

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE METIL-1,4-BENZOQUINONAS

por

MARIA ISABEL ARDAO* y GLORIA MARTINEZ*

La secreción externa del arácnido sudamericano de la familia Gonileptidae, *Heteropachyoidelus robustus* Rower, mezcla de 2,3-dimetil-, 2,5-dimetil-, 2,3,5-trimetil-1,4-benzoquinona¹ muestra una amplia actividad biológica como antibiótico "in vitro" e "in vivo", contra microorganismos Gram positivo y Gram negativo en general, y como parasiticida contra protozoarios, *Tripanosoma cruzi*, *Plasmodio berghei*, *trichomonas*, *giardias*, *hexamites*, *tenias*, *tenia hidatígena* y su escólex.^{2,3} Además, todos estos compuestos muestran toxicidad en mamíferos.⁴

En este trabajo se trata de dilucidar el mecanismo de la actividad antibiótica y tóxica de las metilquinonas citadas, con respecto a las más importantes reacciones químicas de las sustancias quinónicas.

EXPERIMENTACION

REACCIONES DE ADICION CON COMPUESTOS A GRUPO AMINO

Es sabido que las 1,4-benzoquinonas, actuando como cetonas alfa-beta no saturadas, dan combinaciones 2,5-disustituidas con aminoácidos y aminas.⁵

Aminoácidos.—Las metilquinonas dan rápidamente productos de adición coloreados

con los aminoácidos a pH fisiológico. El compuesto ácido no ionizado (por debajo de pH 5.5) tiene color amarillo naranja mientras que su anión es intensamente coloreado en rojo púrpura, con máximos de densidad óptica entre 490 y 510 milimicras. La sensibilidad de la reacción disminuye con la longitud de la cadena del aminoácido, aumenta en los aminoácidos diaminados y es muy baja con los aminoácidos dicarboxílicos (tabla I).

TABLA I

**CANTIDADES MINIMAS
DE AMINOACIDOS DETECTABLES
POR 2,3-DIMETIL-BENZOQUINONA**

Aminoácido	μg/ml.	λ máximo (mμ)
Glicina	0.5	500
Alanina	5	498
Leucina	8	502
Metionina	10	498
Valina	10	494
Lisina	5	496
Arginina	5	—
Glutámico	200	—
Aspártico	200	—

Concentración de la 2,3-dimetil-benzoquinona: 5×10^{-3} M. disuelta en buffer de Teorell pH 9.5.

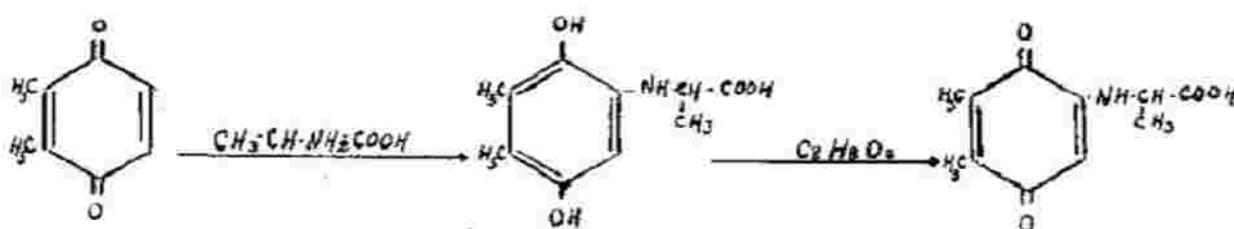
* Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica, Montevideo, Uruguay.

Acido 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona aminoacético.—La mezcla en cantidades equi-

moleculares del aminoácido y la quinona en fosfato buffer de pH 7.4 se dejó por 24 horas a la temperatura del laboratorio. Se eliminó el exceso de quinona por lavados con éter de la solución rojo púrpura y el aminoácido no combinado se separó por cromatografía con Dowex-50. La solución coloreada en rojo se llevó a pH menor de 3, virando al amarillo naranja. Se extrajo con éter sulfúrico y el extracto etéreo se lavó con agua y con solución saturada de ClNa, se desecó y cristalizó por adición de éter de petróleo y concentración hasta saturación.

