH sobre la velocidad de inactivación de la papaína por el DIMBOA. El efecto del pH sobre la inactivación de la papaína por el DIMBOA fué estudiado entre pH 3 y 10 en presencia de 5 mM DIMBOA. A esta concentración de DIMBOA se obtuvo un efecto de saturación de la enzima en todos los pH estudiados. La dependencia de la constante observada de pseudo-primer orden con el pH se muestra en la Fig. 16. Se observan dos puntos de inflexión, en la región correspondiente a las constantes de disociación del par Cys-His de la papaína (Lowe, 1976; Johnson y col., 1981; Lewis y col., 1981) (Esquema 6).

Esquema 6



Si se supone que el anión tiolato es el nucleófilo reactivo y que tanto el DIMBOA, cuyo primer pKa es 7 (Niemeyer y col., 1982a), como su base conjugada son igualmente reactivos como electrófilos frente a la papaína, se obtiene la ecuación 15 para

este modelo. La curva de la Fig. 16 representa el ajuste de los puntos experimentales a esta ecuación.

$$k_{obs} = \frac{k_b}{1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)}} + \frac{k_a}{1 + \frac{(H^+)}{K_2} + \frac{(H^+)^2}{K_1 K_2}} \quad (15)$$

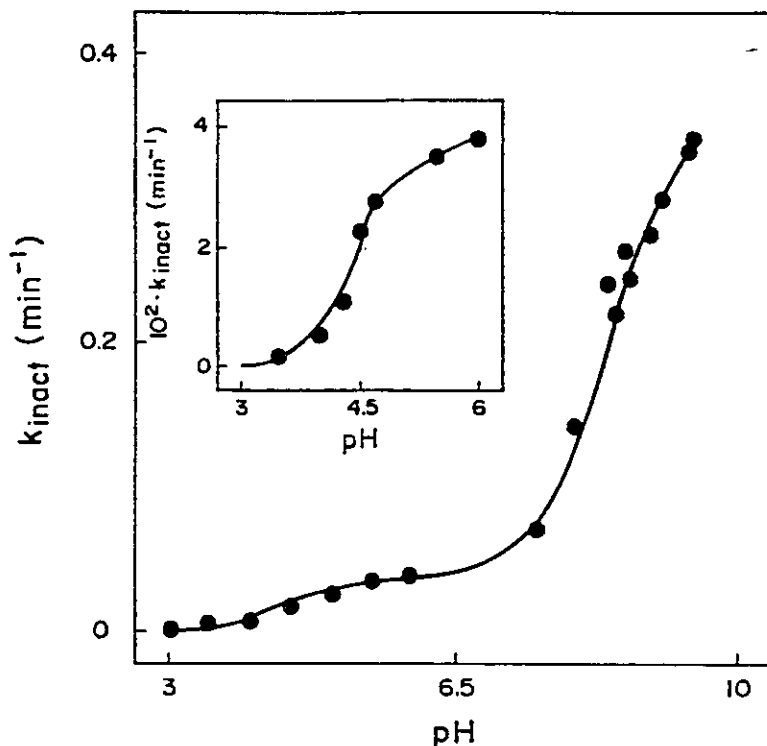


Fig. 16. Constantes de pseudo-primer orden para la inactivación de la papaína por 5 mM DIMBOA en función del pH. Los tampones usados fueron: 50 mM formato, acetato, MES, fosfato, borato, y carbonato, $I = 0.1$ ajustada con NaCl, a 28°. La línea continua corresponde al ajuste de los puntos experimentales a la ecuación 15.

Los valores para las constantes cinéticas obtenidas del ajuste fueron $k_b = 3,75 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ y $k_a = 3,59 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$, y para las constantes de disociación fueron $pK_1 = 4,5$; $pK_2 = 8,4$. Estos últimos valores son muy similares a los informados para otras reacciones de la papaína (Lowe, 1976).

Efecto del pH sobre la constante de asociación de la papaína por el DIMBOA. El efecto del pH sobre la asociación del DIMBOA con la papaína fué estudiado entre pH 5 y 10. El valor de la constante de disociación se determinó usando la ecuación 14. Para esto, fué necesario realizar estudios de inactivación de la enzima a diferentes concentraciones del DIMBOA para cada pH estudiado. En la tabla 5, se muestran los valores de las constantes de disociación K_d , de inactivación k_i , y del cociente de ambas, que representa la constante pseudo-bimolecular (Lenette y Plapp, 1979) para la reacción entre el DIMBOA y la papaína a los distintos pH.

Reversión por DTT de la inactivación de la papaína por el DIMBOA. Se agregó DTT en distintas concentraciones a una solución de papaína inactivada por DIMBOA y filtrada para eliminar el exceso de inactivador (Fig. 17). Al graficar el porcentaje de la actividad recuperada vs. la concentración de DTT (Fig. 18) se obtuvo una curva hiperbólica.

Estudio de productos de la reacción de la papaína con el DIMBOA. Una mezcla estequiométrica de papaína activa y DIMBOA fué incubada en tampón carbonato 50 mM, pH 10 a 28° por 1 hr. Al cabo de este tiempo la enzima había perdido totalmente su actividad. Cuando la papaína fué incubada en las mismas condiciones pero en ausencia de DIMBOA, no se observó pérdida de la actividad. La proteína fué luego precipitada con HClO₄ y separada por

Tabla 5. Valores de las constantes de disociación K_a , de inactivación k_a , y del cociente de ambas, entre pH 5 y 10. Los valores fueron determinados usando la ecuación 9. Las concentraciones del DIMBOA fluctuaron entre 0,1 y 5. Los tampones usados fueron: acetato, fosfato, pirofosfato, borato, y carbonato 50 mM, I = 0,1 ajustada con NaCl, 28°.

pH	k_a (min^{-1})	$K_a \times 10^2$ (M)	$k_a/K_a \times 10^{-2}$ ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
5,0	0,0014	1,82	0,078
6,8	0,072	0,44	1,6
7,1	0,138	0,37	4,4
7,4	0,146	0,22	6,6
7,6	0,176	0,21	7,4
8,0	0,204	0,14	14,3
8,5	0,227	0,12	18,9
8,7	0,219	0,45	4,9
8,8	0,236	0,54	4,7
9,2	0,275	0,58	4,6
9,5	0,290	0,81	3,5
10,0	0,340	1,53	2,3

