

# Efecto de fenoles y $Mn^{2+}$ sobre la degradación de ácido indole-3-acético catalizada por peroxidasa

POR

MANUEL ACOSTA ECHEVERRIA

## ABSTRACT

The peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid is either activated or inhibited by phenolics compounds. The overall effect of these cofactors depends on their concentrations. Low concentrations of phenols such as 2,4-dichlorophenol or resorcinol greatly promote auxin degradation, whereas high concentrations inhibit it.  $Mn^{2+}$  salts prevent the inhibition observed when high monophenol concentrations are used. Activation is such remarkable that the reaction rate can be enhanced as much as a hundred times. Since indole-3-acetic acid is a relatively slow substrate for peroxidase, the coupled oxidation of phenols can thus be viewed as a very effective regulatory system for plant growth. These reactions have thus been investigated using several techniques including spectrophotometry, chromatography, polarography and rapid mixing (stopped-flow spectroscopy). Activation occurs when peroxidase Compound II is the enzymatic compound responsible for indole-3-acetic acid oxidation. The reaction becomes inhibited under conditions where peroxidase Compound III is formed.

Oxidation of indole-3-acetic acid or indole-3-butyric acid by peroxidase, in the presence of  $H_2O_2$  is affected by monophenols such as

La presente memoria contiene, en su mayor parte, el conjunto de resultados obtenidos en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal (Centro de Luminy) de la Universidad de Marsella durante el curso 1977-78, bajo la dirección del profesor doctor Jacques Ricard y en colaboración con el doctor Dominique Job. Este trabajo se ha podido llevar a cabo gracias a la beca de investigación postdoctoral concedida por la Fundación Cultural Privada «Esteban Romero», de la Universidad de Murcia.



2,4-dichlorophenol. The enhancement in the reaction rate is very similar to that observed for the reaction in the absence of  $H_2O_2$ . Since in the presence of  $H_2O_2$  the only enzymatic compounds formed are Compounds I and II, these results confirm the fact that for the reaction carried out in the absence of  $H_2O_2$  it is peroxidase Compound II which is responsible for promotion of indole-3-acetic acid oxidation and not peroxidase Compound III. Both indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, and monophenols are substrates of peroxidase in the presence of  $H_2O_2$  and at neutral pH values 2,4-dichlorophenol reacts about 100 times faster with Compounds I and II than does indole-3-butyric acid. This would suggest that the reaction between enzymatic compounds and monophenols produces phenoxy radicals able to oxidize indole-3-acetic acid or indole-3-butyric acid. 2,4-dichlorophenol and indole-3-butyric acid bind competitively to the same site of peroxidase which might in part explain the inhibition of indole-3-acetic acid oxidation, in the absence of  $H_2O_2$ , observed when high phenol concentrations are used.

Reaction mechanisms based upon the preferential reactivity of the phenols for the various peroxidase compounds are proposed to explain these events.

## RESUMEN

La oxidación del ácido indol-3-acético catalizada por peroxidasa es activada o inhibida por compuestos fenólicos. El efecto global de estos cofactores depende de su concentración. Fenoles del tipo 2,4-diclorofenol o resorcinol en bajas concentraciones promueven notablemente la degradación de la auxina, mientras que en grandes concentraciones la inhiben. Las sales de  $Mn^{2+}$  evitan la inhibición observada cuando se usan las concentraciones altas de monofenol. La activación es tan notable que la velocidad de reacción puede llegar a aumentarse hasta cien veces. Puesto que el ácido indol-3-acético es un sustrato relativamente lento para la peroxidasa, la oxidación de fenoles acoplada puede considerarse como un sistema regulador muy efectivo en el crecimiento vegetal. Estas reacciones se han investigado usando técnicas diversas como: espectrofotometría, cromatografía, polarografía y espectroscopía de flujo detenido (mezcla rápida de reactivos). La activación tiene lu-



gar cuando el Compuesto II de peroxidasa es la especie enzimática responsable de la oxidación del ácido indol-3-acético. La reacción llega a inhibirse en las condiciones en que se forma el Compuesto III de peroxidasa.

La oxidación de los ácidos indol-3-acético o indol-3-butírico por peroxidasa, en presencia de  $H_2O_2$ , también se ve afectada por monofenoles como el 2,4-diclorofenol. El aumento en velocidad de reacción es muy similar al observado para la reacción realizada en ausencia de  $H_2O_2$ . Puesto que en presencia de  $H_2O_2$  las únicas especies enzimáticas formadas son los Compuestos I y II, estos resultados confirman el hecho de que para la reacción llevada a cabo en ausencia de  $H_2O_2$  sea el Compuesto II de peroxidasa el responsable de la promoción en la oxidación del ácido indol-3-acético y no el Compuesto III. Tanto los ácidos indol-3-acético e indol-3-butírico como los monofenoles son sustratos de peroxidasa en presencia de  $H_2O_2$  y a valores de pH neutros, el 2,4-diclorofenol reacciona unas cien veces más rápido que el ácido indol-3-butírico con los Compuestos I y II. Esto sugiere que la reacción entre los compuestos enzimáticos y los monofenoles produce radicales fenoxi capaces de oxidar al ácido indol-3-acético o al ácido indol-3-butírico. El 2,4-diclorofenol y el ácido indol-3-butírico se unen competitivamente al mismo sitio en la peroxidasa, lo que puede explicar, en parte, la inhibición en la oxidación del ácido indol-3-acético, en ausencia de  $H_2O_2$ , observada cuando se usan concentraciones elevadas de fenol.

Proponemos unos mecanismos de reacción que explican estos hechos, basados en la reactividad preferencial de los fenoles por los diversos compuestos de peroxidasa.

## PARTE TEORICA

### INTRODUCCION

#### CRECIMIENTO DE LA CÉLULA VEGETAL

El crecimiento de un ser vivo, animal o vegetal, puede definirse como un «aumento irreversible de volumen». Además, otros cambios pueden tener lugar o no, pero la definición anterior constituye la respuesta mínima (1) (2).

Este proceso, en un órgano vegetal, resulta de la integración de dos fenómenos elementales: la división (meresis) y el agrandamiento (auxesis) de las células. Un simple incremento elástico en volumen debido

a un aumento de turgor no constituye crecimiento, ya que es un proceso reversible, como tampoco lo es la simple división celular, ya que la formación de un tabique o pared cruzando la célula no la hace más grande de lo que era.

En las plantas superiores la división celular se realiza, básicamente, en las llamadas zonas meristemáticas, mientras que el agrandamiento tiene lugar a una cierta distancia de ellas. En este último proceso juega un papel decisivo la *pared celular*, que es una envoltura característica que presta rigidez a la célula vegetal.

Por definición, al tipo de pared susceptible de agrandamiento se la denomina *pared primaria* y está constituida por una red de microfibrillas de celulosa, dispuestas en una matriz de hemicelulosas y sustancias pécticas. Los *depósitos secundarios* de lignina, cutina y otros materiales hacen a la pared demasiado rígida para que se agrande.

La pared primaria posee características elásticas, estirándose hasta un máximo bajo la influencia de la presión de turgor y contrayéndose hasta su tamaño original cuando tal presión cede. Se deduce, por tanto, que para que tenga lugar el agrandamiento irreversible que hemos definido como crecimiento tendrá que disminuir la rigidez, es decir, la pared debe hacerse más plástica; entonces la presión normal de turgor ayudará al estiramiento y el volumen celular quedará incrementado permanentemente.

Buscar el determinismo del crecimiento consistirá, por tanto, en definir los mecanismos que aseguren el desarrollo y control de tales procesos, los cuales no pueden tener lugar de una manera anárquica en la mayoría de los casos, sino según un programa muy preciso. Como las células de un mismo organismo eucariótico encierran todas la misma información genética, el crecimiento implica un control estricto de la actividad de los genes y de las síntesis de proteínas.

Unas sustancias, las *hormonas*, cuyo sitio de acción, comúnmente, está alejado del lugar donde se sintetizan, participan en la regulación de la expresión genética, bien a nivel de transcripción o bien de traducción; existiendo, además, la posibilidad de que su mecanismo de acción desencadene reacciones a más corto plazo, sin necesidad de pasar obligatoriamente por el núcleo celular.

Entre los diversos grupos de hormonas conocidas actualmente las llamadas *auxinas* son las que nos interesan por estar directamente relacionadas con los fenómenos que modifican la plasticidad de la pared celular, permitiendo el aumento del volumen celular.

Las investigaciones hasta ahora realizadas nos permiten saber que hay dos tipos de respuesta a la auxina (3):

- A largo plazo (30 minutos a una hora como mínimo) y que afecta a la síntesis de proteínas.
- A corto plazo (entre 5 y 12 minutos), activando un sistema modificador de la estructura de la pared.

La opinión generalizada indica que una vez fijada la auxina sobre su receptor específico (4) (5) (6), se pondría en marcha un mecanismo de flujo protónico (quizá por activación de una ATP-asa específica) (7) que al entrar en contacto con la pared afectaría a los enlaces débiles que unen las fibrillas de celulosa a la matriz y que serían sensibles al descenso de pH. Otra alternativa es que se produjese una activación de los enzimas hidrolíticos fijados a la pared por alcanzarse su pH óptimo de acción.

En cualquier caso, el efecto observado consiste en desplazamientos de orientación en las microfibrillas y debilitamiento general de las fuerzas de cohesión de la pared. Por entrada de agua, la célula se dilata y es preciso restaurar de nuevo la estructura de la pared sintetizando nuevos materiales, pudiendo ser aquí donde se manifieste la segunda respuesta, a largo plazo, provocada por la hormona.

La auxina natural más característica, ampliamente difundida en el reino vegetal, es el *ácido indol-3-acético* (AIA).

#### REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EN ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

Para el desarrollo coordinado de los distintos órganos de una planta es preciso que los mensajeros hormonales se distribuyan en el momento adecuado y en concentraciones óptimas para inducir el efecto requerido.

Una de las cuestiones más interesantes que se plantean sobre el mecanismo de acción del ácido indol-3-acético es la de conocer los mecanismos para regular su conservación. En principio, se piensa que hay tres formas de mantener el nivel necesario de auxinas:

- Biosíntesis.
- Unión a otras moléculas con modificación de propiedades.
- Degradación.

#### *Biosíntesis*

La auxina típica, el ácido indol-3-acético, se sintetiza en las plantas a partir del aminoácido triptófano y a través de varias etapas que implican fundamentalmente procesos de descarboxilación, desaminación y oxidación. La secuencia de estas operaciones puede alterarse de una

especie a otra, aunque también pueden coexistir en una misma planta dos de estas permutaciones como vías alternativas o bien, como en el caso de las *Brasicáceas*, tener una secuencia propia (8).

Esta biosíntesis puede tener lugar dentro de cada célula individualmente; sin embargo, se sabe que existen zonas donde este proceso es más intenso, por ejemplo en el ápice de una planta en crecimiento. Ello implica la posibilidad de transporte a otras zonas inferiores y por tanto la existencia de gradientes o incluso concentraciones de acción óptimas, con lo cual el problema de la regulación de la síntesis no es algo que atañe simplemente a la reacción en sí y a los productos que por retroacción podrían dirigirla, sino más bien hay que pensar en la naturaleza de los órganos específicos e incluso en factores ambientales (luz, temperatura, etc.).

### *Reacciones de condensación*

Hace tiempo que se conoce la existencia en las plantas de formas ligadas de las auxinas con otras sustancias, como azúcares, aminoácidos o macromoléculas (9) (10) (11).

Lo que no está claro aún es el papel fisiológico de dichas condensaciones. Algunos autores (12) han relacionado la acumulación de estas sustancias y los procesos de crecimiento, mientras que otros (13) estudian su implicación en el transporte de auxinas.

Algunas de las conjugaciones especialmente estudiadas han sido las del ácido indol-3-acético y el ácido aspártico (14) y las del indol-3-acético con mio-Inositol y glucosa (15). Respecto al primer caso, es interesante hacer notar que se ha observado la estimulación inducida por ácido indolacético de la síntesis de un enzima de conjugación: indol-acetilaspártato sintetasa (16).

Una secuencia de reacciones para la condensación, en la que se implican ATP y coenzima A, ha sido dada por Zenk (17).

### *Degradación*

La destrucción de la auxina que exceda un determinado nivel o innecesaria una vez cumplida su misión fue la forma de regulación más sugestiva cuando se profundizó en el modo de acción de estas hormonas vegetales. El proceso es, por otra parte, típico como detoxificación, ya que se trata de una reacción enzimática de oxigenación, al igual que en numerosos organismos en que se eliminan productos innecesarios mediante hidroxilaciones.

## SISTEMAS ENZIMÁTICOS RELACIONADOS CON EL PROCESO DEGRADATIVO

Thimann, en 1934 (18), realizó las primeras observaciones que le indujeron a pensar que había un sistema enzimático implicado en el proceso de destrucción del ácido indol-3-acético, confirmándolo con posterioridad Larsen en 1936 (19) y 1940 (20), destacando la necesidad de oxígeno. Tang y Bonner, en 1947 (21), estudian numerosas características del enzima: consumo de oxígeno, inhibición de la actividad por cianuro y monóxido de carbono (en la oscuridad), etc., llegando a la conclusión de que se trataba de una *hemoproteína*. Sin embargo, se ha mantenido una controversia importante acerca del tipo de enzima implicado, pues se han dado variaciones sobre su naturaleza según el material usado, métodos de extracción y purificación, medida de actividad, etc.

Hoy se acepta que el ácido indol-3-acético puede ser oxidado por peroxidasas vegetales (en presencia o ausencia de  $H_2O_2$ ) (8), pero dada la enorme variedad de isoenzimas que presentan y su diferente afinidad por el ácido indol-3-acético, es difícil adoptar un criterio definitivo, pudiendo establecerse cuatro categorías básicas de isoenzimas en base a sus actividades relativas como peroxidasas o AIA-oxidasas:

1. Peroxidasas típicas que catalizan reacciones de peroxidación con gran efectividad, pudiendo también oxidar el AIA en ausencia de  $H_2O_2$  añadido, aunque más lentamente; por ejemplo, la peroxidasa de rábano, conocida como HRP.
2. Enzimas que son efectivos tanto en la peroxidación como en la oxidación del AIA; por ejemplo, la peroxidasa  $P_7$  de nabo (22).
3. Enzimas que muestran actividad peroxidasa pero carecen de AIA-oxidasa; se les ha caracterizado mediante separaciones electroforéticas en extracto de raíces (23) (24) (25), cultivo de callos de «Pharbitis» (26) y frutos de pera (27).
4. AIA-oxidasas carentes de actividad peroxidasa; Sequeira y Mineo (28) encontraron un pico de actividad AIA-oxidasa después de filtración a través de gel de una preparación de raíces de tabaco y de HRP cristalina, que no mostraba actividad peroxidasa frente al guayacol. También Van der Mast (29) encontró dos fracciones de AIA-oxidasa en raíces de guisante, una de las cuales no presentaba actividad peroxidasa.

Para precisar de algún modo la localización de los sitios activos de peroxidasa y AIA-oxidasa dentro del mismo enzima (HRP), Siegel y Galston (30) intentaron separar el grupo prostético hemo del resto de la proteína mediante un tratamiento con acetona en medio ácido, en-

contrando que el apoenzima aún conservaba la actividad AIA-oxidasa, pero había perdido su actividad frente a sustratos peroxidásicos como el guayacol. La actividad peroxidasa podría restaurarse, parcialmente, recombinando el apoenzima y el grupo hemo.

Sin embargo, Ku, Yang y Pratt (31) encontraron que si se empleaba butanona en medio ácido para separar el grupo hemo, entonces el apoenzima no presentaba la actividad AIA-oxidasa. Sugirieron que en las experiencias de Siegel y Galston debía quedar un pequeño resto de enzima no disociado, que era separado junto con el apoenzima (el uso obligatorio de efectores para poner de manifiesto la actividad AIA-oxidasa confirmaba esta posibilidad).

Para generalizar el comportamiento de estas hemoproteínas, Ricard, Mazza y Williams (22) han sugerido que puede existir una secuencia de proteínas con grupos progresivamente menos ácidos situados en la vecindad del grupo hemo, lo que se asociaría a un cambio en actividad, desde la activación de peróxidos (más ácido) hasta activación del oxígeno y transporte del oxígeno (más básico).

En la bibliografía se encuentran también datos sobre la degradación del AIA por otras hemoproteínas distintas de peroxidasa, aunque se considera que los resultados tienen poca significación fisiológica. Es el caso de la catalasa de hígado de buey (32), que requiere la presencia obligatoria de un monofenol y  $Mn^{2+}$  en altas concentraciones para actuar; también la leghemoglobina (33), presente en nódulos de leguminosas, puede catalizar la oxidación del AIA, pero el proceso es muy lento y la afinidad del enzima por el sustrato es muy escasa.

Más interés pueden presentar los sistemas basados en oxigenasas para achacarles un papel en la oxidación del AIA y así Manning y Galston (34) encontraron ciertos productos de oxidación en los que aparecía roto el anillo indólico del AIA, de ahí que hablasen de una *dioxigenasa* semejante a la que cataliza el paso de triptófano a formilcinurenina. También son conocidos aquellos sistemas que recurren a una *monooxigenasa*, tal como tirosinasa o fenol-oxidasa, para explicar la oxidación del AIA (35) (36). No está claro si en estos procesos es el ácido indolacético un sustrato específico del enzima o su degradación tiene lugar por una vía paralela a través de interacciones con radicales libres, ya que en los ensayos hechos se requiere la presencia obligada de difenoles que acortarían el período de latencia inicial, típico de estas monooxigenasas.

Algunas de estas actividades podrían coexistir, junto a las peroxidases, en determinadas situaciones (heridas o infecciones en plantas), pero resulta más sugestivo asignarles una función fisiológica en el caso

de aquellos materiales vegetales carentes de actividad peroxidasa, pero abundantes en cualquiera de las otras.

Por último, no puede por menos que apuntarse la posibilidad de que enzimas hidroxilantes y con una neta función detoxificadora sean los encargados de la degradación del AIA en plantas, de modo similar al citocromo P-450 tan estudiado en animales y microorganismos. Aunque en plantas tal enzima sólo se ha relacionado con el sistema PAL (fenilalanina-amoniaco-liasa) y las reacciones de hidroxilación que conducen a la obtención de muchas sustancias fenólicas, no es gratuito pensar en él, al menos para hacer estudios comparativos entre su actividad y la que pueden presentar las peroxidasas, en determinadas circunstancias, como activadoras del oxígeno y utilizadores de anión superóxido (ver más adelante las características del compuesto III de peroxidasa).

#### PEROXIDASAS VEGETALES: MECANISMO DE ACCIÓN Y COMPUESTOS INTERMEDIOS

Son enzimas de naturaleza glicoproteica, con protohematina IX como grupo prostético, estando el hierro en forma férrica normalmente.

La masa molecular de estas hemoproteínas, que están constituidas por una sola cadena polipeptídica, varía de 30.000 hasta 50.000.

Pueden presentarse como isoenzimas de características distintas, separables por electroforesis, pudiendo diferir de modo apreciable en sus afinidades por los mismos sustratos (37) (38).

Su distribución dentro de la célula vegetal es muy amplia (39), estando presentes en todas las fracciones subcelulares, tanto ligadas como solubles.

Su espectro presenta un máximo de gran absorbancia a 403 nm y otros dos picos de menor intensidad a 500 nm y 640 nm.

Las propiedades funcionales de las peroxidasas están condicionadas por el entorno del hierro en el grupo hemo y más particularmente por la naturaleza de los ligandos que ocupan las posiciones de coordinación 5.<sup>a</sup> y 6.<sup>a</sup> del metal. Parece, según estudios físico-químicos detallados, que dichos ligandos son, respectivamente, un residuo de histidina y una molécula de agua.