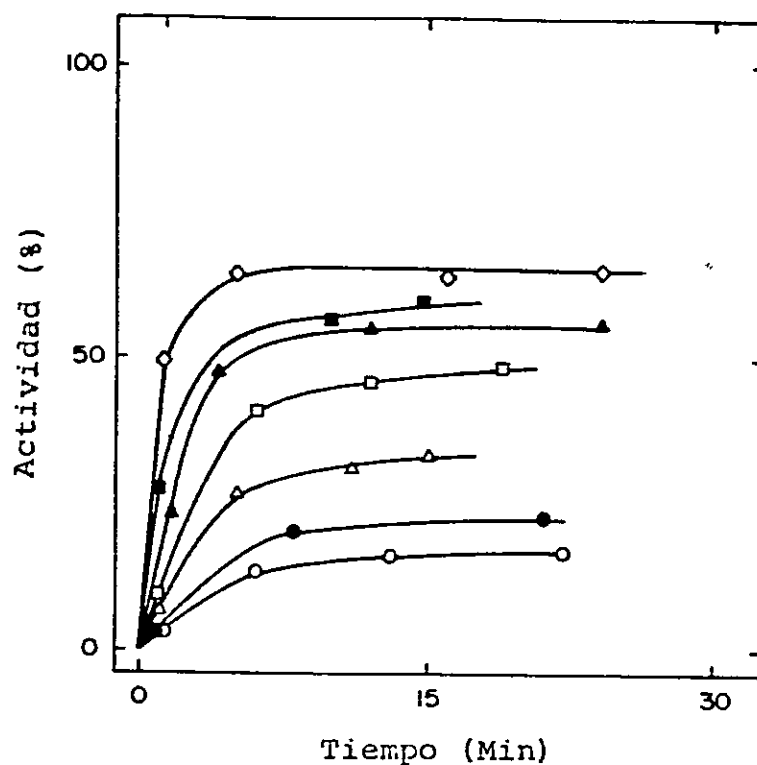


Fig. 17. Cinéticas de reversión por DTT de la actividad enzimática de la papaína inactivada por DIMBOA. Las concentraciones de DTT fueron: 0,025 (○), 0,05 (●), 0,1 (△), 0,25 (□), 0,5 (▲), 1 (■), y 5 (◇) mM. Estos estudios fueron realizados en tampón fosfato 50 mM, pH 6,8 a 28°.

centrifugación, y el sobrenadante fué neutralizado y analizado por HPLC (ver Materiales y Métodos). No se detectaron señales atribuibles ni a DIMBOA ni a su lactama 9. Bajo las mismas condiciones, el análisis por HPLC de la reacción del DIMBOA con ME indica la presencia de DIMBOA residual, de su producto de descomposición, 3 (Bravo y Niemeyer, 1985), de su producto de reducción, la lactama 9 (Pérez y Niemeyer, 1985), y de la forma oxidada del ME. Este resultado sugiere que la inactivación

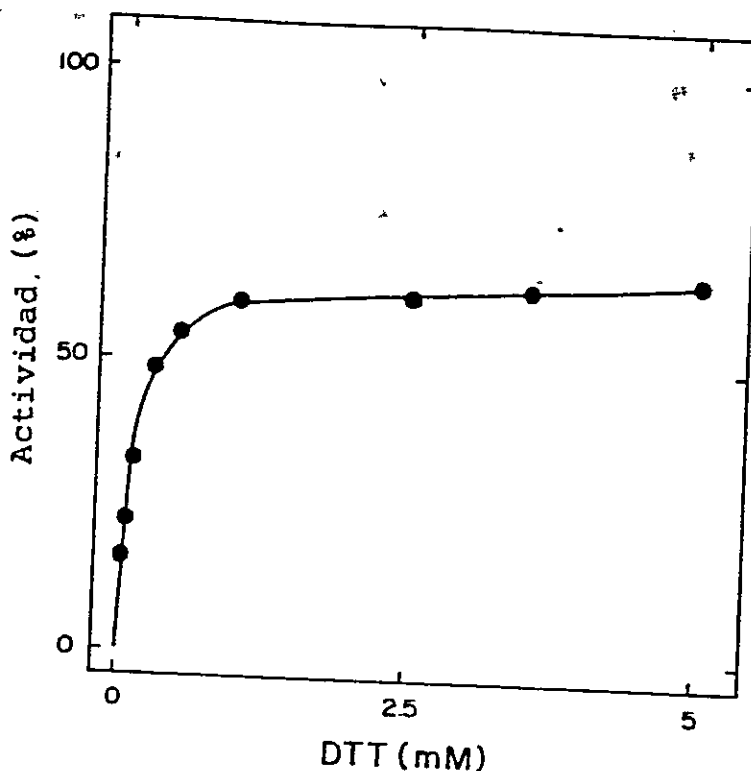


Fig. 18. Recuperación de la actividad de la papaína inactivada por DIMBOA, por agregado de distintas concentraciones de DTT.

de la enzima por el DIMBOA ocurre a través de la unión covalente del DIMBOA a la enzima.

INACTIVACION DE LA PAPAÍNA POR ANALOGOS DEL DIMBOA. Por analogía con las observaciones hechas en solución acuosa (Pérez y Niemeyer, 1985), el DIMBOA podría reaccionar con el residuo Cys-25 de la papaína a través del nitrógeno hidroxámico, o a través del carbonilo aldehídico del tautómero de cadena abierta del DIMBOA; 2. Con el objeto de distinguir entre ambas posibilidades se sintetizaron los compuestos 7, 8 y 9. Los compuestos 7 y 8 no

pueden formar el tautómero de cadena abierta, y por tanto no poseen un grupo aldehído reactivo disponible para la reacción. En el compuesto 9, el carácter electrofílico del átomo de nitrógeno es menor que el del nitrógeno del DIMBOA. Los estudios de inactivación por estos análogos fueron realizadas en tampón fosfato 50 mM pH 6,8. El compuesto 8 fué el único que inactivó a la papaína (Fig. 19). Las cinéticas de inactivación fueron similares a las del DIMBOA, y se observó un fenómeno de saturación de la enzima a concentraciones mayores que 5 mM. Las constantes de inactivación y de disociación, calculadas usando la ecuación 14, se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de las constantes de inactivación k_2 , de disociación K_d , calculadas usando la ecuación 14 para la inactivación de la papaína por el DIMBOA y por el compuesto 8, en tampón fosfato 50 mM, pH 6,8 a 28°.

	k_2 (min^{-1})	$10^3 K_d$ (M)	$10^{-3} k_2/K_d$ ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
DIMBOA	0,072	0,44	1,62
2-H-DIMBOA	0,092	1,38	0,67

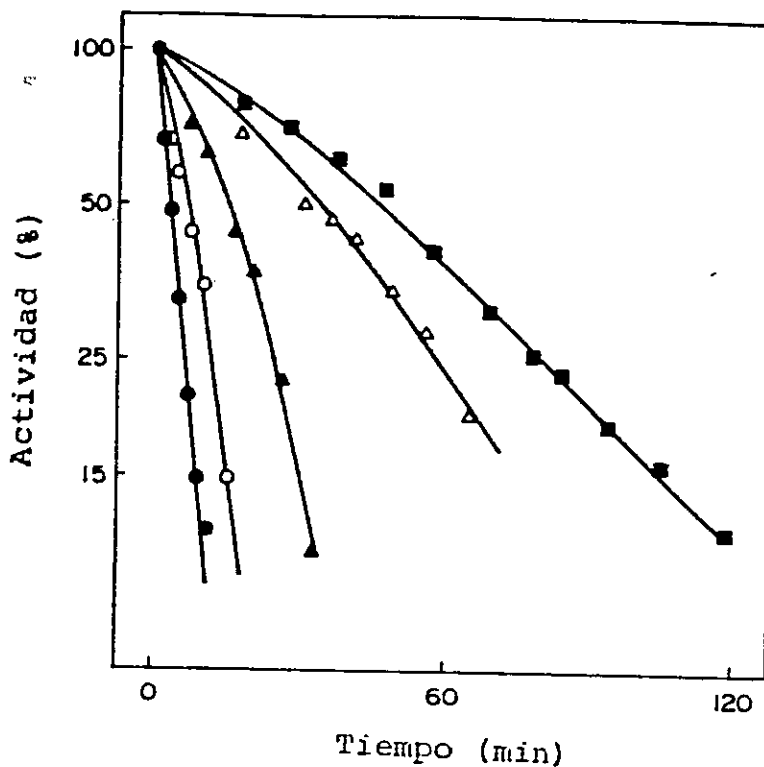
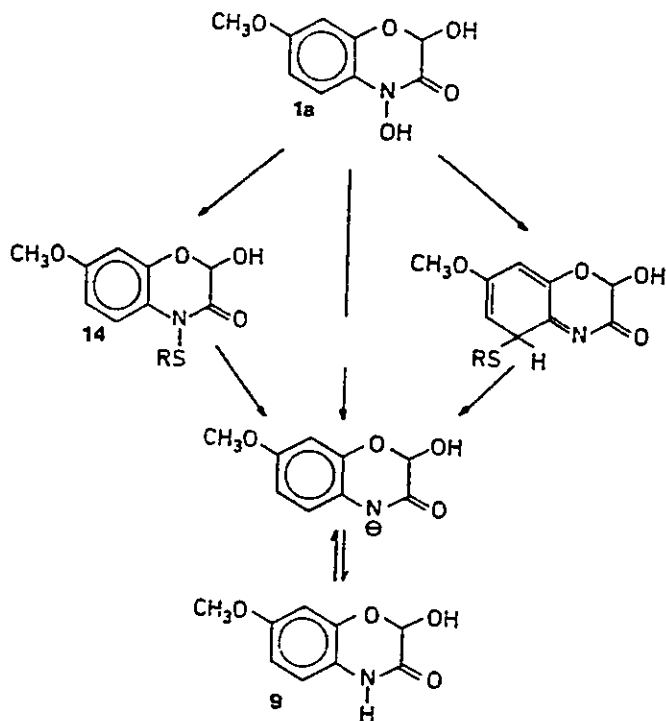


Fig. 19. Cinéticas de inactivación de la papaina a diferentes concentraciones de 2-H-DIMBOA, S : 1,1 (■); 1,65 (△); 2,75 (▲); 3,85 (○) y 8,25 (●) mM en tampón fosfato 50 mM, pH 6,8 ; $I = 0,1$ ajustada con NaCl, 28°.

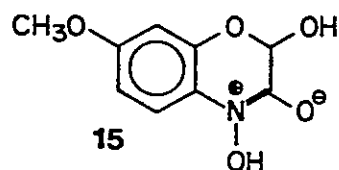
Estos experimentos sugieren que el DIMBOA reacciona con el residuo de Cys-25 de la papaina a través del nitrógeno hidroxámico, y que el grupo metoxilo en posición 7 aumenta considerablemente su reactividad, como se encontró en el estudio de la reacción de la cisteína con DIMBOA y DIBOA (Fig. 5).

Reacción del DIMBOA con tioles. El DIMBOA reacciona en solución acuosa con nucleófilos como tioles y aminas. La reacción con tioles genera productos de reducción (lactama del DIMBOA, 9) y de adición (hemitioacetales 12 y 13). En todo el rango de pH estudiado el producto principal fué la lactama. La ausencia de señal en el ESR durante la reacción del DIMBOA con ME, sugiere que es poco probable que la reacción ocurra a través de un mecanismo de radicales libres. Varios mecanismos iónicos (Esquema 7) pueden ser sugeridos, ya que el DIMBOA posee al menos tres centros electrofílicos susceptibles de ser atacados por tioles para dar la lactama 9.

Esquema 7



La reacción del DIMBOA con mercaptoetanol generó su disulfuro como producto de oxidación del tiol, lo que sugiere que el mecanismo que incluye el ataque del tiolato sobre el oxígeno hidroxámico no es importante. El grupo metoxilo en la molécula del DIMBOA provoca un sustancial incremento de la reactividad en relación a su análogo demetoxilado, DIBOA. Este efecto no puede ser racionalizado por el mecanismo en el que hay ataque sobre el anillo aromático, ya que se esperaría que el efecto dador de electrones del grupo metoxilo disminuyera la velocidad de reacción con respecto al DIBOA. Este efecto puede ser racionalizado por el mecanismo de ataque al nitrógeno hidroxámico, a través de la estructura resonante 15, que sería



estabilizada por el efecto dador de electrones del grupo metoxilo. Un argumento adicional en apoyo a este mecanismo se encuentra en el aislamiento de un intermediario similar a 14 de la reacción entre 7-metoxi-4-acetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona con etanotiol (Hashimoto y col., 1979).

Estos resultados sugieren que el mecanismo más probable para la reacción del DIMBOA con tioles en solución acuosa consiste en el ataque nucleofílico del anión tiolato sobre el nitrógeno hidroxámico del DIMBOA con salida del grupo hidroxilo y formación del intermediario 14, el cual posteriormente reacciona con otra

molécula de tiol o tiolato para generar el disulfuro y la lactama correspondiente.