Algunas propiedades de las peroxidasas radican en sus potenciales de óxido-reducción, que son muy bajos (a pH = 7), comprendidos entre  $-0,3$  V y  $-0,1$  V y que pueden variar notablemente de una isoperoxidasa a otra.

Otra propiedad de las peroxidasas es su capacidad, cuando están en forma reducida, de fijar el oxígeno molecular para formar un compuesto bastante similar a la oximioglobina, denominado Compuesto III. Contrariamente a la oximioglobina, que es únicamente un sistema de transporte del oxígeno, el Compuesto III es un sistema de activación del oxígeno molecular, ya que corresponde a un equilibrio entre las dos formas:



La estabilidad del Compuesto III depende de la naturaleza de la peroxidasa considerada. Parece que las peroxidasas que poseen el potencial de óxido-reducción más elevado poseen también la propiedad de formar un Compuesto III estable.

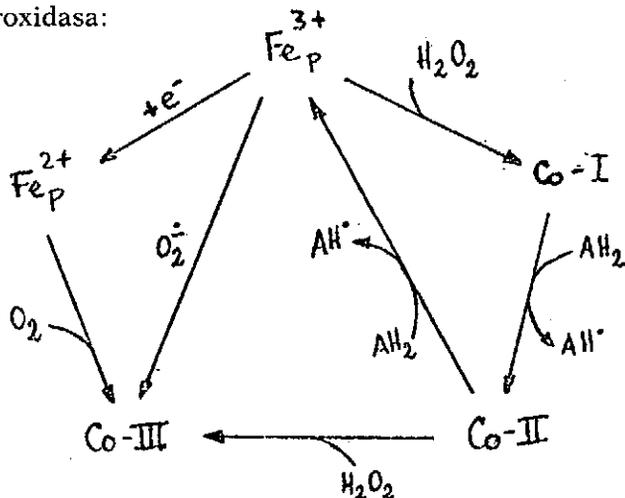
Las peroxidasas, como su nombre indica, pueden reaccionar con los peróxidos y en particular con el agua oxigenada. Pueden, bajo su forma férrica, condicionar la oxidación de numerosas sustancias que pueden servir como donadores de electrones; es de destacar la alta especificidad por el aceptor de electrones y su extremadamente baja especificidad por el dador de electrones.

El mecanismo de estas reacciones, que se designa bajo el nombre de *peroxidación*, ha sido estudiado especialmente por Chance (40) y George (41) (42).

Las reacciones se realizan a través de la formación de compuestos intermedios más activos, con grados de oxidación superiores obtenidos al adicionar peróxidos. Se conocen los llamados:

- Compuesto I, con grado de oxidación + 5.
- Compuesto II, con grado de oxidación + 4.
- Compuesto III, con grado de oxidación + 6.

Las interrelaciones entre ellos pueden observarse en el siguiente cuadro (2), en el que cabe destacar las distintas posibilidades de obtener el Compuesto III, aparte de la forma ya indicada por reducción de Ferriperoxidasa:

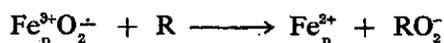


Donde  $Fe_p^{3+}$  y  $Fe_p^{2+}$  representan a ferriperoxidasa y ferroperoxidasa, respectivamente; Co-I, Co-II y Co-III son los compuestos intermedios activos de peroxidasas;  $AH_2$  es un donador de electrones ( $e^-$ ) y  $AH^\cdot$  su radical libre;  $O_2^-$  es el anión superóxido.

En presencia de  $H_2O_2$  las reacciones transcurren fundamentalmente a través de Co-I y Co-II según el ciclo triangular de la derecha, apareciendo Co-III en circunstancias particulares.

El compuesto III puede reaccionar de dos maneras con los donadores de electrones (R):

1) Por reducción del hierro férrico, lo que implica la liberación del ion radical superóxido; o lo más frecuentemente, su incorporación en el donador y la oxigenación de éste:



2) Por reducción del Compuesto III, primero hasta Compuesto I y después hasta Compuesto II.

#### LAS REACCIONES DE DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

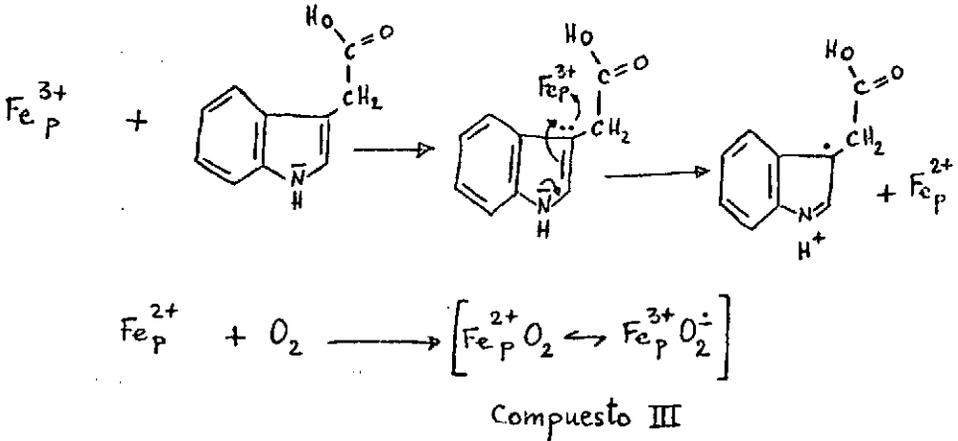
La oxidación de la hormona del crecimiento vegetal, el ácido indol-3-acético (AIA) por peroxidasas purificadas, en ausencia de  $H_2O_2$  añadido ha sido el foco de numerosas investigaciones desde su descubrimiento

Se han propuesto diversos tipos de mecanismos para explicar la peculiaridad de esta reacción (44) (43) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53). La principal diferencia entre ellos reside en el hecho de si el proceso oxidativo implica o no la participación directa del enzima.

Mecanismos de tipo radical en los que los radicales libres de AIA reducen el  $O_2$  hasta anión superóxido o peróxido de hidrógeno, no son satisfactorios, ya que ni superóxido-dismutasa ni catalasa afectan a la velocidad de reacción. La participación «in vivo» de la forma desnaturalizada de peroxidasas, el compuesto P-670, es cuestionable, ya que por Kenten en 1955 (3).

las peroxidasas se extraen invariablemente de los tejidos vegetales conteniendo el grupo prostético ferriprotoporfirina IX.

Morita et al. (54) y Ricard y Job (55) han mostrado que bajo condiciones experimentales particulares (relación [sustrato]/[enzima] baja, pH ácido) el proceso puede ser controlado enzimáticamente. El intermedio clave en esta secuencia es el Compuesto III, la forma oxigenada de la Ferroperoxidasa:



El producto final de esta reacción del Co-III con el AIA es el *indol-3-aldehído*.

Sin embargo, incrementando la relación [sustrato]/[enzima] o el valor del pH del medio de reacción hasta 6, el enzima se desvía de la secuencia anterior:

Se forma Compuesto II (el intermedio enzimático típico en los mecanismos de peroxidación) y el producto final de la degradación del sustrato es *3-metilenoxindol*, tal como sucede no-enzimáticamente (49) o en presencia de peroxidasa y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Puede apreciarse, por tanto, que hay, aparentemente, dos mecanismos distintos; el que hemos indicado en segundo lugar se desarrollaría a través de un proceso típico de peroxidación, mientras que el primero corresponde a un proceso de oxigenación que permite relacionar a las peroxidases con las oxigenasas. Es de destacar, asimismo, la estructura diferente de los dos productos de reacción mayoritarios.

Las diversas isoperoxidasas presentes en las células vegetales pueden realizar, a velocidades diferentes, los procesos de degradación

del AIA. Estos procesos no corresponden ni a reacciones de peroxidación ni a reacciones de oxigenación típicas.

En razón del potencial de óxido-reducción muy bajo de la mayoría de las peroxidasas, la reacción de transferencia de un electrón entre el AIA y el enzima resulta ser la etapa limitante del proceso.

Además, de los experimentos realizados para este trabajo se deduce que la reacción es muy lenta y así, por ejemplo, con una concentración en peroxidasa 3,5 nM e indol-3-acético  $3 \times 10^{-4}$  M, se necesitan 1.200 minutos, aproximadamente, para destruir el 50 % del sustrato.

## EFACTORES

Numerosos autores utilizan en la medida de la actividad AIA-oxidasa dos sustancias adicionales en el medio de reacción: se trata, por lo general, de un monofenol u otro grupo con características similares e iones  $Mn^{2+}$  en forma de sales de cloruro o sulfato.

Por ejemplo, usando las mismas concentraciones de peroxidasa y AIA que en el apartado anterior y con 2,4-diclorofenol (DCP) 20 nM, se reduce el tiempo de reacción de modo que se tardan unos 20 minutos en lograr el mismo efecto. Con  $Mn^{2+}$  además de fenol, aún sería más rápida la reacción. Para evitar la confusión de términos (cofactor, acelerador, activador, inhibidor, protector, etc.) al hablar de estas sustancias, P. E. Pilet (56) ha propuesto el término de *efectores* que designa a toda sustancia que modifique la actividad de los enzimas controladores del catabolismo auxínico, siendo su poder efector positivo o negativo. De todas formas, esta clasificación no excluye que ciertos compuestos puedan ser efectores positivos a ciertas concentraciones y efectores negativos a otras.

En nuestro caso, junto a la denominación del efector, utilizamos la de *cofactores*.

Algunos de los primeros investigadores (57) del sistema enzimático notaron que los extractos crudos contenían un cofactor soluble que promovía notoriamente la actividad oxidante. En un principio se pensó que el ácido 2,4-Diclofenoxiacético (2,4-D) era el promotor de la degradación del AIA, pero más adelante se vio que dicho efecto lo causaba el 2,4-diclorofenol presente como impureza en el 2,4-D.

A partir de entonces se encontraron numerosos fenoles sustituidos que actuaban de igual modo, observándose que la halogenación favorecía aún más el incremento de actividad, mientras que los grupos nitro- y metoxi- la prevenían (58), deduciéndose de todo ello que el cofactor natural presente en los extractos crudos de plantas tenía natu-

raleza fenólica o se comportaba como un fenol. Más tarde se añadió, en apoyo de la tesis anterior, la identificación de los cofactores presentes en tejidos de piña, que resultaron ser los ácidos p-cumárico y ferúlico (59); también se observó el potente efecto del ácido p-hidroxibenzoico tanto en la reducción del crecimiento de segmentos de plántulas puestos en AIA, como en el incremento simultáneo de la velocidad de descarboxilación de la auxina.

Por otra parte, se conoce desde hace tiempo que aquellos polifenoles que actúan como sustratos de peroxidasa, guayacol o pirogalol (60) inhibían la actividad AIA-oxidasa. También tales compuestos sinergizan la acción del AIA (promueven la elongación) en los ensayos de curvatura en «Avena».

De todos estos resultados se dedujo:

- Los monofenoles, como grupo, promueven la oxidación enzimática del AIA.
- Los difenoles o polifenoles son igualmente activos, pero en la inhibición del sistema.

La introducción de sales de  $Mn^{2+}$  en la medida de la actividad AIA-oxidasa se debe a los trabajos de Wagenknecht y Burris (61) y a las investigaciones de Kenten y Mann (62) (63) (64) (65) acerca de la oxidación del  $Mn^{2+}$  por extractos de plantas, en presencia de  $H_2O_2$ , o por peroxidasa; así como la oxidación de ciertos ácidos dicarboxílicos por sistemas peroxidasa, en presencia de Manganeseo. Estos autores encontraron que la actividad enzimática se incrementaba cuando a los medios de reacción que ya contenían como cofactor un monofenol se añadían iones  $Mn^{2+}$ .

R. H. Kenten (43) propuso un mecanismo que relacionaría las interacciones entre ambos compuestos en un sistema degradativo del AIA por peroxidasa. Dicho mecanismo fue ampliado por Waygood y MacLachlan (45).

Pero el uso indiscriminado del  $Mn^{2+}$  con la intención de aumentar la actividad de extractos crudos produjo resultados contradictorios, ya que a veces, en lugar de activar, inhibía la degradación del AIA. Por ello, Hillman y Galston (66) estudiaron el efecto de los dos cofactores a través de un amplio rango de concentraciones para uno y otro, deduciendo que las discrepancias se debían al uso de preparaciones enzimáticas que contenían niveles diferentes de cofactor fenólico endógeno.

Stutz (67) estudió el efecto de DCP y  $Mn^{2+}$  sobre extractos de altramuz, cuando éstos eran crudos o cuando se sometían a diálisis.

Gaspar y Dinant (68) hacen una revisión crítica de la literatura procedente publicada con relación a este tema y estudian a su vez las inter-

acciones entre  $Mn^{2+}$ , DCP, peroxidasa y catalasa en la destrucción del AIA.

Se puede deducir de estos trabajos iniciales que la presencia de los efectores puede resultar beneficiosa para la planta, modulando la actividad de las peroxidasas con capacidad AIA-oxidasa; sin embargo, los *mecanismos* propuestos para explicar su efecto no son satisfactorios, ya que muchos de ellos implican reacciones con radicales libres en los que el enzima sólo se usa para iniciar la reacción, siendo oxidado el sustrato, bien por  $Mn^{3+}$  (69), o bien por radicales libres del fenol (48) (47) (70). Tales radicales son detectables mediante el uso de compuestos radicales estables de gran volumen molecular como el difenil-picril-hidracilo (DPPH) (71) (72), pero su presencia y efecto pueden relacionarse con los compuestos intermedios activos de peroxidasas.

El mecanismo de acción de los difenoles ha sido mejor estudiado que el de los monofenoles, conociéndose a grandes rasgos las causas y lugares de su inhibición, expuestas en modelos debidos a Gelinas (73), Macháčková et al. (74) y T. T. Lee (75).

La importancia fisiológica de este tipo de investigación estriba en el conocimiento de los mecanismos que pueden regular a nivel molecular el crecimiento de las plantas, pues «in vivo» los fenoles pueden actuar como antagonistas o sinergistas de las auxinas y ya hemos visto que tal efecto podría estar relacionado con el papel de dichos fenoles en la regulación de la actividad AIA-oxidasa de las peroxidasas. En este sentido se publican diversos tipos de trabajos (76) (77), algunos de los cuales proponen la definición de un modelo experimental que explique el papel de los polifenoles en el crecimiento o su efecto sobre el transporte polarizado de la auxina (78) (79).

## PARTE EXPERIMENTAL

### MATERIALES Y METODOS

Se ha utilizado peroxidasa de rábano (HRP) (E.C. 1.11.1.7) de doble procedencia. Una muestra se adquirió a Calbiochem, grado B, RZ ( $A_{403}/A_{275}$ ) = 0,71, en forma de polvo liofilizado, disolviéndose en tampón fosfato 0,1 M, pH 6,3. La segunda muestra era de Fluka y se purificó (80) hasta HRP-C para obtener un RZ final de 3. Se obtuvieron resultados similares con las dos preparaciones. Las concentraciones de peroxidasa se determinaron espectrofotométricamente a 403 nm, usando una absortividad molar de  $1,02 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$  (81). El  $H_2O_2$  se valoró iodométricamente (82). Los tampones (fosfato o citrato-fosfato, según

la conveniencia) se prepararon con materiales de grado R. A. Todas las disoluciones se hicieron con agua bidestilada.

El consumo de oxígeno se midió polarográficamente usando un oxígrafo YSI en combinación con un electrodo Clark. Los medios típicos de reacción incluían: AIA  $3 \times 10^{-4}$  M; tampón fosfato-Na  $6 \times 10^{-2}$  M, pH 6,3 y concentraciones variables de HRP, DCP y  $Mn^{2+}$  hasta un volumen final de 3 ml. Todos los medios se saturaban con aire. Las reacciones se desarrollaron a 30° C, con agitación constante.

Los productos de reacción se extraían tres veces con éter. Los extractos se concentraron «in vacuo» a temperatura ambiente. La cromatografía en papel se verificó usando papel Whatman núm. 1 y como disolvente isopropanol-agua (5 : 95; v/v). Las manchas de los productos sobre el papel del cromatograma se detectaron por fluorescencia con luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm). La cuantificación de los productos se hizo espectrofotométricamente después de extracción con metanol, a 250 nm para 3-metilenoxindol, 280 nm para indol-3-metanol y 295 nm para indol-3-aldehído.

Las medidas de absorbancia se efectuaron con un espectrofotómetro Cary 15 y con un espectrofotómetro Beckman Acta M VII, termostatzados a 30° C.

Los experimentos de flujo detenido (stopped-flow) se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro Durrum (Durrum-Modelo D 110). El sistema colector de datos ha sido descrito en (83). Los Compuestos I y II de peroxidasa se prepararon inmediatamente antes de los experimentos cinéticos (82), usando cantidades equimoleculares de enzima,  $H_2O_2$  y sustrato. Una jeringa conductora contenía Compuesto I o Compuesto II aproximadamente 2,1  $\mu$ M en  $NO_3K$  0,1 M y la otra contenía unas diez veces más sustrato que compuesto enzimático, en tampón 0,01 M +  $NO_3K$  0,1 M. Las reacciones se seguían a 420 nm (etapa de reducción de Compuesto I) y a 427 nm (etapa de reducción de Compuesto II). Bajo estas condiciones se vio que todas las curvas cinéticas registradas eran de primer orden. Las constantes de velocidad de pseudo-primer orden observadas eran directamente proporcionales a la concentración de sustrato a pH fijo y los valores de las constantes de velocidad de segundo orden se calcularon a cada pH estudiado.

Después de la reacción, las disoluciones se recogieron para medirles el pH con un pH-metro Metrohm Digital E532 en combinación con un electrodo Metrohm, calibrado con disoluciones tampón tipificadas de Merck.

## RESULTADOS

### ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO

#### *Reacción de oxidación*

La reacción se sigue a 254 nm (productos de oxidación del AIA). El efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción, tanto en ausencia como en presencia de cofactores, se indica en la tabla 1. Puede observarse que el mejor sistema promotor es la combinación  $Mn^{2+} + DCP$  que permite la oxidación efectiva del AIA a concentraciones de HRP tan bajas como 0,2 nM. A 0,6 nM en enzima, la degradación del AIA en presencia de  $Mn^{2+} + DCP$  es tan eficiente como con 330 nM de HRP sólo. Cuando se les usa separadamente,  $Mn^{2+}$  inhibe ligeramente la reacción, mientras que DCP la promueve. En presencia de este cofactor existe una concentración óptima de enzima, superada la cual se presenta una inhibición.

A una concentración de enzima fija, DCP afecta la velocidad inicial de la reacción (figura 1). En esta figura también se representan los cambios de absorbancia medidos a 254 nm, después de doce horas de reacción, frente a la concentración en DCP. La naturaleza dual del DCP puede observarse bien: DCP activa la velocidad inicial de oxidación del AIA e inhibe la misma reacción (al menos la formación de oxindoles) y que el cambio de absorbancia a 254 nm presenta un extremo cuando se incrementa [DCP].

A pH 6 la velocidad inicial alcanza un valor máximo para concentraciones de DCP alrededor de 70  $\mu M$ , mientras que la formación máxima de 3-metilenoxindol tiene lugar para [DCP] menores de 20  $\mu M$ ; por encima de este valor la formación de oxindol está inhibida. Estos efectos son dependientes del pH. Para [DCP] = 100  $\mu M$  la velocidad aumenta unas 120 veces a pH 6, mientras que lo hace sólo 30 veces a pH 4,2; por el contrario, el efecto inhibitorio del DCP sobre la formación de oxindol es menos pronunciado a pH 4,2 que a pH 6. Se obtienen resultados intermedios a pH 5. Con resorcinol se obtienen resultados similares (figura 2), de acuerdo con el trabajo de Goldacre et al. (58), que muestran cómo diversos fenoles sustituidos afectan a la actividad AIA-oxidasa. A modo de ejemplo, nosotros hemos observado que el p-nitrofenol no tiene ningún efecto sobre la reacción.

Desde una perspectiva fisiológica, hay que hacer notar que en presencia de un monofenol adecuado la velocidad de oxidación del AIA se puede incrementar unas cien veces. Por ejemplo, en las condiciones

de la figura 1, se necesitarían 1.200 minutos para destruir un 50 % del AIA inicial, mientras que en presencia de DCP 20  $\mu\text{M}$  el tiempo de reacción se reduce hasta unos 20 minutos.

El efecto de los difenoles sobre la reacción es drásticamente diferente. En presencia de hidroquinona, la cinética de aparición de los productos de oxidación del AIA se lentifica y presenta un período de latencia que depende de la concentración en hidroquinona. Después de este período de latencia, la reacción procede prácticamente a la misma velocidad que el control carente de hidroquinona (figura 3). Estos resultados son similares a los obtenidos por Gelinás (73) con ácido ferúlico, Miller et al. (84) con escopoletina y por Lee (75) con varios compuestos polifenólicos, metabolitos del insecticida carbofurano, así como con catecol y ácido cafeico.

#### *Reacción de peroxidación*

El efecto del DCP sobre la peroxidación de AIA y ácido indol-3-butírico se sigue a 254 nm. Esta longitud de onda corresponde a un máximo característico en el espectro de absorción de 3-metilenoxindol, producto de oxidación de AIA o de ácido indol-3-butírico en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peroxidasa (85) (55).

Al igual que en la reacción llevada a cabo en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el DCP afecta la velocidad inicial de la peroxidación del AIA o del ácido indol-3-butírico (figura 4). En ésta también se representan los cambios de absorbancia medidos a 254 nm después de 12 horas de reacción (lo cual es una medida del AIA destruido), frente a las concentraciones de DCP. A una concentración fija en DCP, la concentración de enzima afecta a la velocidad relativa de la reacción (velocidad medida con respecto a un experimento de control que carecía de DCP) (tabla 2). Con resorcinol se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en la figura 4. Por otra parte, hidroquinona no ejerce ningún efecto sobre la peroxidación de AIA o del ácido indol-3-butírico.

Los perfiles de pH para las constantes de velocidad correspondientes a las etapas de reducción de Compuesto I o Compuesto II por el ácido indol-3-butírico o por el DCP, se presentan en la figura 5. En la tabla 3 se reseñan valores de las constantes de velocidad de segundo orden de las reacciones de los Compuestos I y II con varios difenoles.

#### ESTUDIO POLAROGRÁFICO

La figura 6 muestra el efecto del DCP sobre el consumo de oxígeno

durante la oxidación del AIA por peroxidasa. El DCP añadido antes que la HRP o bien incorporado después de iniciarse la reacción aumenta de modo notable la velocidad de consumo de oxígeno. No obstante, como se observó en el estudio espectrofotométrico, la reacción se inhibe después de un corto período de tiempo: reintroduciendo  $O_2$ , AIA y enzima no se produce ninguna reacción posterior detectable. De los resultados de las figuras 1 y 6 parece deducirse que, en presencia de DCP, se forma un inhibidor de la reacción de oxidación del AIA.

La figura 7 muestra el curso del consumo de  $O_2$  en presencia de DCP y  $Mn^{2+}$ . La velocidad se incrementa en comparación con la de la figura 6, de acuerdo con los resultados de la tabla 1. La diferencia más sorprendente con los resultados de la figura 6 es que  $Mn^{2+}$  impide la formación del producto inhibidor encontrado cuando DCP actuaba solo: la reacción no es inhibida y sólo está limitada por la presencia de sustratos.

#### NATURALEZA PROBABLE DEL INHIBIDOR

Engelsma (86) demostró que cuando se usan ácidos hidroxicinámicos (ácido p-cumárico, ácido ferúlico y ácido cafeico) como cofactores en la reacción de oxidación del AIA por HRP tiene lugar la destrucción del cofactor en función de la desaparición del AIA. Miller et al. (84) obtuvieron resultados similares con cumarinas tales como la escopoletina.

Como candidatos a productos inhibidores formados durante la oxidación de AIA por HRP, en presencia de DCP, podemos considerar los «productos de oxidación del AIA» o los «productos de oxidación del DCP». Hemos podido observar (87) que ninguno de los productos finales de la degradación del AIA conocidos: 3-metilenoxindol, indol-3-aldehído e indol-3-metanol, inhiben la reacción.

La figura 8-A muestra la influencia de los productos de oxidación del DCP (formados independientemente por peroxidación de DCP en presencia de  $H_2O_2$ ) sobre la oxidación consumidora de  $O_2$  del AIA catalizada por HRP. Como en el caso de la hidroquinona (figura 3), se obtiene un período de latencia que parece variar exponencialmente con la concentración de «productos de oxidación del DCP». Como muestra la figura 1, el DCP es un agente promotor tan potente que el aumento de velocidad observado después del período de latencia puede deberse, quizás, a una parte de DCP que no ha reaccionado. En la misma línea de razonamiento, hemos ensayado los efectos de ácido p-cumárico, ácido cafeico (producto hidroxilado del anterior) y «productos de oxida-

ción del ácido cafeico» (formados por peroxidación de ácido cafeico en presencia de HRP) sobre el desarrollo del consumo de oxígeno. Hemos observado (figura 8-B) que, al igual que los monofenoles, el ácido p-cumárico promueve la reacción, mientras que, lo mismo que los difenoles, el ácido cafeico la inhibe y que los «productos de oxidación del ácido cafeico» casi no tienen efecto. Se deduce que entre las sustancias probadas, los únicos inhibidores potenciales de la degradación de AIA por peroxidasa son compuestos que poseen una estructura difenol.

Los resultados de la figura 9 muestran que el  $Mn^{2+}$  ejerce, claramente, un efecto sobre la peroxidación del ácido p-cumárico, pero no tiene efecto sobre la peroxidación del ácido cafeico.

De estos resultados parece deducirse que durante la oxidación de un monofenol acoplada con la reacción de oxidación de AIA en presencia de HRP se producen o bien radicales libres intermedios capaces de destruir el enzima o difenoles inhibidores que se acumularían durante la reacción. El  $Mn^{2+}$  puede actuar como un reductor frente a esas especies previniendo su posterior acción sobre el enzima o los compuestos enzimáticos activos. Como lo sugieren los resultados de la figura 3 y de la figura 8-A, así como los resultados de Gelinas (73), la duración del período de latencia se incrementa exponencialmente con la concentración del inhibidor. Haciendo cálculos sobre el trabajo de Gelinas (73), se estima que la duración del período de latencia es de 50 minutos, 2.500 minutos y  $126 \times 10^3$  minutos para concentraciones en ácido ferúlico de  $10^{-5}$  M;  $2 \times 10^{-5}$  M y  $3 \times 10^{-5}$  M respectivamente. Debe hacerse notar que para la mayoría de los experimentos que aquí se presentan hemos usado concentraciones en DCP del orden de  $10^{-4}$  M y que la acumulación de compuestos tipo hidroquinona o catecol a concentraciones próximas a la del DCP inicial también podrían producir un período de latencia tan largo que podría parecer que la reacción está completamente inhibida.

#### EFFECTO DE LOS COFACTORES SOBRE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN

Los productos finales más importantes de la degradación de AIA por peroxidasa son indol-3-aldehído, 3-metilenoxindol e indol-3-metanol (88) (55) (89) (54), siendo el último un precursor en la formación de indol-3-aldehído (52) (Sabater et al., resultados no publicados). La proporción relativa de estos productos depende de la relación [enzima]/[sustrato] (54) (55). Esto lo confirman los resultados de la tabla 4, ya que el rendimiento en 3-metilenoxindol es menor para concentraciones



altas de HRP que para concentraciones bajas (comparar los medios P<sub>3</sub> con P<sub>4</sub> y P<sub>1</sub> con P<sub>2</sub>).

El efecto del DCP sobre el rendimiento en productos finales de oxidación del AIA depende de la concentración de enzima en el medio de reacción. Cuando se usan concentraciones altas de HRP, el DCP tanto a concentraciones altas como bajas inhibe la formación de 3-metilenoxindol, pero favorece la formación de indol-3-aldehído e indol-3-metanol (comparar el medio P<sub>5</sub> con los medios P<sub>1</sub> y P<sub>3</sub>). Cuando se usan concentraciones bajas de HRP se observan dos efectos:

- i) el máximo rendimiento de oxindol se obtiene a concentraciones bajas en DCP, de acuerdo con los resultados de la figura 1;
- ii) las altas concentraciones en DCP favorecen la producción de indol-3-aldehído e indol-3-metanol, como se observaba para alta concentración en HRP (comparar los medios P<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>).

Como se vio en el estudio polarográfico, el Manganeso evita la inhibición observada a concentración en DCP alta. Por ello la reacción procede hasta la destrucción casi completa del AIA; no obstante hemos observado que la naturaleza de los productos finales era la misma que la de un medio conteniendo sólo el cofactor fenólico.

#### EFFECTO DE LOS COFACTORES SOBRE LA APARICIÓN DE LOS COMPUESTOS ENZIMÁTICOS INTERMEDIOS

Se han llevado a cabo experimentos de flujo detenido (stopped-flow) en la región de Soret con objeto de apreciar el efecto de los cofactores sobre la cinética de aparición de los compuestos enzimáticos detectables después de la mezcla rápida de disoluciones de HRP y AIA.

A pH 6 (figura 10-A), cuando se usan concentraciones bajas de DCP, se reduce la longitud del tiempo de reacción (curva 2) con respecto a un experimento de control carente de DCP (curva 1).

Si se incrementa la concentración de DCP, la cinética de aparición de los compuestos enzimáticos se retarda (curva 3). Por último, no puede detectarse ningún cambio de absorbancia para concentraciones altas de DCP (curva 4). Experimentos de comprobación en la región visible indicaron que los cambios de absorbancia correspondientes a las curvas cinéticas presentadas en esta figura se debían principalmente a la presencia de Compuesto II, formado probablemente después de la aparición transitoria de Compuesto III (55).

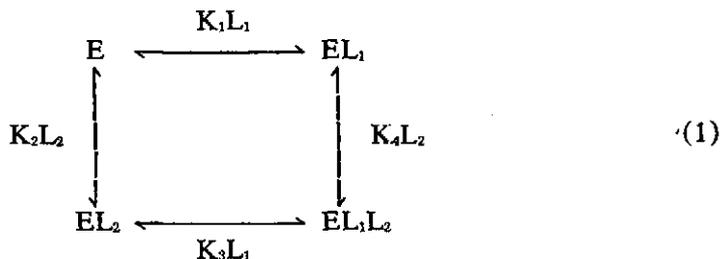
De modo similar, a valores ácidos de pH, se obtiene una activación en la formación de compuestos enzimáticos para concentraciones en

DCP bajas (curvas 2 y 3, figura 10-B), mientras que concentraciones altas de DCP inhiben la reacción y no pueden detectarse cambios de absorbancia (no se indican en la figura).

El efecto del  $Mn^{2+}$  se ensayó en las condiciones experimentales de la curva 4, figura 10-A, en las que una concentración elevada de DCP producía una inhibición de la reacción. Se ve que en presencia de  $Mn^{2+}$  los cambios de absorbancia a 420 nm se restauran parcialmente (figura 11).

#### FIJACIÓN DE SUSTRATO A LA PEROXIDASA DE RÁBANO NATIVA

Schonbaum (90) ha mostrado que ligandos tales como la benzhidrazida se fijan cerca de la sexta posición de coordinación del hierro hemínico de la peroxidasa de rábano. También tienen lugar cambios de absorbancia notables acompañando a la formación de los complejos. También se fijan sobre HRP sustratos aromáticos como fenoles o aminas aromáticas, produciendo, por lo general, sólo cambios muy pequeños de absorbancia en el espectro del enzima (91). El descubrimiento de que sustratos aromáticos y benzhidrazida se fijan competitivamente sobre HRP proporciona un instrumento sensible para estudios de fijación. El ácido indol-3-butírico (92) y el 2,4-diclorofenol son sustratos que pueden fijarse a la peroxidasa. Los cambios de absorbancia resultantes son muy pequeños tal como sucede con los fenoles y aminas aromáticas. En un medio de reacción en el equilibrio, que contenga enzima (E), benzhidrazida ( $L_1$ ) y ácido indol-3-butírico o 2,4-diclorofenol ( $L_2$ ), se pueden escribir las siguientes reacciones:



donde las  $K_i$  se refieren a las constantes de equilibrio de asociación, con  $K_2K_3 = K_1K_4$ .

A la longitud de onda isobéptica  $\lambda_i$ , entre los espectros de absorción de E y  $EL_2$ , si la fijación de  $L_1$  es competitiva con la de  $L_2$ , los cambios de absorbancia debidos a la fijación de  $L_1$  sobre E, vienen dados por la ecuación 2:

$$\frac{1}{\Delta A^{\lambda_1}} = \frac{1}{[E]_0 \Delta \epsilon_{EL_1-E}^{\lambda_1}} \left\{ 1 + \frac{1 + K_2 [L_2]}{K_1 [L_1]} \right\} \quad (2)$$

donde  $[E]_0$ ,  $[L_1]$  y  $[L_2]$  son concentraciones de reaccionantes y  $\Delta \epsilon_{EL_1-E}^{\lambda_1}$  es la diferencia en las absorptividades molares del complejo  $EL_1$  y el enzima E, a la longitud de onda  $\lambda_1$ . Así a una concentración fija de  $L_2$ , la representación de  $1/\Delta A^{\lambda_1}$  frente a  $1/[L_1]$  debería ser lineal. La inter-

$$1/K_{obs} = (1 + K_2 [L_2])/K_1 \quad (3)$$

sección con el eje  $1/[L_1]$  viene dada por:

Si tiene lugar la fijación competitiva, una representación de  $1/K_{obs}$  frente a  $[L_2]$  sería una línea recta, la medida de cuya pendiente nos permite la determinación de  $K_2$ , constante de equilibrio de la fijación de  $L_2$  a E. Si  $K_3$  y  $K_4$  en el modelo (1) fuesen distintas de cero, o sea, si no tuviese lugar la fijación competitiva, podría observarse que la representación de  $1/K_{obs}$  frente a  $[L_2]$  no sería una línea recta.

La fijación de ácido indol-3-butírico (o 2,4-diclorofenol) a HRP produce cambios de absorbancia tan pequeños en el espectro de la HRP nativa, comparados con los que produce la fijación de benzhidrazida, que cualquier longitud de onda puede considerarse como isosbética entre los espectros de absorción de los complejos HRP-IBA o HRP-DCP y el enzima nativo (92) (90). Por consiguiente, los datos son analizados a 410 nm, máximo característico del espectro de absorción HRP-benzhidrazida.

Los resultados relacionados con la fijación de benzhidrazida a HRP, en presencia de varias concentraciones de DCP, se muestran en la figura 12. La representación de  $1/K_{obs}$  frente a  $[DCP]$  es lineal, indicando fijación competitiva del DCP y la benzhidrazida (figura 12-B). Los mismos resultados se obtienen con ácido indol-3-butírico. Se deduce que DCP y ácido indol-3-butírico se fijan competitivamente sobre el mismo lugar en la peroxidasa de rábano.

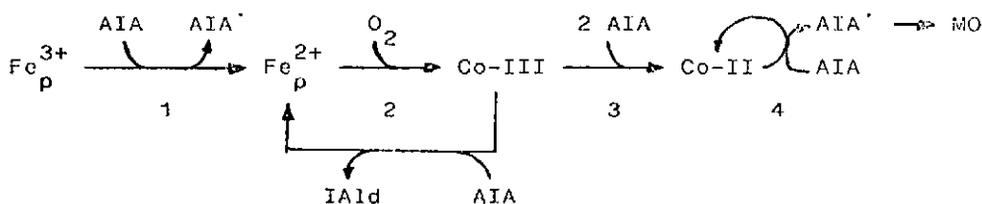
Las constantes de fijación se han calculado a diversos valores de pH (figura 12-C).

## DISCUSION

La proporción relativa de productos finales en la oxidación de AIA catalizada por peroxidasa depende de la relación  $[\text{sustrato}]/[\text{enzima}]$ . Cuando su valor es bajo se forman Ferropoxidasa y Compuesto III (esquema 1, reacciones 1 y 2) y el producto final de la degradación del AIA es indol-3-aldehído (54) (55) (89).

Cuando la relación [sustrato]/[enzima] se incrementa, se detecta el Compuesto II, después de la aparición transitoria del Compuesto III (reacción 3), produciéndose la regeneración del Compuesto II con tal que AIA y  $O_2$  se hallen presentes en el medio de reacción (reacción 4). El producto final de oxidación del AIA es, en este caso, 3-metilenoxindol.

La existencia de una transición entre Compuesto III y Compuesto II ha quedado bien establecida experimentalmente (55) (93). Puesto que AIA se comporta como donador de un electrón, se requieren dos moléculas de este sustrato para llevar a cabo la etapa de reducción, lo cual puede explicar el hecho de que se detecte Compuesto II cuando se usan concentraciones altas de AIA (Compuesto III y Compuesto II poseen niveles de oxidación de 6 y 4 respectivamente). Estas reacciones se resumen en el esquema 1:



En este esquema,  $Fe_p^{3+}$ ,  $Fe_p^{2+}$ , Co-III y Co-II representan a los compuestos enzimáticos: Ferriperoxidasa, Ferropoxidasa, Compuesto III y Compuesto II respectivamente; y MO e IAld representan a 3-metilenoxindol e indol-3-aldehído. 3-metilenoxindol se forma, probablemente, de un modo no enzimático a través de la secuencia propuesta por Hinman y Lang (49) en la que el radical libre de AIA, producido en la reacción redox con el enzima, se combina con oxígeno.

El mecanismo de formación de indol-3-metanol no entra en el ámbito de este trabajo, pero parece que su cinética de aparición es concomitante con la relativa a la formación del Compuesto P-670 (Sabater et al., resultados no publicados). Se sabe que P-670 es una forma desnaturada del enzima en la que el grupo hemo parece ser análogo al verdohemo (94) (95).

Los efectos de los cofactores se describen bajo los siguientes encabezamientos:

(i) concentración baja en DCP; (ii) concentración alta en DCP y efecto del  $Mn^{2+}$ .

(i) CONCENTRACIÓN BAJA EN DCP

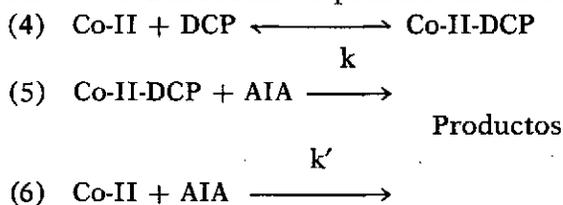
En estas condiciones, los efectos del cofactor sobre la reacción pueden resumirse así: se produce un incremento en la velocidad (figura 1), formación máxima de 3-metilenoxindol (figura 1) y aceleración en el recambio (turnover) del enzima (figura 8). Puede apreciarse que, excepto en el aumento de velocidad, no hay variación en las características de la reacción si la comparamos con la realizada en ausencia de cofactor (55).