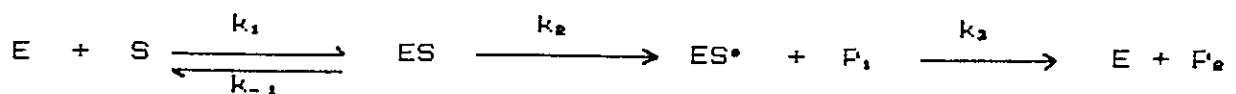
Reacción del DIMBOA con la papaína.

Residuo reactivo: Cys-25. Los gráficos semi-logarítmicos de la actividad residual de la papaína en función del tiempo, no son lineales a concentraciones de DIMBOA menores que 5 mM. Este fenómeno podría interpretarse en función de la existencia de más de un residuo de aminoácido reactivo por mol de enzima (Koshland, 1961). Sin embargo, tanto evidencias termodinámicas (proporcionalidad entre pérdida del título de tiol y pérdida de actividad, de la papaína por efecto del DIMBOA, y análisis de aminoácidos de la papaína y de la papaína modificada por el DIMBOA), como cinéticas (protección por EGEE de la inactivación de la papaína por el DIMBOA y efecto de la temperatura sobre la inactivación) indican que la inactivación de la enzima se debe a la reacción entre la Cys-25 de la papaína y el DIMBOA.

Análisis cinético. La dependencia hiperbólica de la velocidad de inactivación de la papaína con la concentración del DIMBOA en su fase lineal (efecto de saturación de la enzima) indica que el inactivador se une reversiblemente a la enzima, antes de la reacción de inactivación propiamente tal (Kitz y Wilson, 1962) (Esquema 5). La solución matemática de este modelo cinético es una suma de exponenciales (Childs y Bardsley, 1974) (ecuación 9).

Cuando los valores de las constantes m_1 y m_2 para cada una de las dos etapas del modelo, que dependen de los valores de las constantes microscópicas k_1 , k_{-1} , k_2 y de la concentración del inactivador (ecuaciones 10 y 11), son similares, los gráficos semi-logarítmicos de la actividad residual en función del tiempo no son lineales. Sin embargo, si $m_1 \gg m_2$, uno de los términos exponenciales de la ecuación 9 desaparece tempranamente en el tiempo, y en estas condiciones la cinética de inactivación de la enzima sigue un proceso de pseudo-primer orden (Brocklehurst, 1979). En consecuencia, la falta de linearidad de los gráficos semilogarítmicos de la actividad residual de la papaína en función del tiempo a concentraciones de DIMBOA menores que 5 mM, indicaría que en esta reacción ambas exponenciales tienen ponderaciones comparables.

Protección por sustratos de la inactivación de la papaína por el DIMBOA. La hidrólisis de ésteres o amidas catalizada por la papaína, ocurre a través de un mecanismo en tres etapas con formación de un intermediario acil-tioenzima (Lowe, 1976; Sluyterman, 1981).



En este esquema, ES representa el complejo de Michaelis, ES^* el intermediario acil-tioenzima, P_1 el alcohol o amina, y P_2 la fracción ácida del sustrato hidrolizado.

Los resultados de la protección por BAEE y BGEE de la inactivación de la papaína por el DIMBOA, muestran que sólo el BGEE tiene efecto protector. Este fenómeno puede ser racionalizado suponiendo que a concentraciones altas de sustrato la concentración de enzima libre es pequeña con ambos sustratos, y que cuando la enzima se encuentra en estado de acil-tioenzima, ES^* , el grupo sulfhidrilo de la enzima se encuentra covalentemente unido al grupo acilo del sustrato, y en consecuencia no puede reaccionar con el DIMBOA.

En el caso del BAEE, la etapa de acilación es la limitante de la reacción, $k_2 \gg k_3$ (Sluyterman, 1968), y a concentraciones altas de BAEE la enzima se encuentra mayoritariamente en la forma de ES . Ya que en este estado la enzima no tiene comprometido el grupo sulfhidrilo, este sustrato no protege la inactivación de la papaína por el DIMBOA.

En el caso de BGEE, la etapa de deacilación es la limitante de la reacción ($k_2 \gg k_3$), y a concentraciones altas de BGEE la enzima se encuentra mayoritariamente en el estado ES^* . Ya que en este estado la enzima tiene el grupo sulfhidrilo unido al residuo acilo del sustrato, éste no es reactivo frente al DIMBOA, y, en consecuencia, el BGEE protege a la papaína de la inactivación por el DIMBOA.

Efecto del pH sobre la velocidad de inactivación de la papaína por el DIMBOA. El efecto del pH sobre la velocidad de inactivación de la papaína por el DIMBOA puede disecarse en el

efecto sobre la constante de asociación ($1/K_a$) del DIMBOA por la papaína, y el efecto sobre la constante de primer orden (k_e) para la reacción del complejo enzima-inactivador para dar la enzima inactiva (Esquema 5).

Los datos en la tabla 4 muestran que la constante de asociación del DIMBOA con la papaína ($1/K_a$) aumenta a medida que el pH aumenta, llegando a un valor máximo alrededor de pH 8,5 para luego decrecer a pH más alcalinos. A pH 5 la papaína se encuentra cargada positivamente (el pI de la papaína es 8,75 (Glazer y Smith, 1971)), y el DIMBOA se encuentra sin disociar ($pK_a = 7$). A medida que el pH aumenta, el DIMBOA adquiere carga negativa y el valor de la constante de asociación aumentaría en virtud de una mayor atracción electrostática. A pH superiores a su pI, la papaína se encuentra cargada negativamente al igual que el DIMBOA. En esta situación, la repulsión electrostática provoca la disminución en el valor de la constante de asociación.

El efecto del pH sobre k_e fue determinado por dos métodos: i) usando concentraciones saturantes de DIMBOA; en estas condiciones la constante de inactivación observada corresponde a la constante de primer orden para la reacción del complejo enzima-inactivador (esquema 5), y ii) usando concentraciones variables de DIMBOA para cada uno de los pH estudiados; de la intersección de un gráfico de dobles recíprocos (ecuación 10) se determinó k_e (Tabla 4). Ambos métodos condujeron a valores similares de k_e .

La curva generada al graficar los valores de k_e vs. pH no

mostró inflexiones atribuibles a la disociación del DIMBOA, y pudo ser ajustada a la ecuación 15, en la que sólo se consideró los pK_a de la papaína.