Como puede verse en la figura 4, el DCP aumenta la velocidad de peroxidación de los ácidos indol-3-acético e indol-3-butírico, de modo similar a lo observado en la reacción verificada en ausencia de  $H_2O_2$ . Como ejemplo, puede verse que en las condiciones de la figura 1 para una concentración en DCP de  $16 \mu M$ , la velocidad de oxidación de AIA (en ausencia de  $H_2O_2$ ) aparece multiplicada por un factor de 30 a pH 6, lo cual es comparable con los resultados de la tabla 2.

Puesto que la etapa de reducción del Compuesto II es, de ordinario, la etapa limitante de la velocidad en los mecanismos peroxidativos (ver figura 5), estos resultados tienden a confirmar que el Compuesto II es el compuesto enzimático responsable de la degradación del AIA, en ausencia de  $H_2O_2$  y en presencia de un cofactor fenólico.

«A priori», pueden considerarse dos tipos de mecanismos para explicar el aumento de velocidad en la reacción entre Compuesto II y ácido indol-3-acético o ácido indol-3-butírico, en presencia de DCP.

Las reacciones 4 a 6 ilustrarían el primero de ellos:



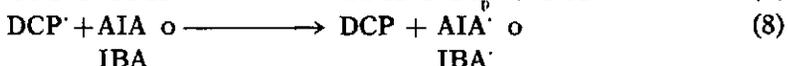
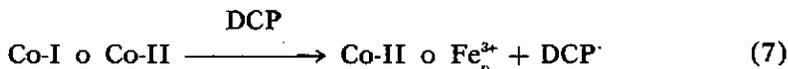
con  $k \gg k'$ .

En este mecanismo, la fijación de DCP sobre el Compuesto II activaría este compuesto enzimático, quizá por modificación de la estructura terciaria del enzima (96). Se ha descrito la fijación de sustratos aromáticos sobre Compuesto I y Compuesto II (97) (98) (99). Sin embargo, aunque en base a los datos no puede excluirse esta posibilidad, diversos hechos experimentales no están de acuerdo con este tipo de proceso de activación. Se ha observado que en las reacciones de Com-

puesto I o Compuesto II con exceso de p-cresol o ácido p-aminobenzoico la forma libre de los compuestos enzimáticos reaccionaba más rápido que las formas ligadas (Compuesto I o Compuesto II-p-cresol; Compuesto I o Compuesto II-ácido p-aminobenzoico) (97) (98) (99).

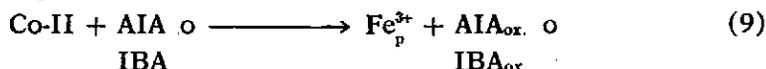
Además, los perfiles de velocidad frente a pH representados en la figura 5 indican que estando presentes tanto DCP como AIA o ácido indol-3-butírico es el fenol quien se oxida en primer lugar. Por ejemplo, a pH 6, Compuesto I y Compuesto II reaccionan unas 100 veces más rápidamente con DCP que con ácido indol-3-butírico.

El segundo tipo de mecanismo fue propuesto hace tiempo por Ray (1962) (48). Los compuestos enzimáticos reaccionan con el fenol produciendo radicales libres de éste, que a su vez oxidan al ácido indol-3-acético o al ácido indol-3-butírico:



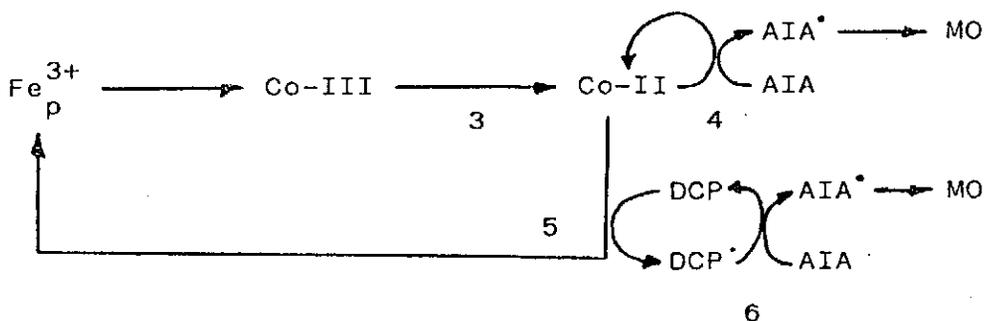
donde DCP' es un radical tipo fenoxi (100) y AIA' o IBA' son los radicales de los ácidos indol-3-acético o indol-3-butírico, respectivamente.

El aumento en la velocidad puede ocurrir con tal que la reacción 8 sea más rápida que la reacción 9:



El radical libre AIA' pasaría hasta 3-metilenoxindol de acuerdo con la secuencia de Hinman y Lang, ya citada antes.

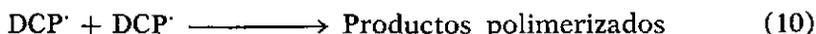
Estas reacciones pueden resumirse en el esquema 2:



ESQUEMA 2

La influencia del pH en el efecto del DCP sobre las reacciones de oxidación o peroxidación de AIA e IBA catalizadas por peroxidasa pueden explicarse según ese mismo esquema. A pH 4, Compuesto I y Compuesto II sólo reaccionan unas dos veces más rápido con DCP que con ácido indol-3-butírico. La producción de radicales fenoxi activos será, por tanto, más baja a valores ácidos del pH que a valores neutros; el Compuesto II tendrá más tendencia a reaccionar con AIA que con DCP a pH ácido.

Como puede verse en la tabla 2, existe un óptimo en la concentración de enzima, por encima del cual tiene lugar una inhibición. Podría suceder que a concentración alta de enzima, la producción de radicales tipo fenoxi a través de la reacción 7 fuese tan alta que las reacciones de polimerización competirían con la reacción 8:



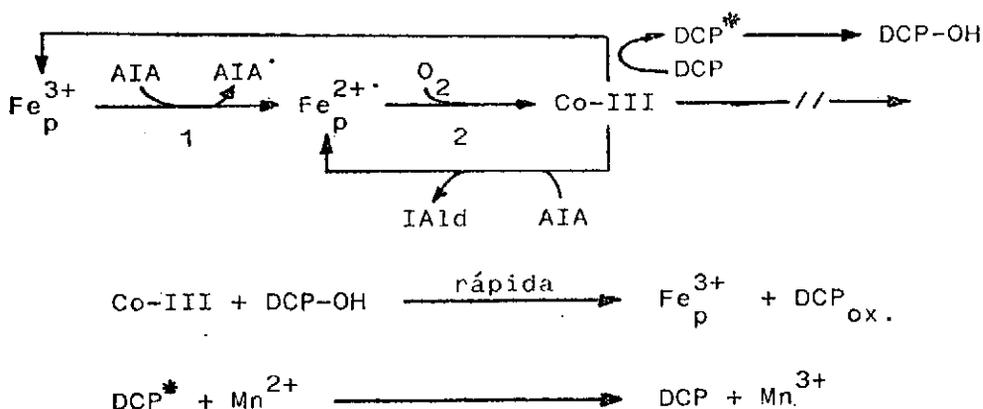
Los resultados obtenidos con difenoles como el catecol (75) o la hidroquinona (en este trabajo) ilustran la importancia de la producción de radicales libres intermedios de tipo fenoxi para el proceso activador de la oxidación del AIA. Estos sustratos que se comportan como donadores de electrones pueden pasar al Compuesto I directamente hasta enzima nativo, liberando, presumiblemente, la quinona. No obstante, Compuesto II se detecta transitoriamente durante este proceso (101), lo que sugiere que los dos electrones del fenol se ceden sucesivamente al Compuesto I. Es notorio que el resorcinol, para quien la formación de quinona es imposible, se comporta exactamente igual que el DCP, promoviendo la oxidación del AIA o la peroxidación de AIA e IBA.

#### (ii) CONCENTRACIÓN ALTA EN DCP Y EFECTO DEL $Mn^{2+}$

A concentración alta en DCP la oxidación de AIA por HRP llega a inhibirse: puede verse sobre el rendimiento en 3-metilenoxindol (figura 1) la evolución del consumo de oxígeno (figura 6) y la aparición de compuestos enzimáticos (figura 10). A medida que aumenta la concentración en DCP se incrementa la posibilidad de reacción entre DCP y Compuesto III. Se ha visto que este tipo de reacción puede tener lugar (95). Su efecto inmediato será el de inhibir la reacción 3 (esquemas 1 y 2), específicamente la transición entre Compuesto III y Compuesto II inducida por AIA, evitando, de este modo, la aparición de Compuesto II y la formación de 3-metilenoxindol. El rendimiento incrementado en indol-3-aldehído que se observa a concentración alta en DCP podría explicarse a la vista del esquema inicial de Ricard y Job (55), ya que parte del enzima se verá, entonces, forzado a permanecer en el ciclo que incluye a Compuesto III y Ferropoxidasa (esquema 1).

Es sabido que los sistemas Ferroperoxidasa- $O_2$  y Ferriperoxidasa- $H_2O_2$  atacan, ambos, a los fenoles y conducen a tipos diferentes de productos de oxidación (100). En presencia de  $H_2O_2$  se obtendrían radicales del tipo fenoxi, mientras que la reacción con el Compuesto III daría radicales hidroxi-ciclohexadienilo con una estructura adecuada para la formación de compuestos hidroxilados (100). En presencia tanto de AIA como de DCP, el compuesto subsiguientemente formado, del tipo catecol o hidroquinona, presentaría una reactividad muy acusada frente al Compuesto III, lo que haría volver muy rápidamente a este compuesto enzimático hasta Ferroperoxidasa (95). El proceso global de oxidación de AIA quedaría, así, inhibido, ya que la reacción 1 (esquema 1), es decir, la etapa de reducción del enzima nativo, probablemente es muy lenta.

El efecto protector del  $Mn^{2+}$  podría explicarse, quizás, postulando que puede actuar como reductor frente a los radicales libres intermedios del fenol, evitando la formación de productos hidroxilados. Las reacciones que podrían tener lugar cuando se usan concentraciones altas de DCP, en presencia o ausencia de  $Mn^{2+}$ , se resumen en el esquema 3:



ESQUEMA 3

En este esquema,  $DCP^*$ ,  $DCP-OH$  y  $DCP_{ox.}$  representan el radical hidroxi-ciclohexadienilo, el producto hidroxilado del DCP y su producto de oxidación por Compuesto III, respectivamente.

Los resultados presentados en este trabajo confirman el hecho de que cualquiera que sean las condiciones experimentales el Compues-

to III es el intermedio clave durante la oxidación de AIA catalizada por HRP. Pero debe insistirse en que este compuesto es sólo un intermediario y a valores neutros de pH no es el responsable de la oxidación del AIA (55). Del mismo modo, el compuesto enzimático responsable del proceso de activación, en presencia de un cofactor fenólico, parece ser Compuesto II y no Compuesto III como se había postulado (72) (96).

El efecto de la concentración en DCP sobre la reacción es muy similar al efecto de la concentración en AIA descrito previamente (55). Una concentración baja en DCP, con respecto a la concentración en AIA, no inhibirá la transición de Compuesto III a Compuesto II.

Por último, puede concluirse que el carácter promotor o inhibidor de un efector de la reacción de oxidación de AIA catalizada por HRP está ligado a la capacidad de este efector para reaccionar con Compuesto III. A este respecto, las constantes de velocidad descritas para Compuesto III con diversos donadores de electrones (95) predicen que un sustrato que reaccione más rápido que el AIA con el compuesto enzimático (por ejemplo, hidroquinona, catecol, p-cresol, etc.) inhibiría la oxidación del AIA, mientras que las especies que reaccionen lentamente (por ejemplo, resorcinol, fenol, etc.) la promoverían. No obstante, la oxidación del efector es un prerrequisito necesario para el proceso de activación a la vista de la carencia de efecto en especies que no reaccionan, tales como el p-nitrofenol (101).

Como ya se ha descrito anteriormente, las altas concentraciones en DCP inhibían la oxidación de AIA por peroxidasa. El hecho de que DCP y ácido indol-3-butírico y presumiblemente AIA se fijen en el mismo lugar sobre el enzima nativo podría explicar parte de esa inhibición. La fijación de DCP sobre HRP puede prevenir la fijación de AIA y la conversión consiguiente del enzima en Ferropoxidasa y Compuesto III, que es la etapa iniciadora de la reacción en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (55).

El análisis detallado de los valores de las constantes de velocidad y equilibrio, en función del pH presentados en las figuras 5 y 12, no entra en las perspectivas de este trabajo. No obstante, resulta aparente en las representaciones de la figura 5 que un grupo enzimático con un pK próximo a 5 afecta a las reacciones de Compuesto I y Compuesto II con DCP y ácido indol-3-butírico. La influencia de este pK ha sido descrita con frecuencia (102).

Recientemente se ha desarrollado un nuevo concepto para explicar la peculiaridad de catalasas y peroxidasas en la utilización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre pH 3 y pH 6 y la constante de equilibrio correspondiente a la molecular (103) en lugar de H<sub>2</sub><sup>-</sup> que es lo habitual en las reacciones con

complejos de proteína y ferrihemo libre (104) (105). Este concepto implica la existencia, cerca del centro activo de los enzimas, de una «puerta electrostática» que desacoplaría la ionización de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dentro de las proteínas respecto al ambiente externo. La «puerta» operaría, entonces, haciendo disponible el  $\text{HO}_2^-$  para el hierro central. Como consecuencia, la peroxidasa no fijaría la forma aniónica de los ligandos (por ejemplo,  $\text{CN}^-$ ), sino sus ácidos conjugados neutros ( $\text{CNH}$ ).

Los resultados de la figura 12 constituyen otra prueba experimental de la existencia de tal «puerta»: el DCP no tiene ninguna ionización fijación de este fenol sobre la HRP es prácticamente independiente del pH. Por otra parte, el perfil de pH correspondiente a la fijación de ácido indol-3-butírico depende claramente de la ionización del grupo carboxilo extremo de este ligando.

Una cuestión que resta en este contexto sería la de saber si la «puerta» opera aún en Compuesto I y Compuesto II. Las representaciones de la figura 5 y también las reseñadas para las reacciones de Compuesto I y Compuesto II con p-cresol (99) indican que una forma básica del enzima ( $\text{pK} \sim 5$ ) es reactiva. Si tal cosa es cierta para la reacción del ácido indol-3-butírico, se notaría que la operación de la «puerta» para Compuesto I y Compuesto II afectaría a las constantes de velocidad, en el rango de pH de 4-6, en dirección opuesta al incremento global en la constante de velocidad observado para las reacciones con fenoles. Existen evidencias acumulativas indicando que Compuesto I o Compuesto II sólo reaccionan con la forma neutra de los sustratos aromáticos (99) (101). De modo similar, el radical  $\text{HO}_2^-$  es un sustrato mucho mejor para el Compuesto I que el anión superóxido (106).

## RESUMEN DEL MECANISMO PROPUESTO

Utilizando como base el mecanismo de Ricard y Job (1974), indicamos sólo las etapas clave sobre las que puede influir la presencia de efectores:

1. La reacción de oxidación del IAA se iniciaría por reducción de  $\text{Fe}_p^{3+}$  hasta  $\text{Fe}_p^{2+}$ , por interacción directa con IAA, resultando Co-III.
2. Siendo Co-III el compuesto clave, el resto de la reacción depende de la relación  $[\text{sustrato}]/[\text{enzima}]$ :
  - a) Si S/E es suficientemente alta para permitir la fijación de 2 IAA, habrá desplazamiento hacia reacciones de peroxidación con Co-II predominando y transformándose IAA en MO.
  - b) Si S/E es baja y sólo un IAA puede reaccionar con Co-III,



entonces habrá formación de IAl<sub>d</sub>, en proceso más parecido a una oxigenación.

3. Para analizar el papel de los efectores hay que atender a:
  - Constantes de velocidad en las reacciones de Co-I, Co-II y Co-III con difenoles y monofenoles, comparables con las estimadas para IAA o IBA.
  - Constantes de afinidad de las distintas sustancias por HRP nativa.
  - Constantes de afinidad de las mismas por Co-I, Co-II y Co-III, datos, éstos, desconocidos de momento, aunque hay algunas estimaciones indirectas sobre ellos.

En base a los datos aportados en la memoria y en la bibliografía que se cita:

a) Los difenoles, R(OH)<sub>2</sub>, aunque poseen constantes de disociación similares a IAA en su complejo con HRP y sus constantes de velocidad con Co-III tampoco difieren mucho de IAA, deben presentar una gran afinidad por Co-III en base al tipo de inhibición exponencial que presentan y mientras están en el medio no hay oxidación del IAA.

|                     | $k_{\text{Co-III}} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ | $K_{\text{dis. con HRP nativa}} \text{ (mM)}$ |
|---------------------|--|---|
|                     | (pH = 6 ; 25 C)  |   |
| Hidroquinona ... .. | $4,0 \times 10^2$  | 3,2   |
| Catecol ... ..      | $2,6 \times 10^2$  | 7,9   |
| IAA ... ..          | $7,1 \times 10^2$  | —   |
| IBA ... ..          | —  | 3,3   |
| Resorcinol ... ..   | 6,9  | 4,0   |
| Fenol ... ..        | $8,1 \times 10$  | —   |

b) Los monofenoles difieren en su constante de velocidad con Co-III respecto a IAA; por este motivo, si la relación S/E es alta se permitirá la formación de Co-II y en este caso, dado que la velocidad de reacción de este compuesto con fenoles (tabla 3) es notablemente más alta que con IAA, la degradación de este último hasta MO tendrá lugar a través de los radicales del tipo fenoxi (RO<sup>·</sup>) formados.

A medida que transcurra la reacción o si la relación S/E es baja, disminuirá la posibilidad de fijación de 2 IAA sobre Co-III, adquiriendo este compuesto mayor protagonismo, hasta el punto de verse inhibida la formación de oxindoles. La reacción de Co-III con monofenol (ROH) puede producir un radical distinto, del tipo ciclohexadienilo (RO<sup>\*</sup>), susceptible de hidroxilación para dar un difenol R(OH)<sub>2</sub>; en tal caso la acumulación de este último impondría una inhibición en la reacción de oxidación del IAA.

c) El  $Mn^{2+}$  podría actuar como protector en la oxidación del IAA al impedir la estabilización del radical  $RO^*$  como difenol, sin descartar que los productos en que se transforme el  $Mn^{2+}$  (nuevos radicales libres) pueden a su vez multiplicar el efecto degradativo sobre IAA.

#### NOTA FINAL

Durante la fase de publicación de esta memoria hemos realizado, con ayuda del profesor J. A. del Río, una serie de experimentos encaminados a confirmar el proceso de hidroxilación de monofenoles acoplado a la oxidación del AIA catalizada por peroxidasa. Por su interés, creemos conveniente reseñar algunos de los resultados obtenidos hasta ahora.

El ensayo consiste en utilizar 2,4-diclorofenol (DCP) como cofactor, el cual, en caso de experimentar una hidroxilación, puede originar un difenol en orto. Para observar la formación de este último utilizamos un método para la detección colorimétrica de catecol y sustancias relacionadas, descrito por P. M. Nair y C. S. Vaidyanathan (1), y que ha sido utilizado con éxito por B. Halliwell y S. Ahluwalia (2) para poner de manifiesto la hidroxilación del ácido p-cumárico.

Preparamos ocho ensayos con la siguiente composición:

#### BLANCO-1

DCP =  $10^{-3}$  M

#### CONTROL-1

AIA =  $3 \times 10^{-4}$  M

HRP =  $2,75 \times 10^{-7}$  M

tiempo de reacción = 17,5 mn

#### MEDIO-1

AIA =  $3 \times 10^{-4}$  M

HRP =  $2,75 \times 10^{-7}$  M

DCP =  $10^{-4}$  M

t. reac. = 5 mn

#### MEDIO-2

ídem medio-1

con DCP =  $10^{-3}$  M

t. reac. = 20 mn

#### BLANCO-2

AIA =  $3 \times 10^{-4}$  M

#### CONTROL-2

ídem control-1

t. reac. = 30 mn

#### MEDIO-1'

ídem medio-1

+  $Mn^{2+}$  =  $10^{-4}$  M

t. reac. = 1 mn

#### MEDIO-3

HRP =  $2,75 \times 10^{-7}$  M

DCP = misma conc.  $10^{-4}$  M

$H_2O_2$  =

t. reac. = 30 mn

Las condiciones de reacción, en todos los casos, fueron: temperatura, 30° C; pH = 6,2, siendo el volumen final de cada medio 75 ml; al final de cada reacción se extraía el medio con éter, concentrándose luego hasta sequedad y eluyendo después con 1 ml de agua destilada antes de proceder al ensayo de hidroxilación. Los tiempos de reacción del CONTROL-1 y MEDIOS 1, 1' y 2 son los estimados en oxígrafo para que en todos los casos se consuma la misma cantidad de oxígeno; para el CONTROL-2 y el MEDIO-3 el tiempo es arbitrario, suficiente para que en el primero abunden los productos de oxidación del AIA y en el segundo los del DCP.

A continuación añadimos a cada tubo de ensayo que contiene 1 ml de la disolución a ensayar los reactivos para el desarrollo del color, como indican (1) y (2):

- a) ácido clorhídrico + ácido tricloroacético
- b) Wolframato sódico (10 %)
- c) Nitrito sódico (0,5 %)

Hasta este momento no se observa variación en ninguno de los tubos de ensayo; en todo caso, ligera dilución del color inicial que pudiese presentar alguno de ellos.

Después de 5 mn se añade NaOH 0,5 N, no observándose cambio alguno en los blancos ni en los controles, mientras que los MEDIOS 1, 1' y 2 van adquiriendo poco a poco un tono pardo con intensificación progresiva. A simple vista o mediante el espectro correspondiente observamos menor intensidad en el color del MEDIO-1' comparado con el MEDIO-1. En cuanto al MEDIO-3, adquiere un tono pardo-rosado diluido, alterable al cabo del tiempo.

Todos estos resultados, de momento, parecen indicar que un producto de transformación del DCP, muy probablemente un difenol, responde positivamente a esta reacción de color, interfiriendo de alguna forma el  $Mn^{2+}$  en la intensidad de su formación.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Fundación Cultural «Esteban Romero» por la concesión de la beca postdoctoral de investigación que ha posibilitado mi estancia en el Departamento de Bioquímica Vegetal de la Universidad de Marsella, fruto de lo cual ha sido la presente memoria.

Agradezco, asimismo, a los profesores F. Sabater y M. López Alarcón su estímulo e interés por esta publicación, así como al profesor J. Ricard y al doctor D. Job por las facilidades, consejos y provechosas discusiones para el logro de los resultados expuestos. Por último, mi reconocimiento a los compañeros del Departamento de Biología por las ayudas prestadas.



## BIBLIOGRAFIA

1. THIMANN, K. V. (1972), en *Plant Physiology, a Treatise* (Steward, F. C., ed.), volumen VI B, pág. 63, Academic Press Inc.
2. RICARD, J., y PENON, P. (1974), en *La Croissance des Végétaux*, Colección «Que sais-je?», núm. 898, Presses Universitaires de France, Paris.
3. RAY, P. M. (1974), en *The Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones, Recent Advances in Phytochemistry* (Runeckles, V. C.; Sondheimer, E., y Walton, D. C., eds.), vol. 7, págs. 93-122, Academic Press Inc.
4. RAY, P. M.; DOHRMANN, U., y HERTEL, R. (1977), *Plant Physiol.*, 59, 357.
5. RAY, P. M. (1977), *Plant Physiol.*, 59, 594.
6. RAY, P. M.; DOHRMANN, U., y HERTEL, R. (1977), *Plant Physiol.*, 60, 585.
7. MARRE, E.; LADO, P.; RASI-CALDOGNO, F.; COLOMBO, R.; COCUCCI, M., y DE MICHELIS, M. I. (1975), *Physiol. Vég.*, 13, 797.
8. SCHNEIDER, E. A., y WIGHTMAN, F. (1974), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 487-513.
9. GOOD, N. E., y ANDREAE, W. A. (1956), *Plant Physiol.*, 31, 231.
10. ZENK, M. H. (1961), *Nature*, 191, 493.
11. KÖVES, E., y KOVÁCS, I. (1972), *Acta Biologica Szeged.*, 18, 117.
12. LIS, E. K., y ANTOSZEWSKI, R. (1974), *Biol. Plant.*, 16, 366.
13. MORRIS, D. A., y KADIR, G. O. (1972), *Planta*, 107, 171.
14. GOREN, W. R.; BUKOVAC, M. J., y FLORE, J. A. (1974), *Plant Physiol.*, 53, 164.
15. KOPCEWICZ, J.; EHMANN, A., y BANDURSKI, R. S. (1974), *Plant Physiol.*, 54, 846.
16. VENIS, M. A. (1964), *Nature*, 202, 900.
17. ZENK, M. H. (1960), *Z. Naturforsch.*, B15, 436.
18. THIMANN, K. V. (1934), *J. Gen. Physiol.*, 18, 23.
19. LARSEN, P. (1936), *Planta*, 25, 311.
20. LARSEN, P. (1940), *Planta*, 30, 637.
21. TANG, Y. N., y BONNER, J. (1947), *Arch. Biochem.*, 13, 11.
22. RICARD, J.; MAZZA, G., y WILLIAMS, R. J. P. (1972), *Eur. J. Biochem.*, 28, 566.
23. GASPAR, T.; DUBUCO, M., y VAN HOOF, P. (1974), *Biol. Plant.*, 16, 237.
24. ENDO, T. (1968), *Plant Cell Physiol.*, 9, 333.
25. SAHULKA, J. (1970), *Biol. Plant.*, 12, 191.
26. YONEDA, Y., y ENDO, T. (1969), *Plant Cell Physiol.*, 10, 235.
27. FRENKEL, C. (1972), *Plant Physiol.*, 49, 757.
28. SEQUEIRA, L., y MINEO, L. (1966), *Plant Physiol.*, 41, 1200.
29. VAN DER MAST, C. A. (1969), *Acta Bot. Neer.*, 18, 620.
30. SIEGEL, B. Z., y GALSTON, A. W. (1967), *Science*, 157, 1557.
31. KU, H. S.; YANG, S. F., y PRATT, H. K. (1970), *Plant Physiol.*, 45, 358.
32. WAYGOOD, E. R.; OAKS, A., y MCLACHLAN, G. A. (1956), *Canad. J. Bot.*, 34, 54.
33. PUPPO, A., y RIGAUD, J. (1975), *Physiol. Plant.*, 35, 181.
34. MANNING, D. T., y GALSTON, A. W. (1955), *Plant Physiol.*, 30, 225.
35. BRIGGS, W. R., y RAY, P. M. (1956), *Plant Physiol.*, 31, 165.
36. TOMASZEWSKI, M. (1959), *Bull. Acad. Pol. Sc.*, 7, 127.
37. CHMIELNICKA, J.; OHLSSON, P. I.; PAUL, K. G., y STIGBRAND, T. (1971), *FEBS Lett.*, 17, 181.
38. MCNICOL, P. K. (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 347.
39. LEE, T. T. (1974), *Phytochemistry*, 13, 2445.
40. CHANCE, B. (1952), *Arch. Biochem. Biophys.*, 41, 416.
41. GEORGE, P. (1952), *Nature (London)*, 169, 612.
42. GEORGE, P. (1953), *Biochem. J.*, 54, 266.
43. KENTEN, R. H. (1955), *Biochem. J.*, 59, 110.
44. GALSTON, A. W., y BAKER, R. S. (1951), *Amer. J. Bot.*, 38, 190.
45. WAYGOOD, E. R., y MCLACHLAN, G. A. (1956), *Physiol. Plant.*, 9, 607.
46. YAMAZAKI, I., y SOUZU, H. (1960), *Arch. Biochem. Biophys.*, 86, 294.
47. YAMAZAKI, I., y PIETTE, L. H. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 47.



48. RAY, P. M. (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 199.
49. HINMAN, R. L., y LANG, J. (1965), *Biochemistry*, 14, 144.
50. FOX, L. R.; PURVES, W. K., y NAKADA, H. I. (1965), *Biochemistry*, 4, 2753.
51. RICARD, J., y NARI, J. (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 113, 57.
52. BEMILLER, J. N., y COLILLA, W. (1972), *Phytochemistry*, 11, 3393.
53. YAMAZAKI, H., y YAMAZAKI, I. (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 147.
54. MORITA, Y.; KOMINATO, Y., y SHIMIZU, K. (1967), *Mem. Res. Inst. Food Sci. (Kyoto)*, 28, 1.
55. RICARD, J., y JOB, D. (1974), *Eur. J. Biochem.*, 44, 359.
56. PILET, P. E., y GASPARD, T. (1968), *Le catabolisme auxinique*, Masson et Cie., Paris.
57. Idem ref. (1), págs. 129-137.
58. GOLDACRE, P. L.; GALSTON, A. W., y WEINTRAUB, R. L. (1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, 43, 358.
59. GORTNER, W. A., y KENT, M. (1953), *J. Biol. Chem.*, 204, 593.
60. RAY, P. M. (1960), *Arch. Biochem. Biophys.*, 87, 19.
61. WAGENKNECHT, A. C., y BURRIS, R. H. (1950), *Arch. Biochem.*, 25, 30.
62. KENTEN, R. H., y MANN, P. J. G. (1949), *Biochem. J.*, 45, 255.
63. KENTEN, R. H., y MANN, P. J. G. (1950), *Biochem. J.*, 46, 67.
64. KENTEN, R. H., y MANN, P. J. G. (1952), *Biochem. J.*, 52, 125.
65. KENTEN, R. H., y MANN, P. J. G. (1953), *Biochem. J.*, 53, 498.
66. HILLMAN, W. S., y GALSTON, A. W. (1956), *Physiol. Plant.*, 9, 230.
67. STUTZ, R. E. (1957), *Plant Physiol.*, 32, 31.
68. GASPARD, T., y DINANT, M. (1967), *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 36, 533.
69. MCLACHLAN, G. A., y WAYGOOD, E. R. (1956), *Canad. J. Biochem.*, 34, 1233.
70. FOX, L. R., y PURVES, W. K. (1968), *Plant Physiol.*, 43, 454.
71. PARUPS, E. V. (1969), *Canad. J. Biochem.*, 47, 220.
72. MILLER, R. W., y PARUPS, E. V. (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 276.
73. GELINAS, D. A. (1973), *Plant Physiol.*, 51, 967.
74. MACHÁČKOVÁ, I.; GANCEVA, K., y ZMRHAL, Z. (1975), *Phytochemistry*, 14, 1251.
75. LEE, T. T. (1977), *Plant Physiol.*, 59, 372.
76. NITSCH, J. P., y NITSCH, C. (1962), *Ann. Physiol. vég.*, 4, 211.
77. BARZ, W. (1977), *Physiol. Vég.*, 15, 261.
78. MARIGO, G., y BOUDET, A. M. (1975), *Physiol. Plant.*, 34, 51.  
tesis doctoral, Universidad de Marsella, Francia.
79. MARIGO, G., y BOUDET, A. M. (1977), *Physiol. Plant.*, 41, 197.
80. SANTIMONE, M. (1973), *Mécanismes des réaction d'oxidation peroxydative*,
81. SCHONBAUM, G. R., y LO, S. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 3353.
82. COTTON, M. L., y DUNFORD, H. B. (1973), *Canad. J. Chem.*, 51, 582.
83. RICARD, J.; BUC, J., y MEUNIER, J. C. (1977), *Eur. J. Biochem.*, 80, 581.
84. MILLER, R. W.; SIROIS, J. C., y MORITA, H. (1975), *Plant Physiol.*, 55, 35.
85. RAY, P. M., y THIMANN, K. V. (1956), *Arch. Biochem. Biophys.*, 64, 175.
86. ENGELSMAN, G. (1964), *Nature*, 202, 88.
87. ACOSTA, M. (1976), *Naturaleza y mecanismo de acción del enzima ácido indolacético oxidasa*, tesis doctoral, Universidad de Murcia, España.
88. CUELLO, J.; SÁNCHEZ-BRAVO, J., y SABATER, F. (1975), *Anales de Química*, 71, 190.
89. VIDIGAL, C. C. C.; ZINNER, K.; DURÁN, N.; BECHARA, E. J. H., y CILENTO, G. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 65, 138.
90. SCHONBAUM, G. R. (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 502.
91. SCHEJTER, A.; LANIR, A., y EPSTEIN, N. (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, 147, 36.
92. RICARD, J.; SANTIMONE, M., y VOGT, G. (1968), *C. R. Acad. Sci. (París)*, 267, 1414.
93. DOUZOU, P. (1973), en *Oxidase and Related Redox Systems*, 2.<sup>a</sup> ed. (King, T. E.; Mason, H. S., y Morrison, M., eds.), págs. 389-401, University Park Press, Baltimore, Md.
94. BAGGER, S., y WILLIAMS, R. P. J. (1971), *Acta Chem. Scand.*, 25, 976.
95. TAMURA, M., y YAMAZAKI, I. (1972), *J. Biochem. (Tokyo)*, 71, 311.
96. SIROIS, J. C., y MILLER, R. W. (1972), *Plant Physiol.*, 49, 1012.



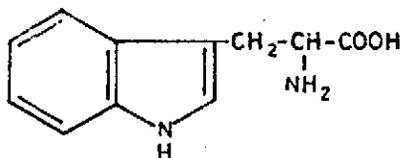
97. CRITCHLOW, J. E., y DUNFORD, H. B. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 3703.  
 98. DUNFORD, H. B., y COTTON, M. L. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 2920.  
 99. HEWSON, W. D., y DUNFORD, H. B. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 6036.  
 100. SHIGA, T., e IMAIZUMI, K. (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 469.  
 101. JOB, D., y DUNFORD, H. B. (1976), *Eur. J. Biochem.*, 66, 607.  
 102. DUNFORD, H. B., y STILLMAN, J. S. (1976), *Coordination Chemistry Reviews*, 19, 187-251.  
 103. DAVIES, D. M.; JONES, P., y MANTLE, D. (1976), *Biochem. J.*, 157, 247.  
 104. TONFS, P.; ROBSON, T., y BROWN, S. B. (1973), *Biochem. J.*, 135, 353.  
 105. KELLY, H. C.; DAVIES, D. M.; KING, M. J., y JONES, P. (1977), *Biochemistry*, 16, 3543.  
 106. HNELSKI, B. H., y GEBIKI, J. M. (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, 364, 233.

## ABREVIATURAS

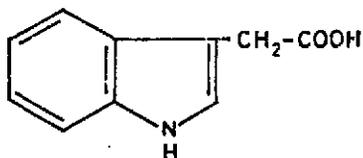
|                               |  |
|-------------------------------|--|
| AIA                           | Acido indol-3-acético.                     |
| IAId                          | Indol-3-aldehído.                          |
| HMO                           | 3-hidroximetiloxindol.                     |
| MO                            | 3-metilenoxindol.                          |
| IM                            | Indol-3-metanol.                           |
| HRP                           | Peroxidasa de rábano (horseradish).        |
| Fe <sub>p</sub> <sup>3+</sup> | Ferriperoxidasa.                           |
| Fe <sub>p</sub> <sup>2+</sup> | Ferropoxidasa.                             |
| Co-I                          | Compuesto I de Peroxidasa.                 |
| Co-II                         | Compuesto II de Peroxidasa.                |
| Co-III                        | Compuesto III de Peroxidasa.               |
| IBA                           | Acido indol-3-butírico.                    |
| 2,4-D                         | Acido 2,4-diclorofenoxiacético.            |
| DCP                           | 2,4-diclorofenol.                          |
| HQ                            | Hidroquinona.                              |
| DPPH                          | Radical difenil-picril-hidrácido.          |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Anión superóxido.                          |
| e                             | Electrón.                                  |
| E/S                           | Relación enzima/sustrato.                  |
| [X]                           | Concentración de la sustancia X.           |
| M                             | Concentración Molar.                       |
| N                             | Concentración Normal.                      |
| v                             | velocidad.                                 |
| UV                            | Ultravioleta.                              |
| λ                             | Longitud de onda.                          |
| Δ                             | Incremento.                                |
| A                             | Absorbancia.                               |
| ε                             | coeficiente de extinción molar.            |
| K                             | Constante de equilibrio.                   |
| k                             | Constante cinética.                        |
| h                             | hora.                                      |
| mn                            | minuto.                                    |
| seg, s                        | segundo.                                   |
| m                             | Prefijo <i>mili</i> (× 10 <sup>-3</sup> )  |
| μ                             | Prefijo <i>micro</i> (× 10 <sup>-6</sup> ) |
| n                             | Prefijo <i>nano</i> (× 10 <sup>-9</sup> )  |



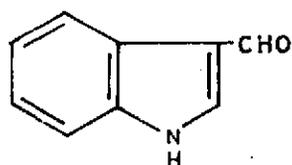
FORMULAS DE LAS SUSTANCIAS QUE SE CITAN



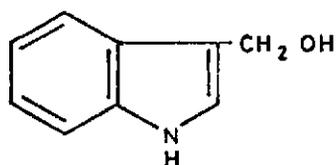
Triptofano



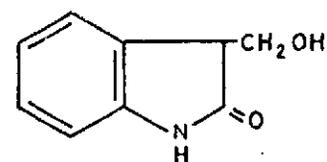
Acido indol-3-acético



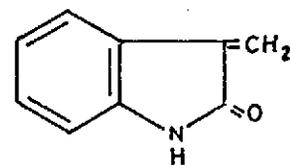
Indol-3-aldehido



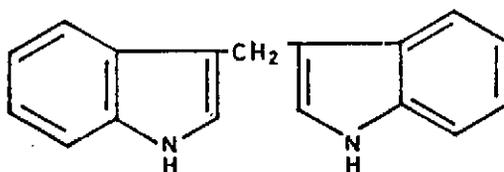
Indol-3-metanol



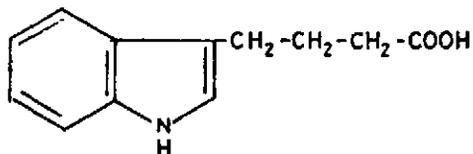
3-hidroximetil oxindol



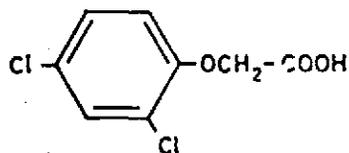
3-metilenoxindol



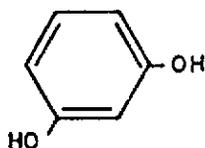
3,3'-diindolilmetano



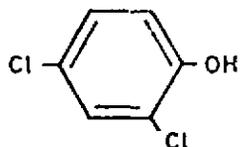
Acido indol-3-butírico



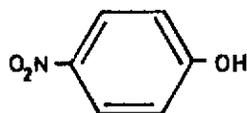
Acido 2,4-diclorofenoxiacético



Resorcinol



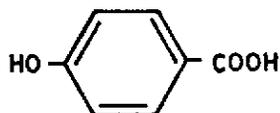
2,4-diclorofenol



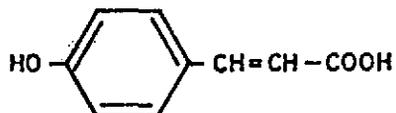
p-nitrofenol



p-cresol



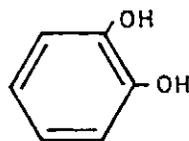
Acido p-hidroxibenzoico



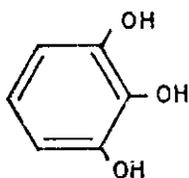
Acido p-cumárico



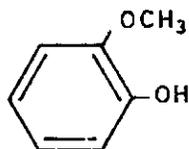
Hidroquinona



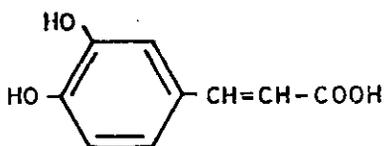
Catecol



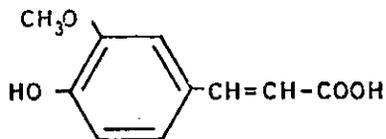
Pirogalol



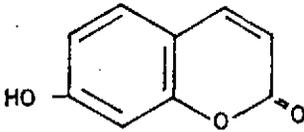
Guayacol



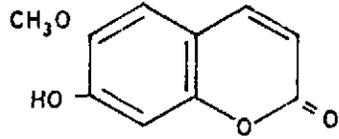
Acido cafeico



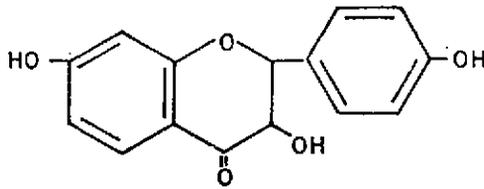
Acido ferúlico



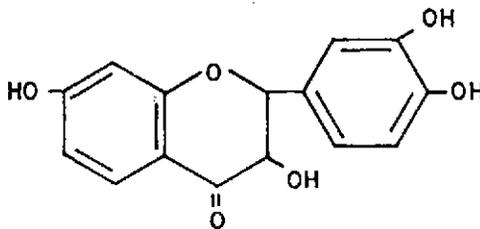
Umbeliferona



Escopoletina



Kaempferol



Quercetina

TABLA 1

EFFECTO DE LOS COFACTORES SOBRE LA OXIDACION DEL ACIDO  
INDOL-3-ACETICO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION  
DE PEROXIDASA