La reacción del DIMBOA con tioles libres en solución ocurre por dos caminos: sustitución en el nitrógeno hidroxámico con formación de la lactama 9, y adición al grupo aldehído de 2 para generar los hemitioacetales 12 y 13 (Niemeyer y col., 1982; Pérez y Niemeyer, 1985).

La reacción del DIMBOA con el grupo sulfhidrilo de la Cys-25 no puede deberse a la reacción de éste con el grupo aldehído de 2, ya que por una parte el compuesto 9, que no posee un nitrógeno hidroxámico pero sí un carbono aldehídico susceptible de ser atacado por un anión tiolato, no inactivó la papaína, y por otra, el compuesto 8, que posee un nitrógeno hidroxámico pero no puede generar un tautómero de cadena abierta con grupo aldehído, inactivó a la papaína con una constante y una cinética de inactivación comparables con las del DIMBOA.

El hecho de que el pK_a del DIMBOA no sea perceptible en la dependencia de k_a con el pH, sugiere la asociación del oxígeno hidroxámico del monoanión del DIMBOA a un centro ácido en el sitio de unión del DIMBOA con la papaína. De este modo, la electroceptividad del oxígeno hidroxámico, y por consecuencia, la electrofilicidad del nitrógeno hidroxámico, serían comparables en el DIMBOA y en su monoanión, cuando éstos están asociados a la enzima.

Drenth y col. (1976), basados en estudios sobre la

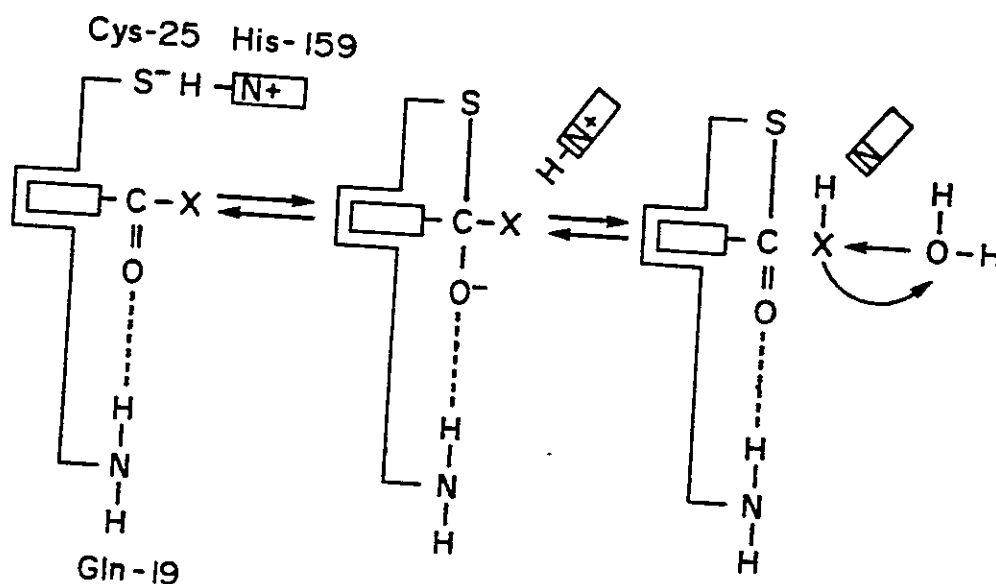
estructura terciaria de la papaína modificada con clorometilcetonas, propusieron la existencia de un sitio de unión para un oxianión en el sitio activo de la papaína, que estaría formado por la cadena lateral del grupo NH_2 de la Gln-19 o el grupo amino de la cadena principal de la Cys-25. Estudios cinéticos posteriores basados en la utilización de tioésteres como sustratos de la enzima, apoyaron la existencia de dicho sitio (Asboth y Polgar, 1983; Asboth y col., 1985). La asociación por puentes de hidrógeno del oxígeno negativo del monoanión del DIMBOA, a alguno de estos sitios ácidos, generaría una curva de dependencia de k_2 con el pH, en la que sería imperceptible el efecto de la disociación del DIMBOA.

La curva del efecto del pH sobre la constante de segundo orden (k_2/K_2) para la reacción del DIMBOA con la papaína (Tabla 4) muestra un máximo en pH 8,5, con una tendencia similar a los valores de la constante de asociación. Este fenómeno indica que en el proceso cinético global (asociación-inactivación) de la reacción de la papaína con el DIMBOA, la asociación es más sensible al pH que la inactivación propiamente tal.

Mecanismo de la reacción entre la papaína y el DIMBOA. La participación del grupo SH de la papaína ubicado en la Cys-25 es esencial en el proceso de catálisis (Glazer y Smith, 1971). Estudios de difracción de rayos X (Drenth y col., 1975) y estudios químicos en que se usaron reactivos bifuncionales (Hussain y Lowe, 1968), sugirieron la participación del grupo

imidazol de la His-159 en la catálisis. Esta participación consistiría en la formación de un par iónico con la Cys-25 y en la catálisis ácido-base de la transformación del intermediario tetraédrico y de la acil-enzima, y vice-versa (Esquema 8).

Esquema 8



Esta hipótesis da cuenta del efecto del pH sobre los parámetros de Michaelis, k_{cat} y k_{cat}/K_m en la hidrólisis de diversos sustratos (Williams y Whitaker, 1967; Whitaker y Bender, 1965). La dependencia con el pH de estos parámetros tiene forma de campana con valores de pKa aparentes de 4,2 y 8,4. La caída de la constante a pH básicos se debería a la imposibilidad de la His-159 de catalizar el proceso de acilación.

Estudios con modificadores químicos que reaccionan con el grupo SH de la papaína, como haloacetamidas (Glazer y Smith, 1971), ésteres sulfónicos cíclicos (Campbell y Kaiser, 1971) y metilmetanotiosulfonato (Roberts y col., 1986), también indican que la dependencia con el pH de las constantes bimoleculares de inactivación no se ajusta a una simple curva de disociación, como en el caso de un tiol libre de solución, pues se obtienen curvas de doble sigmoidicidad con pKa de 4,3 y 8,4. Estos resultados también apuntan hacia la formación de un par iónico entre el grupo SH de la Cys-25 y el grupo imidazol de la His-159 entre pH 4 y 8,4, en el sitio activo de la papaína (Polgar, 1977). La doble sigmoidicidad se debería al incremento de la nucleofilicidad del grupo sulfhidrilo, que con un aumento del pH sufre la transformación tiol-par iónico-tiol disociado.