Los resultados se expresan como cambios en densidad óptica a 254 nm, después de una hora de reacción. La temperatura era de 30° C, pH 6.3 (tampón fosfato 0.06 M). Las concentraciones de reactivos eran:  $[AIA] = 3 \times 10^{-4}$  M;  $[DCP] = 10^{-4}$  M;  $[Mn^{2+}] = 10^{-4}$  M.

| $[HRP] \times 10^{-9}$ M | AIA  | AIA + $Mn^{2+}$ | AIA + DCP | AIA + DCP + $Mn^{2+}$ |
|--------------------------|------|-----------------|-----------|-----------------------|
| 83.3                     | 0.80 |                 |           |                       |
| 33.3                     | 0.51 | 0.35            | 0.57      |                       |
| 8.33                     | 0.12 | 0.04            | 0.66      |                       |
| 4.16                     | 0.05 | 0.00            | —         |                       |
| 1.00                     | 0.00 | 0.00            | 0.89      |                       |
| 0.50                     | 0.00 |                 | 0.92      |                       |
| 0.25                     | 0.00 |                 | 0.66      |                       |
| 0.125                    | 0.00 |                 | 0.12      |                       |
| 0.06                     | 0.00 |                 | 0.00      | 0.60                  |
| 0.04                     | 0.00 |                 | 0.00      | 0.37                  |
| 0.02                     | 0.00 |                 | 0.00      | 0.17                  |

TABLA 2

EFFECTO DEL 2,4-DICLOROFENOL SOBRE LA PEROXIDACION DEL ACIDO  
INDOL-3-ACETICO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION  
DE PEROXIDASA

Los resultados se expresan como velocidades relativas con respecto a un blanco carente de 2,4-diclorofenol. Las velocidades iniciales se miden a 254 nm. La temperatura fue de 30° C, pH 6 (tampón fosfato 0.06 M). Concentraciones de reactivos:  $[AIA] = 4 \times 10^{-4}$  M;  $[H_2O_2] = 7.74 \times 10^{-4}$  M;  $[DCP] = 1.63 \times 10^{-9}$  M.

| $[HRP] \times 10^{-9}$ M | v/v. |
|--------------------------|------|
| 0.34                     | 9    |
| 1.03                     | 14.4 |
| 2.59                     | 26.7 |
| 5.16                     | 39.0 |
| 7.72                     | 38.3 |
| 10.30                    | 35.7 |

TABLA 3

CONSTANTES DE VELOCIDAD PARA LA REDUCCION DEL COMPUESTO I ( $k_2$ ) Y DEL COMPUESTO II ( $k_3$ ) DE PEROXIDASA POR DIVERSOS FENOLES Y ACIDO INDOL-3-BUTIRICO, A pH 6; 25° C; FUERZA IONICA TOTAL, 0.11 M

| Sustancia                     | $k_2$<br>$M^{-1} s^{-1}$ | $k_3$<br>$M^{-1} s^{-1}$ |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Hidroquinona ... ..           | $> 2 \times 10^7$        | $7.8 \times 10^5$        |
| Resorcinol ... ..             | $6.2 \times 10^6$        | $3.8 \times 10^5$        |
| Catecol ... ..                | $3.8 \times 10^6$        | $4.6 \times 10^5$        |
| 2,4-diclorofenol ... ..       | $1.0 \times 10^7$        | $1.5 \times 10^5$        |
| Acido indol-3-butírico ... .. | $1.3 \times 10^5$        | $9.9 \times 10^3$        |

TABLA 4

EFFECTO DEL 2,4-DICLOROFENOL SOBRE LA NATURALEZA  
DE LOS PRODUCTOS FINALES DE LA OXIDACION DEL ACIDO  
INDOL-3-ACETICO POR PEROXIDASA

Las concentraciones de los productos finales se calcularon por medidas de absorbancia en los eluatos metanólicos, a 254 nm para 3-metilenoxindol; 295 nm para indol-3-aldehído; 280 nm para ácido indol-3-acético, indol-3-metanol y 3,3'-diindolilmetano (producto polimerizado de indol-3-metanol, que no migra (0) bajo las condiciones cromatográficas descritas en Material y Métodos). Los cálculos se efectuaron usando coeficientes de extinción molar de  $25.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para 3-metilenoxindol (254 nm);  $5.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el ácido indol-3-acético, indol-3-metanol y (0) (280 nm) y  $10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para indol-3-aldehído (295 nm). Tiempo de reacción, 3 horas. Temperatura,  $30^\circ \text{C}$  y pH 6.2 (tampón fosfato 0.06 M).  $[\text{AIA}] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ . El rendimiento del método cromatográfico, calculado a partir del medio  $\text{P}_6$  en que no tiene lugar la reacción, es aproximadamente del 25 % para AIA.

( $\times 10^{-6} \text{ M}$ )

| Medio        | AIA<br>(sin reaccionar) | MO   | IAld | IM   | 0    | DCP (M)               | HRP (M)   |
|--------------|-------------------------|------|------|------|------|-----------------------|-----------|
| $\text{P}_1$ | 9.8                     | 0    | 5.7  | 15.3 | 89.3 | $10^{-4}$             | $10^{-8}$ |
| $\text{P}_2$ | 2.9                     | 0.78 | 5.6  | 48.0 | 40.0 | $10^{-4}$             | $10^{-8}$ |
| $\text{P}_3$ | 3.4                     | 0    | 10.0 | 69.3 | 50.6 | $0.25 \times 10^{-4}$ | $10^{-8}$ |
| $\text{P}_4$ | 16.8                    | 3.44 | 3.6  | 16.2 | 34.6 | $0.25 \times 10^{-4}$ | $10^{-8}$ |
| $\text{P}_5$ | 9.1                     | 2.22 | 4.2  | 25.8 | 18.1 | 0                     | $10^{-8}$ |
| $\text{P}_6$ | 69.3                    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0                     | $10^{-8}$ |

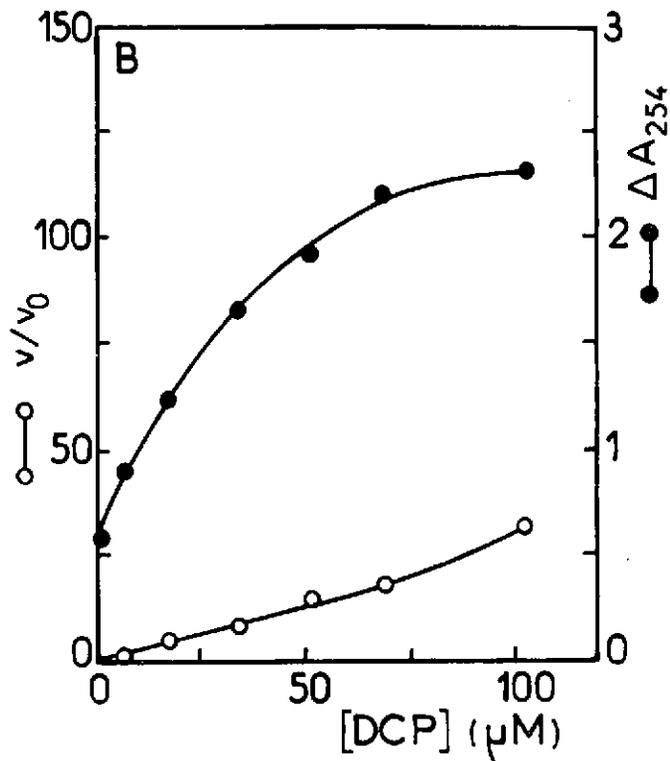
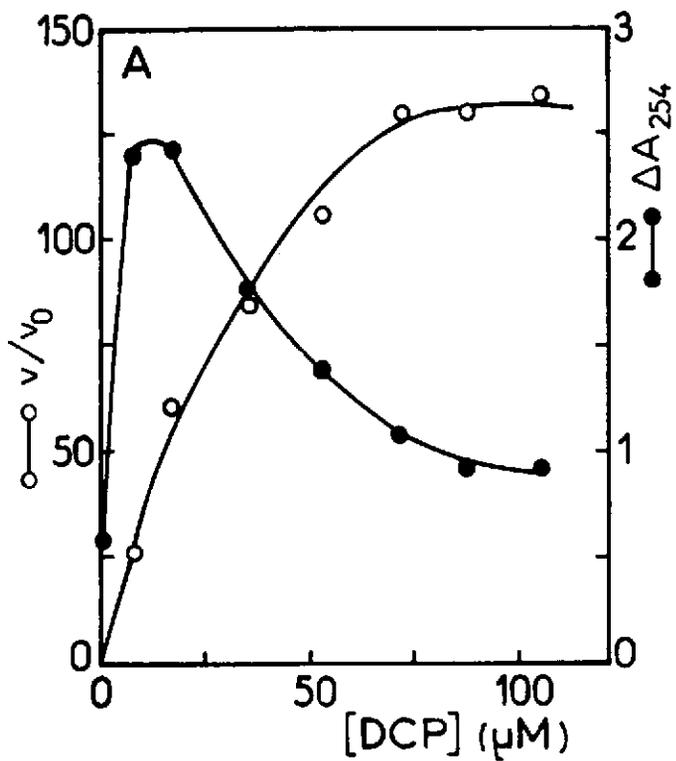


Figura 1. Efecto del DCP sobre la velocidad de oxidación de AIA por peroxidasa (○) y sobre la formación de 3-metilenoxindol (●) a pH 6 (A) y 4.15 (B)

Los datos de velocidad se expresan como velocidades relativas con respecto a un blanco carente de DCP. Las velocidades iniciales se miden a 254 nm. Los espectros de absorción registrados después de 12 horas de reacción eran típicos de 3-metilenoxindol. El rendimiento en 3-metilenoxindol después de este tiempo de reacción se expresó como la diferencia en absorbancia a 254 nm entre una muestra que contiene DCP y un blanco que sólo contiene AIA. En todos los medios, las concentraciones fueron  $[HRP] = 3.4 \times 10^{-9}$  M;  $[AIA] = 3.9 \times 10^{-4}$  M. La fuerza iónica era 0.06 M (tampón fosfato pH 6 (A); tampón citrato-fosfato pH 4.15 (B)). Temperatura, 30° C.

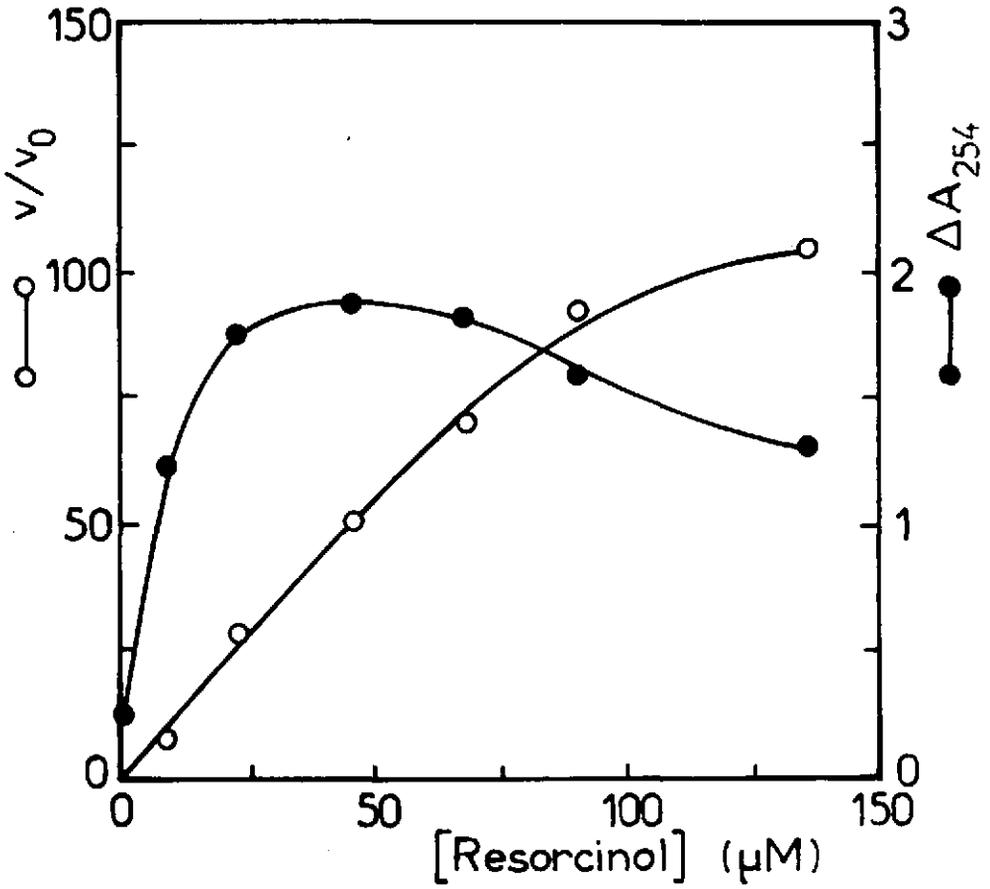


Figura 2. Efecto del resorcinol sobre la velocidad de oxidación de AIA por peroxidasa (○) y sobre la formación de 3-metilenoxindol (●) a pH 6

Condiciones experimentales como las de la figura 1-A, excepto que se usó resorcinol en lugar de DCP.

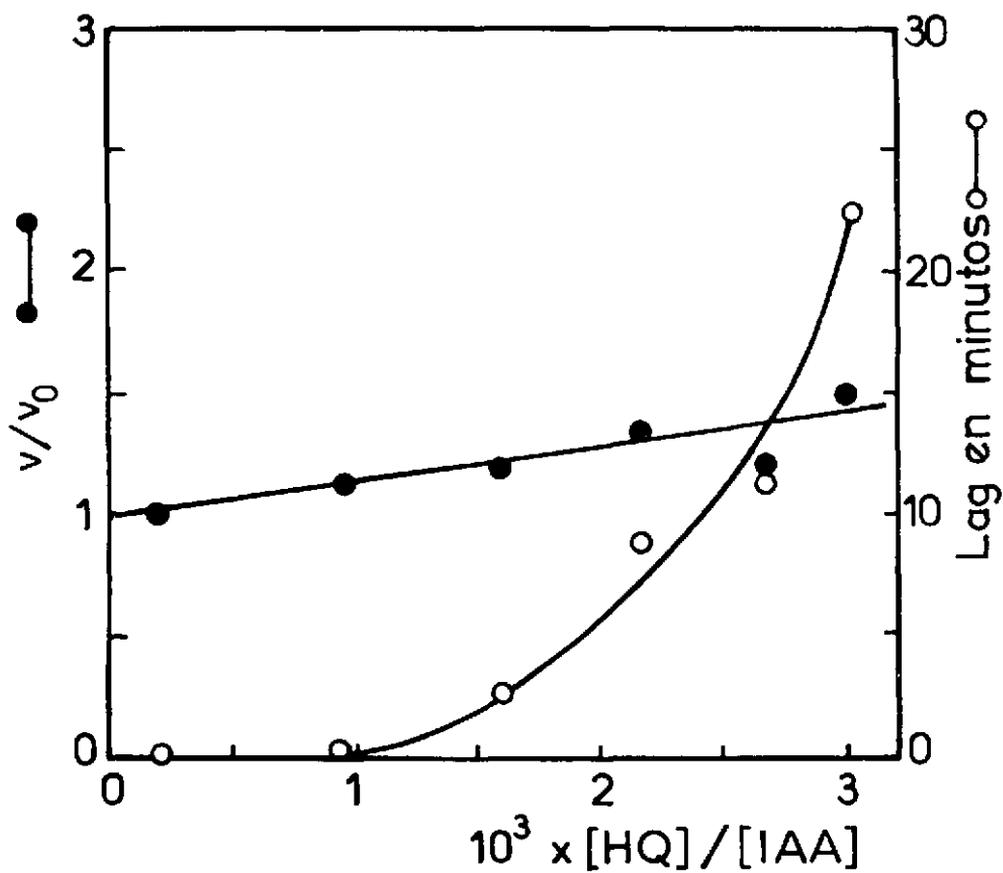


Figura 3. Efecto de hidroquinona sobre la oxidación de AIA por peroxidasa a pH 6

Los datos de velocidad (●) se expresaron como velocidades relativas con respecto a un blanco carente de hidroquinona. Las velocidades iniciales se midieron a 254 nm. Los círculos blancos representan la duración del período de latencia medido a diferentes concentraciones de hidroquinona. En todos los medios  $[\text{HRP}] = 7.8 \times 10^{-8} \text{ M}$  y  $[\text{AIA}] = 4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Fuerza iónica 0.06 (tampón fosfato). Temperatura, 30° C.