La visión acerca de la inactivación de la papaína por el DIMBOA que emerge de nuestros estudios, es la siguiente: el DIMBOA se asociaría a la enzima mediante interacciones fundamentalmente electrostáticas (efecto del pH sobre $1/K_a$). Dicha unión se produciría en la zona alrededor del sitio activo, ya que éste presenta zonas complementarias al DIMBOA: Por una parte, una zona hidrofóbica (Polgar, 1977) de la cual sacaría ventaja el anillo aromático del DIMBOA; una zona con carácter nucleofílico, que se complementaría con los centros electrofílicos del DIMBOA; y una zona ácida que se complementaría con la basicidad del oxígeno hidroxámico a pH altos.

En una segunda etapa, el grupo sulfhidrilo del sitio activo

de la enzima desplazaría sobre el nitrógeno hidroxámico al grupo hidroxilo (o, dependiendo del pH a su anión asociado a un centro ácido), generando un intermediario semejante a 14.

A diferencia de la reacción no enzimática, no se produciría un ataque de una nueva molécula de tiol sobre este intermediario, probablemente debido a impedimentos estéricos (tamaño de la proteína) y de concentración. Los estudios de recuperación con DTT de la actividad de la papaína modificada por el DIMBOA apuntan en esta dirección: el DTT agregado reaccionaría con el azufre de la Cys-25 unido covalentemente al N-hidroxámico del intermediario 14 generando un disulfuro mixto y liberándose la lactama del DIMBOA; posteriormente, el ataque de otra molécula de DTT regeneraría la papaína activa y el disulfuro del DTT.

Otras enzimas SH dependientes que podrían ser inactivadas por los Hx son: dehidrogenasas, amilasas y algunas kinasas (Friedman, 1973).

Reacción del DIMBOA con aminas. Los resultados del estudio de esta reacción en soluciones etanólica y acuosa, indican la formación de bases de Schiff y sugiere la posibilidad de que el DIMBOA reaccione con enzimas que posean residuos de lisina importantes para la actividad catalítica, ya sea por ser hiperreactivas, como es el caso de la lisina-97 de la glutamato dehidrogenasa de hígado de cerdo (EC 1.4.1.3) (Piszkiewicz y Smith, 1971), o por estar en el sitio activo, como es el caso de la acetoacetato-decarboxilasa del Clostridium acetobutylicum (O'Leary y Westheimer, 1968).

REFERENCIAS

- Albert, A & E.P. Serjeant (1984) The determination of ionization constants. 3a. ed., Chapman & Hall.
- Argandoña, V.H., J.G. Luza, H.M. Niemeyer & L.J. Corcuera (1980) Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry* 19: 1665-1668.
- Argandoña, V.H., L.J. Corcuera, H.M. Niemeyer & B.C. Campbell (1983) Toxicity and feeding detergency of hydroxamic acids from Gramineae in synthetic diets against the greenbug, Schizaphis graminum. *Ent. exp. & appl.* 34: 134-138.
- Asboth, B. & L. Polgar (1983) Transition state stabilization of the oxyanion binding sites of serine and thiol proteinases: Hydrolysis of thiono and oxygen esters. *Biochemistry* 22: 117-122.
- Asboth, B., E. Stokum, I.U. Kher & L. Polgar (1985) Mechanism of action of cysteine proteinases: Oxyanion binding site is not essential in the hydrolysis of specific substrate. *Biochemistry* 24: 606-609.
- Bell, E. (1978) Biochemical aspects of plant and animal coevolution. Harborne, J.B., ed., Academic Press, London.
- Bohidar, K., S.D. Wratten & H.M. Niemeyer (1986) Effects of hydroxamic acids on the resistance of wheat to the aphid Sitobion avenae. *Ann. appl. Biol.* 109: 193-198.
- Bravo, H.R. & H.M. Niemeyer (1985) Decomposition in aprotic solvents of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, a hydroxamic acid from cereals. *Tetrahedron* 41: 4983-4986.
- Bravo, H.R. & H.M. Niemeyer (1986) A new product from the decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), a hydroxamic acid from cereals. *Heterocycles* 24: 335-337.
- Brendenberg, J.B-son., E. Honkanen & A.I. Virtanen (1962) The kinetics and mechanism of the decomposition of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Acta Chem. Scand.* 16: 135-141.
- Brocklehurst, K. (1979) The equilibrium assumption is valid for the kinetic treatment of most time-dependant protein modification reactions. *Biochem. J.* 181: 775-778.

- Campbell, P. & E.T. Kaiser (1972) Reaction of a six membered cyclic sulfonate ester β -(2-hydroxy-3,5-dinitrophenyl) ethanesulfonic acid sultone, with the active site of papain. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 3735-3741.
- Castelfranco, P., C.L. Foy & D.B. Deutsch (1961) Non-enzymatic detoxification of 2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-s-triazine (simazine) by extracts of Zea mays. *Weeds* 9: 580-591.
- Childs, R.A. & W.G. Bardsley (1974) Time dependent inhibition of enzymes by active site-directed reagents. A theoretical treatment of the kinetics of affinity labelling. *J. Theor. Biol.* 53: 381-394.
- Copaja, S.V., H.R. Bravo & H.M. Niemeyer (1986) Quantitation of N-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-glyoxylohydroxamic acid, a reactive intermediate in reactions of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *J. Org. Chem.* 51: 3542-3545.
- Corcuera, L.J., M.D. Woodward, J.P. Helgeson, A. Kelman & C.D. Upper (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. (1979) Validity of a steady state treatment of inactivation kinetics. *Eur. J. Biochem.* 93: 383-385.
- Coutts, R.T. & M.J. Pound (1971) Acetylation and acetoxylation of 4-hydroxy-1,4-benzothiazin and benzoxazin-3(4H)-ones (cyclic hydroxamic acids). *J. Chem. Soc (C)*. 2696-2699.
- Dabed, R.G., M.I. Toral, L.J. Corcuera & H.M. Niemeyer (1983) Complexes of bivalent cations with a hydroxamic acid from maize extracts. *Polyhedron* 2: 106-108.
- Drenth, J., J.N. Jansonius, R. Koekoek & L.A. Sluyterman (1975) The structure of papain. *Adv. Protein Chem.* 25: 79-115.
- Drenth, J., K.H. Kalk & H.M. Swen (1976) Binding of chloromethyl ketone a substrates analogues to crystalline papain. *Biochemistry* 15: 3731-3738.
- Dudek, G. & E.M. Dudek, (1971) Spectroscopic studies of keto-enol equilibria. Part XIII. ^{15}N -Substituted imines. *J. Chem. Soc. (B)* 1356-1360.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.

- ElNaghy, M.A. & P. Linkó (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.
- Emery, T.F. (1971) Hydroxamic acids of natural origin. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35: 135-185.
- Friedman, M. (1973) The chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides and proteins. Pergamon Press, Oxford.
- Glazer, A.N. & E.L. Smith (1971) Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. *The Enzymes*, P.D. Boyer, ed., 3: 501-545.
- Glazér, A.N., R.J. Delange., D.S. Sigman., (1975) Chemical modification of protein. North-Holland Publishing.
- Grambow, H.J., J. Luckge, A. Klausener & E. Muller (1986) Occurrence of 2-(2-hydroxy-4,7-dimethoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one)- β -D-glucopyranoside in Triticum aestivum leaves and its conversion into 6-methoxy-benzoxazolinone. *Z. Naturforsch.* 41c: 684-690.
- Gutiérrez, C., A. Guerrero, P. Castañera & J.V. Torres (1982) A high performance liquid chromatographic method for quantitation of DIMBOA and MBOA in maize plant extracts. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1258-1260.
- Hamilton, R.H. (1964) 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. & D.E. Moreland (1962) Simazine: degradation by corn seedlings. *Science* 135: 373-374.
- Harborne, J.B. (1982) Introduction to ecological biochemistry Academic Press, London.
- Hashimoto, Y., T. Ohta, K. Shudo & T. Okamoto (1979) Reactions of 4-acetoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-ones with some nucleophiles. *Tet. Lett.* 18: 1611-1614.
- Hashimoto, Y., T. Ishizaki., K. Shudo., T. Okamoto (1983) Rearrangements of 4-acetoxy-2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one. *Chem & Pharm. Bull* 31: 3891-3896.
- Hiriart, M.V., L.J. Corcuera, C. Andrade & I. Crivelli (1985) Copper(II) complexes of a hydroxamic acid from maize. *Phytochemistry* 24: 1919-1922.

- Hofman, J. & O. Hofmanová (1969) 1,4-Benzoxazine derivatives in plants. Sephadex fractionation and identification of a new glucoside. *Eur. J. Biochem.* 8: 109-112.
- Honkanen, E. & A.I. Virtanen (1960) The synthesis of precursor II of benzoxazolinone formed in rye plants, and the enzymic hydrolysis of precursor I, the glucoside. *Acta Chem. Scand.* 14: 504-507.
- Honkanen, E. & A.I. Virtanen (1961) On the reaction of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one to 2(3) benzoxazolinone. *Acta Chem. Scand.* 15: 221-222.
- Hosel, E. (1981) *The Biochemistry of plants.* P.K. Stumpf y E.E. Conn, eds., Academic Press 725-750.
- Husain, S.S. & G. Lowe (1968) Evidence for histidine in the active site of papain. *Biochem. J.* 108: 855-859.
- Ioannou, Y.M., W.C. Dauterman and W.P. Tucker (1980) Degradation of diazinon by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one in maize. *Phytochemistry* 19: 1607-1611.
- Ishizaki, T., Y. Hashimoto, K. Shudo & T. Okamoto (1982) Reaction of 4-acetoxy-1,4-benzoxazin-3-one with DNA: a possible chemical mechanism for the antifungal and mutagenic activities. *Tet. Lett.* 23: 4055-4056.
- Ishizaki, T., Y. Hashimoto, K. Shudo & T. Okamoto (1983) Reactions of 4-acetoxy-1,4-benzoxazin-3-one with aminoacid derivatives. *Heterocycles* 20: 1481-1484.
- Jernow, J.L. & P. Rosen (1975) 2H-1,4-benzoxazin-3-(3H)-ones. U.S. Patent 3: 882,180.
- Johnson, F.A., S.D. Lewis & J.A. Shafer (1981) Determination of a low pK for histidine-159 in the S-methylthioderivative of papain by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 20: 44-48.
- Jolley, C.J & J.A. Yankeelov (1972) Reaction of papain with α -bromo- β -(5-imidazolyl)propionic acid. *Biochemistry.* 11: 164-169.
- Kirsch, J.F & M. Ingelstrom (1966) The kinetics of papain-catalyzed hydrolysis of esters of carbobenzoxyglycine. Evidence for an acyl-enzyme intermediate. *Biochemistry* 5: 783-791.

- Kitz, R. & I. Wilson (1962) Esters of methanesulfonic acids as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 237: 3345-3249.
- Klun, J.A., W.D. Guthrie, A.R. Hallauer & W.A. Russell (1970) Genetic nature of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven inbreds. *Crop Sci.* 10: 87-90.
- Kutschabsky, L. & I. Wilson (1982) 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3-one. *Crys. Struc. Comm.* 11: 841-846.
- Leete, E. (1986) comunicaci3n personal.
- Lennette, E.P. & B.V. Plapp (1979) Transition-state analysis of the facilitated alkylation of ribonuclease A by bromoacetate. *Biochemistry* 18: 3939-3946.
- Lewis, S.D., F.A. Johnson, A.K. Ohno & J.A. Shafer (1981) Dependence of the catalytic activity of papain on the ionization of two acidic groups. *J. Biol. Chem.* 253: 5080-5086.
- Long, B.J., G.M. Dunn, J.S. Bowman & D.G. Routley (1977) Relationship of hydroxamic acid content in corn and resistance to the corn leaf aphid. *Crop Sci.* 17: 55-58.
- Lowe, G. (1976) The cysteine proteinases. *Tetrahedron* 32: 291-302.
- Malan, C., J.H. Visser & H.A. van de Venter (1984) Growth responses of inbred maize lines with high and low DIMBOA (benzoxazinone) contents to atrazine. *S. Afr. J. Plant Soil* 1: 103-105.
- Martin, R.B. (1964) Reaction of carbonyl compounds with amines and derivatives. *J. Phys. Chem.* 68: 1369-1377.
- Martin, S.A., P.G. Sammes & R.M. Upton (1979) The oxidation of trimethylsilylated amides to hydroxamic acids. *J. Chem. Soc. Perkin I* 2481-2487.
- Nagao, T., H. Otsuka, H. Kohda, T. Sato & K. Yamasaki (1985) Benzoxazinones from Coix lachryma-jobi var. Ma-yuen. *Phytochemistry* 24: 2959-2962.
- Neilands, J.B. (1967) Hydroxamic acids in nature. *Science* 156: 1443-1447.