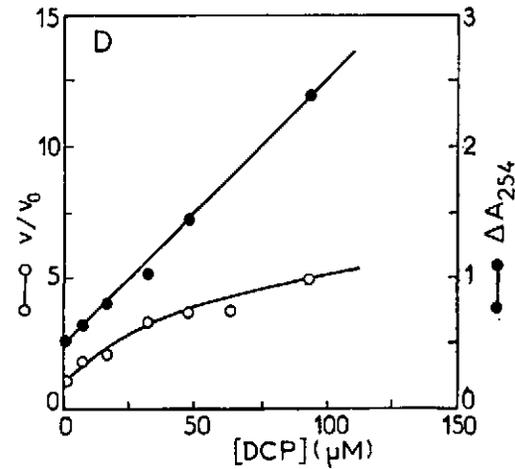
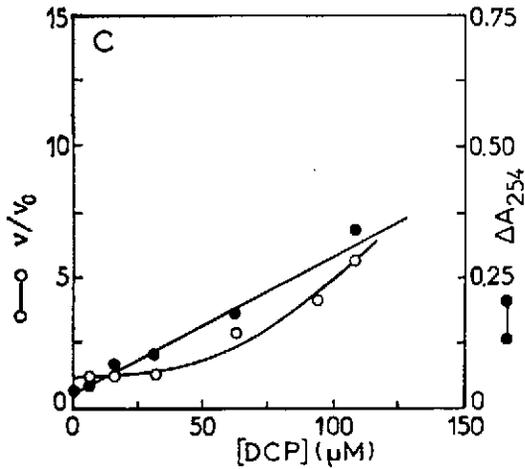
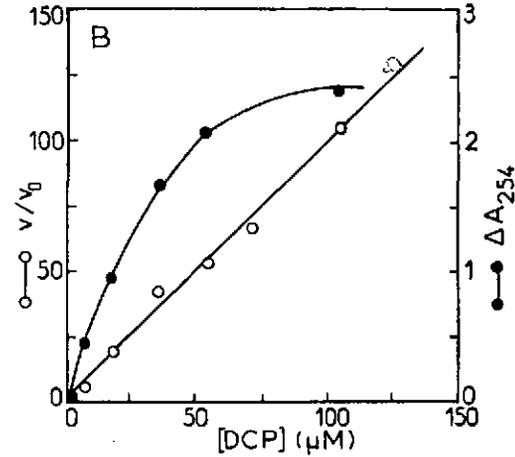
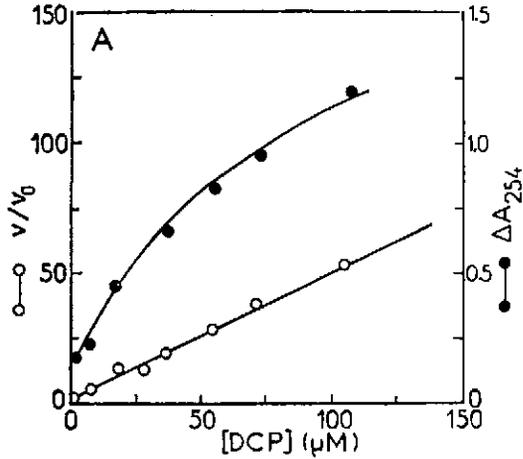


Figura 4. Efecto del 2,4-diclorofenol sobre la velocidad de peroxidación de los ácidos indol-3-acético e indol-3-butírico (○), así como sobre la formación de 3-metilenoxindol (●) a pH 6 (A, ácido indol-3-acético, y B, ácido indol-3-butírico) y a pH 4.15 (C, ácido indol-3-acético, y D, ácido indol-3-butírico)

Los datos de velocidad se expresan como velocidades relativas con respecto a un blanco que carece de 2,4-diclorofenol. Las velocidades iniciales se miden a 254 nm. El rendimiento en 3-metilenoxindol después de 12 horas de reacción se expresa como la diferencia en absorbancia a 254 nm entre una muestra que contiene 2,4-diclorofenol y un blanco que sólo contiene AIA. En todos los medios, las concentraciones eran:  $[HRP] = 3.4 \times 10^{-10}$  M;  $[H_2O_2] = 7.8 \times 10^{-4}$  M;  $[AIA]$  o  $[IBA] = 3.8 \times 10^{-4}$  M. La fuerza iónica era 0.06 (tampón fosfato pH 6 en los medios A y B; tampón citrato-fosfato en los medios C y D). Temperatura, 30°C.

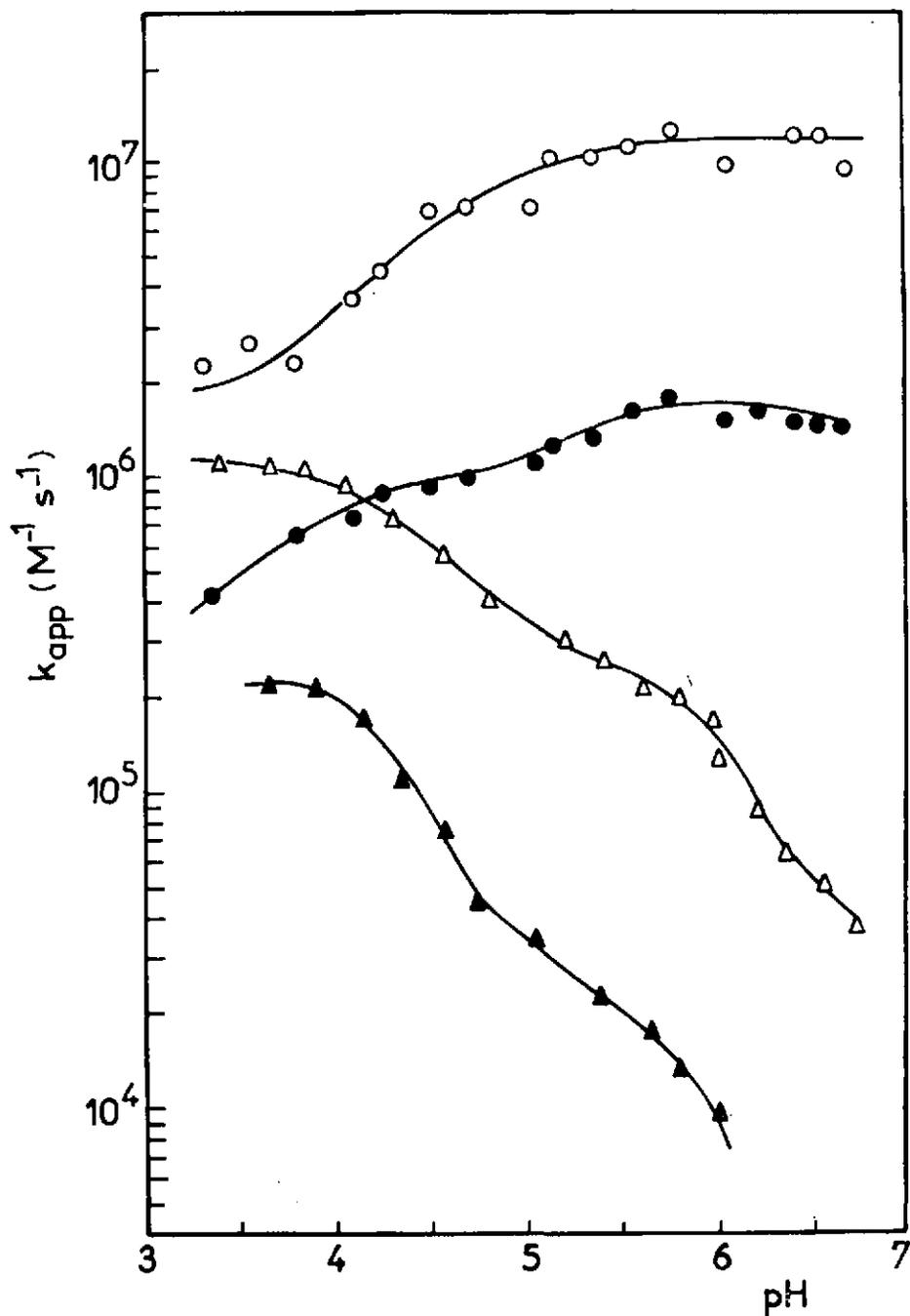


Figura 5. Representación de las  $k_{app}$ , constantes de velocidad de segundo orden aparentes para la reducción de Compuesto I por 2,4-diclorofenol (○) y por ácido indol-3-butírico (△) y para la reducción de Compuesto II por 2,4-diclorofenol (●) y por ácido indol-3-butírico (◆), en función del pH

La temperatura fue de 25° C y la fuerza iónica 0.11.

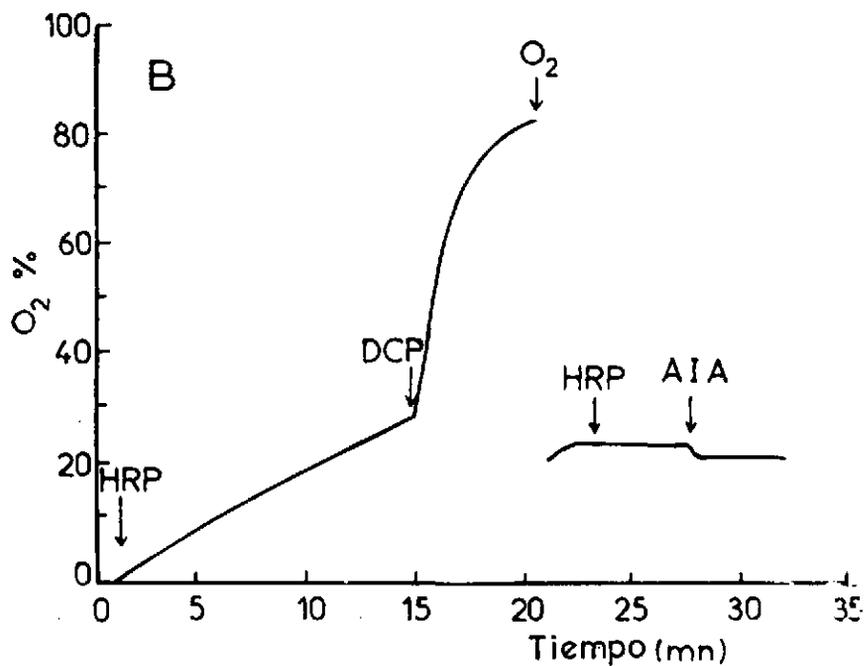
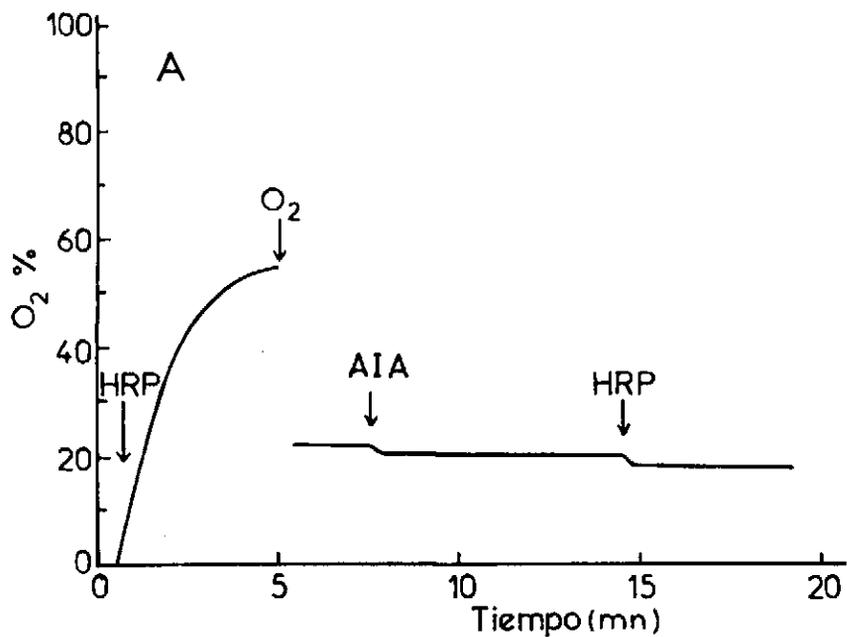


Figura 6. Efecto del DCP sobre el consumo de oxígeno durante la oxidación de AIA por peroxidasa a pH 6.3

Los medios iniciales de reacción contenían AIA  $3 \times 10^{-4}$  M en 3 ml de tampón fosfato 0.06 M. Los medios se saturaban con aire. Las reacciones se iniciaron por adición de 0.05 ml de HRP  $5.0 \times 10^{-5}$  M (primera flecha en A y B). En (A) el medio de reacción contenía DCP  $10^{-4}$  M previamente a la adición de HRP; mientras que en (B) se añadían 0.1 ml de una disolución  $10^{-3}$  M en DCP, 15 minutos después de HRP (segunda flecha en B). Las otras flechas representan las adiciones de oxígeno, AIA  $10^{-2}$  M (0.1 ml) y HRP  $5.0 \times 10^{-5}$  M (0.05 ml). Las reacciones se desarrollaron a 30° C en agitación constante.

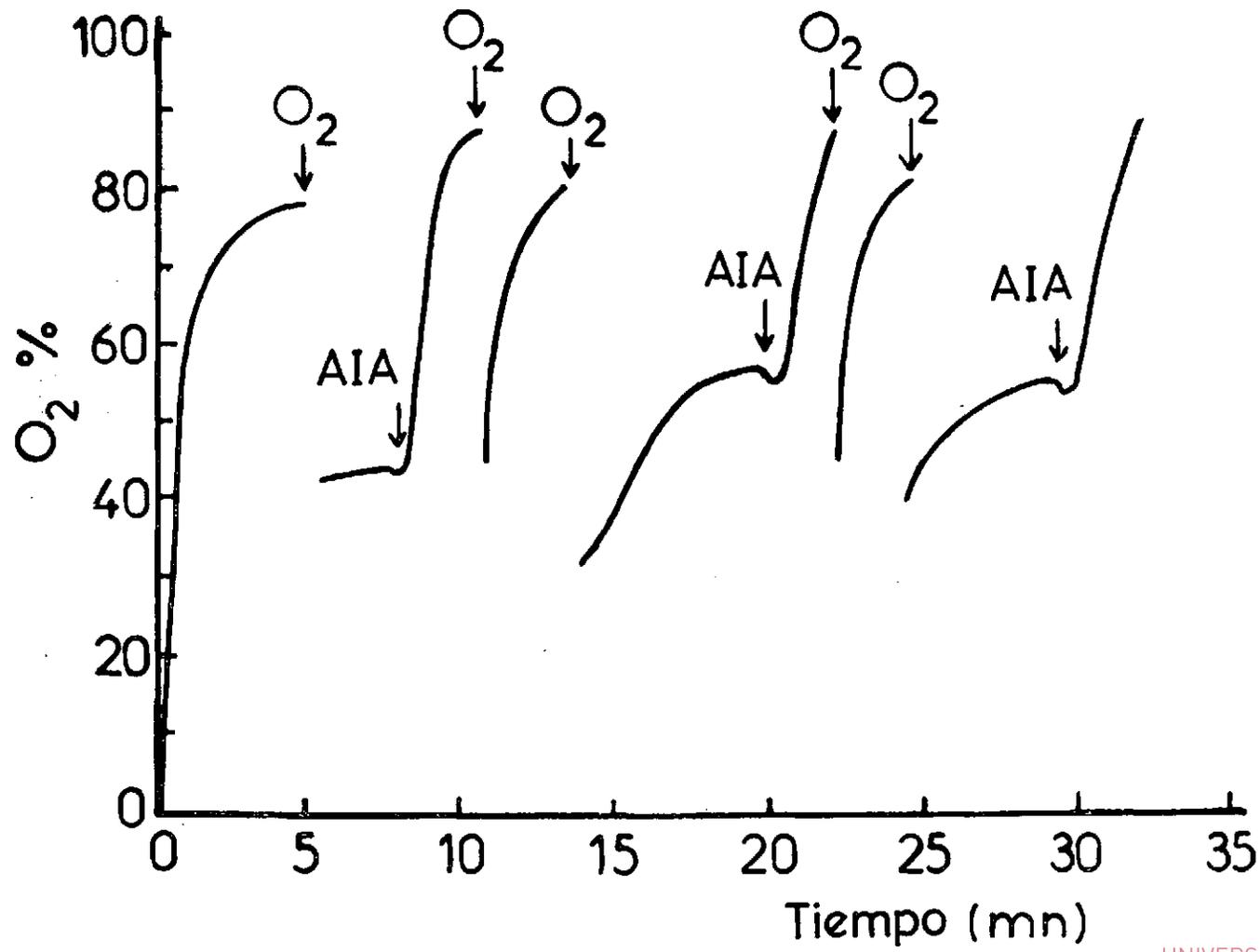


Figura 7. Efecto de DCP +  $Mn^{2+}$  sobre el consumo de oxígeno durante la oxidación de AIA por peroxidasa a pH 6.3

Condiciones experimentales como en la figura 6-A, excepto que el medio de reacción contenía  $Mn^{2+}$   $10^{-4}$  M. Las flechas representan las adiciones sucesivas de oxígeno y AIA (ver figura 6-A).

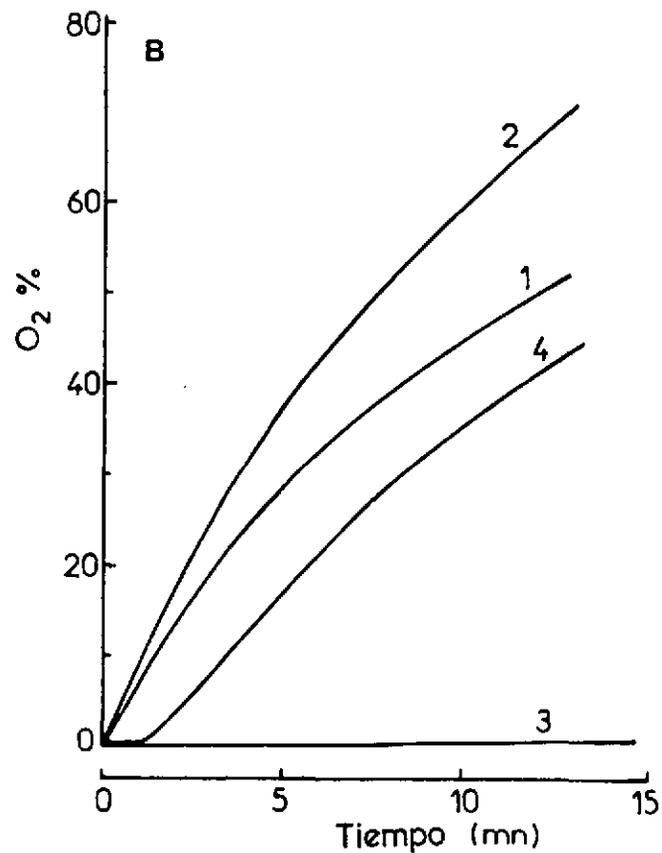
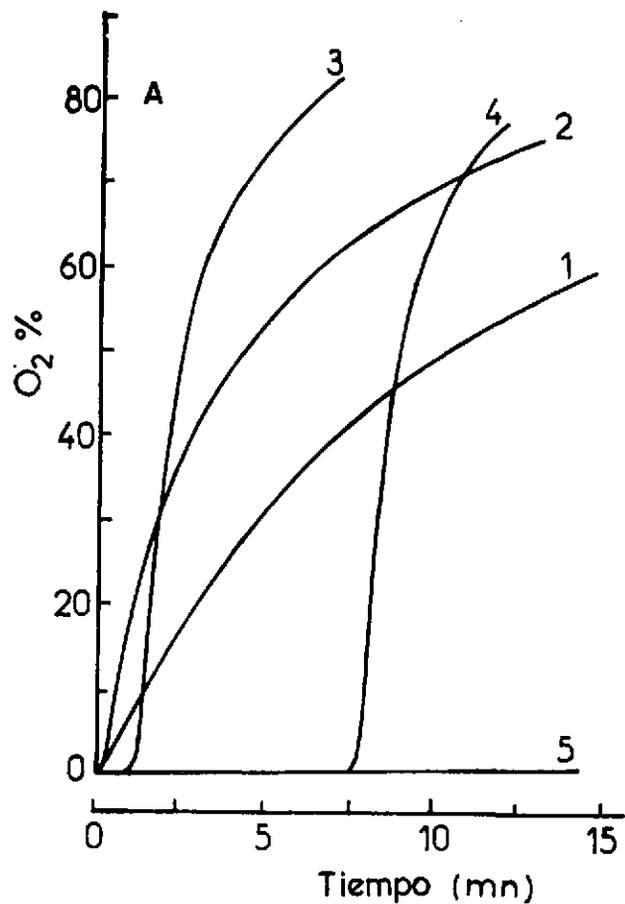


Figura 8. Efecto de los productos de oxidación del DCP (A) y de ácido p-cumárico, ácido cafeico y sus productos de oxidación (B) sobre el consumo de oxígeno durante la oxidación de AIA por peroxidasa

(A y B). Los medios de reacción contenían AIA  $3 \times 10^{-4}$  M en 3 ml de tampón fosfato 0.06 M, pH 6.3. Las reacciones se iniciaban por adición de 0.05 ml de HRP  $5.0 \times 10^{-5}$  M. Los medios se saturaban con aire y la temperatura fue de 30° C.

(A). (1) Control; curvas 2 a 5, las mismas condiciones que para (1) excepto que el medio de reacción contenía cantidades crecientes de productos de oxidación del DCP (formados independientemente en presencia de HRP y  $H_2O_2$ ). Las concentraciones en productos de oxidación del DCP fueron:  $9 \times 10^{-6}$  M;  $4.5 \times 10^{-5}$  M;  $6.0 \times 10^{-5}$  M y  $1.1 \times 10^{-4}$  M para las curvas 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

(B). (1) Control idéntico a (1) en (A); curvas 2, 3, 4 las mismas condiciones que (1) excepto que el medio de reacción contenía ácido p-cumárico  $10^{-5}$  M (curva 2); ácido cafeico  $10^{-5}$  M (curva 3) y productos de oxidación del ácido cafeico  $10^{-5}$  M (formados independientemente en presencia de HRP y  $H_2O_2$ ) (curva 4).



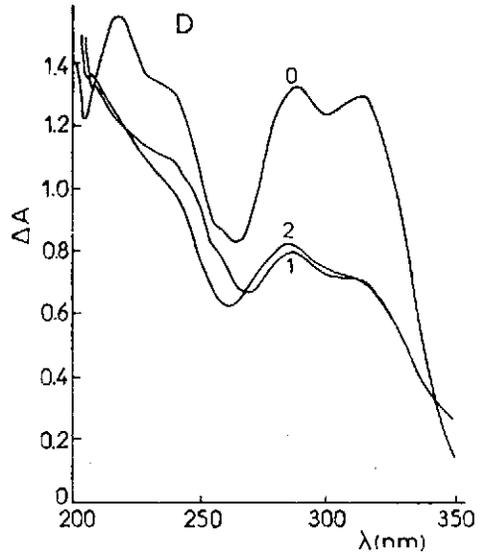
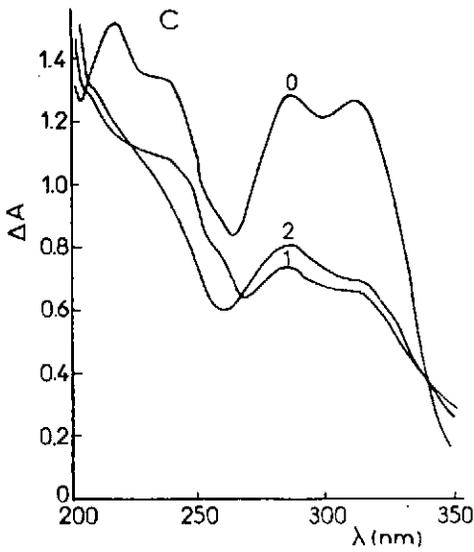
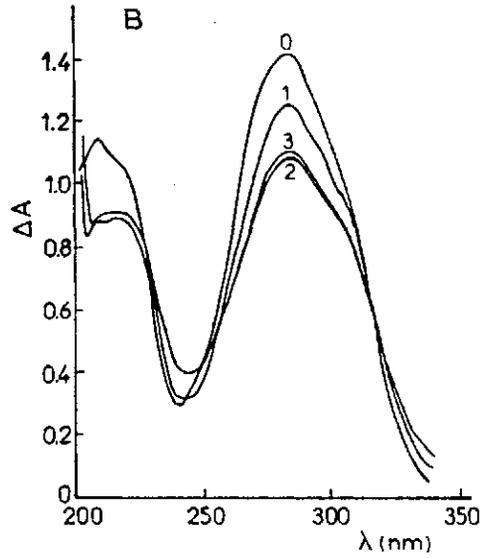
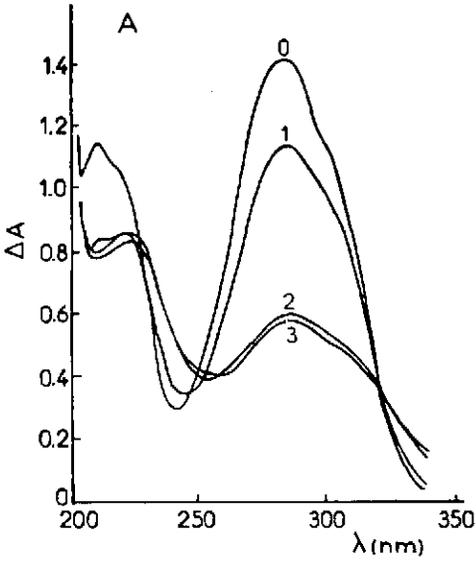


Figura 9. Efecto del  $Mn^{2+}$  sobre la oxidación de ácido p-cumárico (A y B) y ácido cafeico (C y D) en presencia de peroxidasa y  $H_2O_2$  a pH 6.3

(A y B). Los medios de reacción contenían: HRP  $8.3 \times 10^{-10}$  M ácido p-cumárico  $10^{-4}$  M y  $H_2O_2$   $1.7 \times 10^{-4}$  M; pH 6.3 (tampón fosfato 0.06 M). Temperatura, 30° C.

(A). El espectro 0 corresponde al ácido p-cumárico, los espectros 1, 2 y 3 se registraron después de 1 minuto, 30 minutos y 67 minutos de reacción, respectivamente.

(B). Las mismas condiciones que en (A) salvo que el medio de reacción contenía, además,  $Mn^{2+}$  ( $10^{-4}$  M).

(C y D). Condiciones similares a (A y B) excepto que ácido cafeico  $10^{-4}$  M reemplaza al ácido p-cumárico.

(C). Los espectros 0, 1 y 2 se registraron después de 1 minuto, 30 minutos y 60 minutos de reacción, respectivamente.

(D). Las mismas condiciones que en (C) salvo que el medio de reacción contenía, además,  $Mn^{2+}$  ( $10^{-4}$  M).

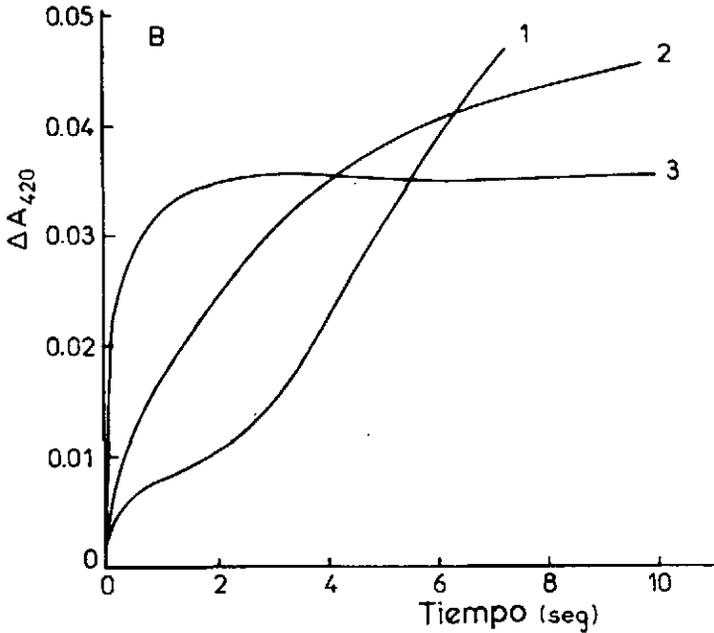
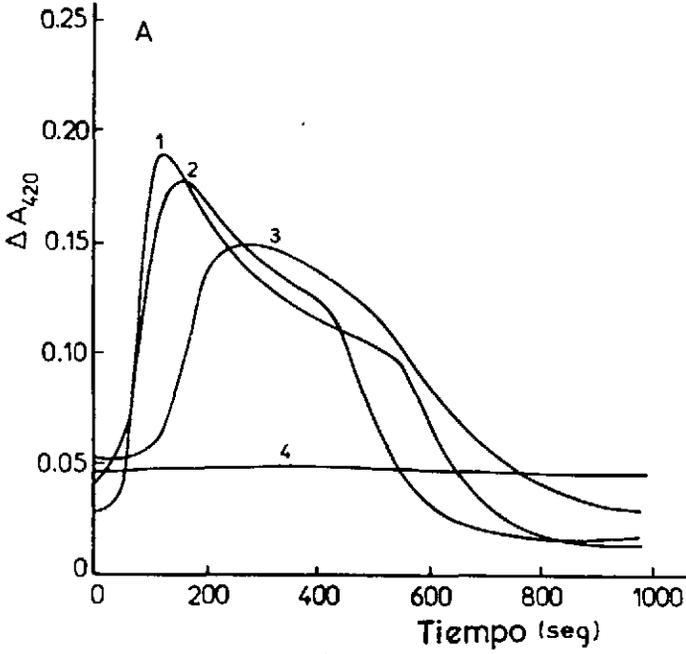


Figura 10. Cinética de los cambios de absorbancia registrados a 420 nm después de mezclar rápidamente peroxidasa con AIA en presencia o ausencia de DCP a pH 6 (A) y pH 4.15 (B)

(A). Concentraciones de reaccionantes:  $[HRP] = 2.14 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $[AIA] = 26.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ; fuerza iónica, 0.11 M (tampón fosfato 0.01 M y  $\text{NO}_3\text{K}$  0.1 M); temperatura, 25°C.

Curva 1: Control sin DCP.

Curvas 2, 3 y 4: La jeringa directriz, que contenía AIA, también contenía DCP 0.76  $\mu\text{M}$ , 3.8  $\mu\text{M}$  y 7.6  $\mu\text{M}$  respectivamente (las concentraciones finales en DCP deben dividirse por dos).

(B). Concentraciones de reaccionantes:  $[HRP] = 2.15 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;  $[AIA] = 13.25 \times 10^{-6} \text{ M}$ ; fuerza iónica, 0.11 M (tampón citrato-fosfato 0.01 M y  $\text{NO}_3\text{K}$  0.1 M); temperatura, 25°C.

Curva 1: Control sin DCP.

Curvas 2 y 3: La jeringa directriz, que contenía AIA, también contenía DCP 0.23  $\times 10^{-6} \text{ M}$  y 0.76  $\times 10^{-6} \text{ M}$  respectivamente.

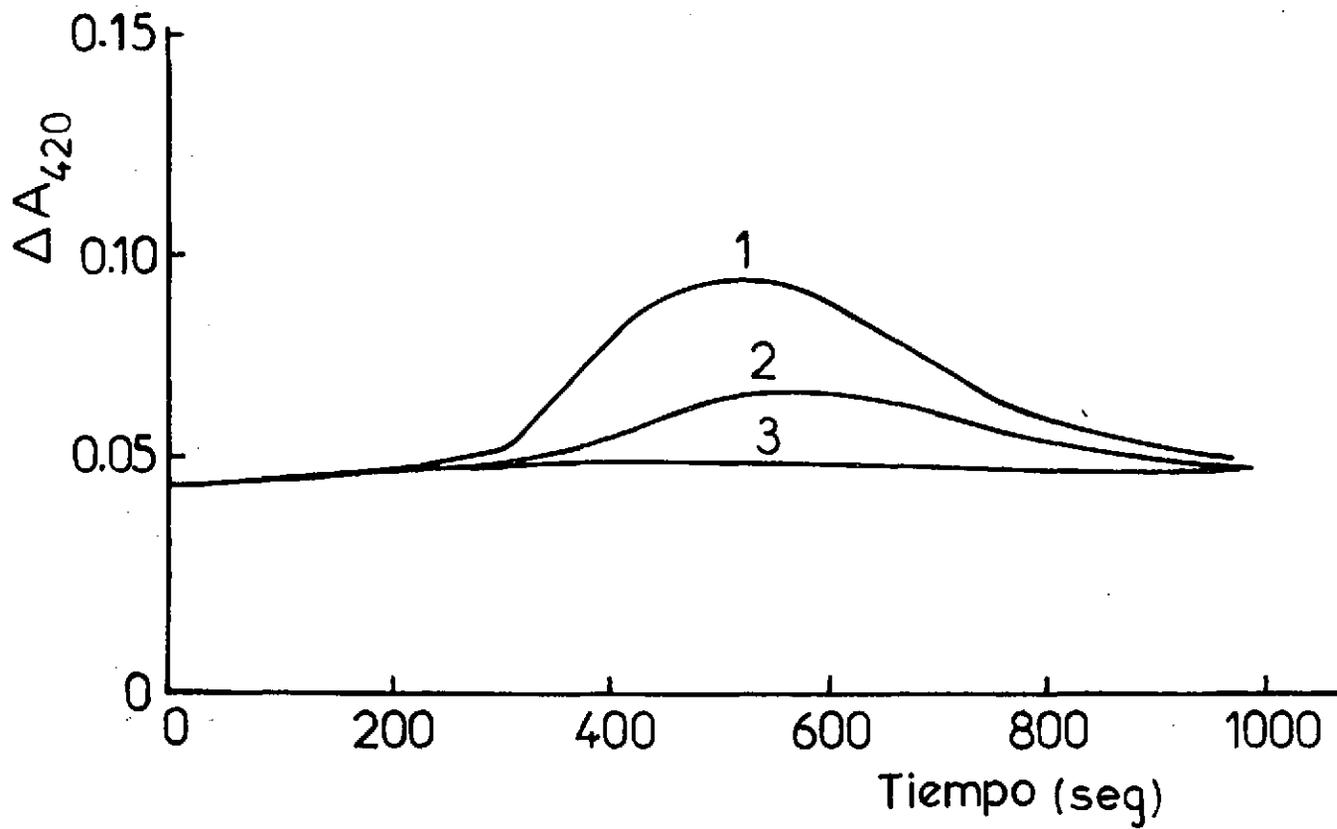


Figura 11. Efecto de DCP +  $Mn^{2+}$  sobre la aparición de compuestos enzimáticos detectados después de mezclar rápidamente disoluciones de peroxidasa y AIA

Las reacciones se registraron a 420 nm; pH 6; fuerza iónica, 0,11 M (tampón fosfato 0,01 M y  $NO_3K$  0,1 M); temperatura, 25°C. Concentraciones de reaccionantes:  $[HRP] = 2.14 \times 10^{-8}$  M;  $[AIA] = 26.5 \times 10^{-8}$  M;  $[DCP] = 3.8 \times 10^{-8}$  M (las mismas condiciones que en la curva 4 de la figura 10-A).

Curva 3: Como antes.

Curvas 1 y 2: Los medios de reacción también contenían  $Mn^{2+}$   $4.24 \times 10^{-8}$  M y  $2.12 \times 10^{-8}$  M respectivamente.

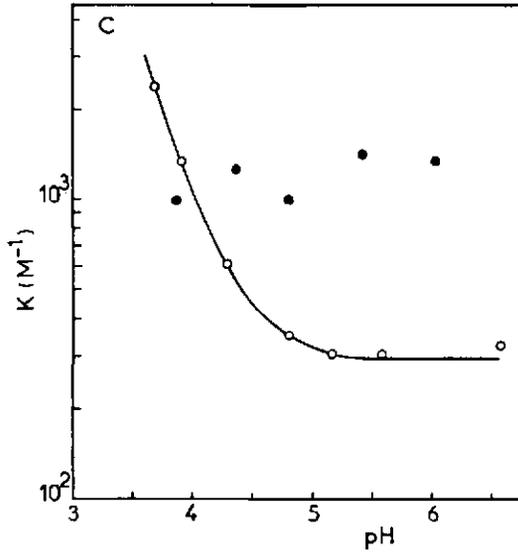
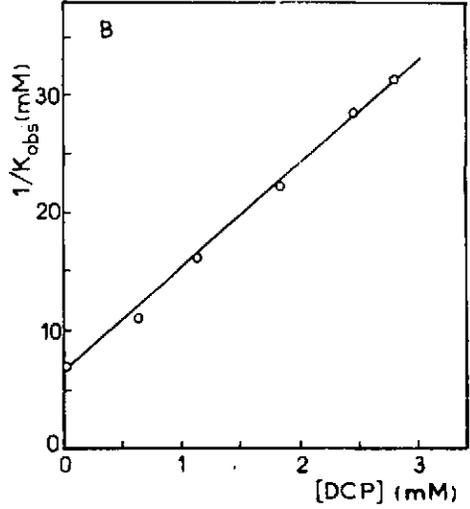
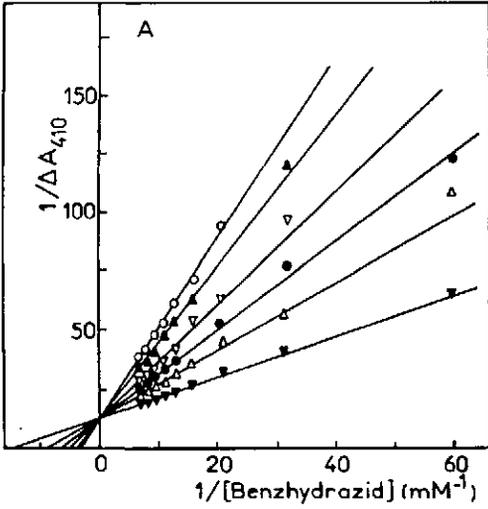


Figura 12. Determinación de las constantes de equilibrio de asociación para la fijación de ácido indol-3-butírico y 2,4-diclorofenol sobre peroxidasa

A. Fijación de benzhidrazida a peroxidasa en presencia de varias concentraciones de 2,4-diclorofenol; pH 5.4; temperatura, 25°C; fuerza iónica, 0.11 M. Los cambios de absorbancia se midieron a 410 nm, máximo característico en el espectro de absorción del complejo benzhidrazida-peroxidasa. Las concentraciones de reaccionantes fueron:  $[HRP] = 2.39 \mu\text{M}$ .

○ DCP = 2.78 mM; ▲ DCP = 2.43 mM; ▽ DCP = 1.82 mM.

● DCP = 1.22 mM; △ DCP = 0.607 mM; ▼ DCP = 0.

Para estas concentraciones de enzima y DCP, los cambios de absorbancia debidos a la formación del complejo peroxidasa-DCP eran despreciables comparados con los correspondientes a la fijación de benzhidrazida. En tales condiciones, cualquier longitud de onda puede considerarse, aproximadamente, como isobéptica entre el espectro de absorción de la peroxidasa y el del complejo peroxidasa-DCP. Las líneas rectas corresponden a la ecuación 2 en el texto. Las intersecciones con el eje  $1/[\text{Benzhidrazida}]$  permiten la determinación de  $1/K_{obs}$  (ver ecuaciones en el texto).

B. Representación de  $1/K_{obs}$ , constante de disociación aparente del complejo benzhidrazida-peroxidasa en presencia de varias cantidades de DCP, en función de la concentración en DCP. Las cantidades son las de la figura 12-A. La línea recta corresponde a la ecuación 3 en el texto.

C. Dependencia del pH de las constantes de equilibrio de asociación correspondientes a la fijación de DCP sobre peroxidasa (●) y a la fijación del ácido indol-3-butírico sobre peroxidasa (○). Las constantes se calculan, para cada valor de pH, a partir de los experimentos y análisis mostrados en la figura 12, A y B.