- Niemeyer, H.M., H.R. Bravo, G.F. Peña & L.J. Corcuera (1982a) Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, a hydroxamic acid from Gramineae. En "Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids. H. Kehl, ed., Karger, A.G., Basilea, pp. 22-28.
- Niemeyer, H.M., L.J. Corcuera & F.J. Pérez (1982b) Reaction of a cyclic hydroxamic acid from Gramineae with thiols. *Phytochemistry* 21: 2287-2289.
- Niemeyer, H.M., N.B. Calcaterra & O.A. Roveri (1986) Inhibition of mitochondrial energy-linked reactions by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), a hydroxamic acid from Gramineae. *Biochem. Pharmacol.* 35: 3909-3914.
- Ohta, T., K. Shudo & T. Okamoto (1978) Reaction of N,O-diacylarylhydroxylamine with carbon nucleophiles. *Tet. Lett.* 23: 1983-1986.
- O'Leary, M.H. & F.H. Westheimer (1968) Acetate decarboxylase. Selective acetylation of the enzyme. *Biochemistry* 7: 913-918.
- Page, E.R. (1966) Sideramines in plants and their possible role in iron metabolism. *Biochem. J.* 100: 34-39.
- Pearson, R.G., H. Sobel & J. Songstad (1968) Nucleophilic reactivity constants toward methyl iodide. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 319-326.
- Pérez, F.J. & H.M. Niemeyer (1985) The reduction of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one by thiols. *Phytochemistry* 24: 2963-2966.
- Pérez, F.J. & H.M. Niemeyer (1986) Effect of borate on the decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one, a hydroxamic acid from Gramineae. *Heterocycles* 24: 13-16.
- Piszkiewicz, D. & E.L. Smith (1971) Bovine liver glutamate dehydrogenase. Equilibria and kinetics of inactivation by pyridoxal. *Biochemistry* 10: 4538-4543.
- Polgar, L. (1977) The mechanism of action of thiolenzymes. *Int. J. Biochem.* 8: 171-176.
- Queirolo, C.B., C.S. Andreo, R.H. Vallejos, H.M. Niemeyer & L.J. Corcuera (1981) Effect of hydroxamic acids from Gramineae on adenosine 5'-triphosphate synthesis in chloroplasts. *Plant Physiol.* 68: 941-943.

- Queirolo, C.B., C.S. Andreo, H.M. Niemeyer & L.J. Corcuera (1983) Inhibition of ATPase from chloroplasts by a hydroxamic acid from the Gramineae. *Phytochemistry* 22: 2455-2458.
- Roberts, D.D., S.D. Lewis, D.F. Balow, S.T. Olson & J.A. Shafer (1986) Reactivity of small thiolate anions and Cys-25 in papain toward methyl methanethiosulfonate. *Biochemistry* 25: 5595-5601.
- Roberts, D.V. (1977) *Enzyme Kinetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Roth, W. & E. Kunsli (1961) Beitrag zur Kenntnis des Resistenzphanomene einzelner Pflanzen gegenüber dem phytotoxischen Wirkstoff Simazin. *Experientia* 17 : 312-313.
- Reimann, J.E & R.U. Bjerrum (1964) Studies on the biosynthesis of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Biochemistry* 3: 847-850.
- Shimabukuro, R.H., H.R. Swanson and W.C. Walsh (1970) Glutathione conjugation. Atrazine detoxification mechanism in corn. *Plant Physiol.* 46: 103-107.
- Silverstein, R.M., C.G. Bassler & T.C. Morrill (1974) *Spectrometric identification of organic compounds*. 3a. ed. Wiley & Sons, New York.
- Simcox, K.D. & D.F. Weber (1985) Location of the benzoxazinless (bx) locus in maize by monosomic and B-A translocational analyses. *Crop Sci.* 25: 827-830.
- Sluyterman, L.A.E. (1968) The rate limiting reaction in papain action as derived from the reaction of the enzyme with chloroacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 151: 178.
- Sluyterman, L.A.E (1981) Chemical aspects of proteolysis and of substrate specificity. *Neth. Milk Dairy J.* 35: 209-221.
- Smisson, E.E., M.D. Corbett, N.A. Jenny and O. Kristiansen (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: 1700-1704.
- Tipton, C.L. & E.L. Buell (1970) Ferric iron complexes of hydroxamic acids from maize. *Phytochemistry* 9: 1215-1217.
- Tipton, C.L., J.A. Klun, R.R. Husted & M.D. Pierson (1967) Cyclic hydroxamic acids and related compounds from maize. Isolation and characterization. *Biochemistry* 6: 2866-2870.

- Tipton, C.L., M.C. Wang, F.H.C. Tsao, C.C. Lin Tu & R.R. Husted (1973) Biosynthesis of 1,4-benzoxazin-3-ones in Zea mays. *Phytochemistry* 12: 347-352.
- Virtanen, A.I & P.K. Hietala (1960) Precursors of benzoxazolinone in rye plants. *Acta Chem. Scand.* 14: 502-504.
- Vogel, E (1978) Textbook of practical organic chemistry. 4a. ed., Longman, London.
- Whitaker, J.R. & M.R. Bender (1965) Kinetics of papain-catalyzed hydrolysis of α -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester and α -N-benzoyl-L-argininamide. *J. Amer. Chem. Soc.* 87: 2728-2737.
- Willard, J.I. & D. Penner (1976) Benzoxazinones: cyclic hydroxamic acids found in plants. *Residue Rev.* 64: 67-76.
- Williams, D.C. & J.R. Whitaker (1967) Kinetics of papain-catalyzed hydrolyses of neutral substrates. *Biochemistry* 6: 3711-3717.
- Woodward, M.D., L.J. Corcuera, J.P. Helgeson & C.D. Upper (1978) Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3-one in aqueous solution. *Plant Physiol.* 61: 796-802.
- Woodward, M.D., L.J. Corcuera, H.K. Schnces, J.P. Helgeson & C.D. Upper (1979a) Identification of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize extracts by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiol.* 63: 9-13.
- Woodward, M.D., L.J. Corcuera, J.P. Helgeson, A. Kelman & C.D. Upper (1979b) Quantitation of 1,4-benzoxazin-3-ones in maize by gas-liquid chromatography. *Plant Physiol.* 63: 14-19.