Se obtuvo un conglomerado de agujas de punto de fusión 129°-130° C.

El análisis elemental indica que el aminoácido y la 2,3-dimetilquinona se combinaron molécula a molécula.



La 2,5-dimetil- y la trimetil-benzoquinona dan combinaciones del mismo tipo.

Algunos autores¹¹ establecen que, entre otros compuestos, las quinonas, benzoquinonas, toluquinonas, etc., reaccionan con los aminoácidos produciendo anhídrido carbóni-

co, amoniaco y una molécula de aldehído con un átomo de carbono menos que el aminoácido original. Esto fue ensayado con benzo-, tolu-, y 2,3-dimetilquinona dejándolos reaccionar con el aminoácido de 12 a 24 horas a temperatura y pH fisiológicos. El amoniaco formado se determinó por el método de difusión en cámaras de Conway. Los resultados de la tabla II indican que la reacción no tiene significación con las metilquinonas.

La decarboxilación se siguió en el respirómetro de Warburg con resultado negativo.

Aminas.—Otras sustancias biológicas a función amina, se adicionan también a las metilquinonas dando productos coloreados.

REACCIONES CON SUSTANCIAS A GRUPO TIOL

Se ha demostrado que la 2,3-dimetil-, 2,5-dimetil- y trimetil-benzoquinona reaccionan rápidamente, al igual que las quinonas en general con compuestos a grupo sulfhidrilo¹ dando productos mono y bisustituídos.

TABLA II

DEAMINACION DE AMINOACIDOS POR 1,4-BENZOQUINONAS

Quinona	Concentración μM .	Aminoácido	Concentración μM .	NH_3 formado μM .
1,4-benzoquinona	30	Glicina.	30	3,2
Toluquinona	8	Alanina.	8	0,2
2,3-dimetil-benzoquinona	18	Glicina.	27	1,0
2,5-dimetil-benzoquinona	7	Cisteina.	6	0,0

Los resultados son promedio de 5 determinaciones.

Desde el punto de vista bioquímico, interesan las combinaciones con los aminoácidos, polipéptidos y proteínas conteniendo grupo tiol. En todos estos casos compiten por la quinona ambos grupos, amino y sulfhidrilo, de aminoácidos y proteínas. Es posible, sin embargo, obtener independientemente ambos compuestos. La combinación con el grupo amino se forma agregando el aminoácido sobre exceso de quinona, mientras que la combinación con el grupo tiol del aminoácido, libre de la combinación del grupo amino, se obtiene haciendo actuar una solución acuosa de la metilquinona sobre otra del aminoácido en exceso con respecto a la quinona. La cisteína y el glutatión dan, con las tres metilquinonas citadas, productos amarillos con máximo de absorción alrededor de 430 milimicras. Son difícilmente cristalizables. Teniendo en cuenta el alto E₀ del sistema quinona-hidroquinona para las tres metilquinonas estudiadas¹ no puede descartarse que, en ciertas condiciones, tenga lugar la oxidación de grupos sulfhidrilos a disulfuros.

Varios autores han informado acerca de la inhibición por diversas benzo y naftoquinonas, de enzimas a grupo activo sulfhidrilo

tales como: succino deshidrogenasa,⁷ colina acetilasa,⁸ carboxilasa de levadura,⁹ ureasa, papaína,¹⁰ hexoquinasa y fosfohexoquinasa.¹¹

Combinación con las proteínas del suero. Cuando se agrega una solución de quinona a una de proteína, según lo que hemos visto, se producen rápidamente combinaciones con los grupos amino y tiol libres. Estas reacciones con las proteínas constituyen el mecanismo de la acción tanante observada con las metilquinonas. Se ha considerado de interés la determinación del grado en que estos compuestos se combinan con las distintas fracciones de las proteínas del suero, a las cuales se les atribuyen, en general, la causa de la inactivación "in vivo" de los antibióticos quinónicos.

Las proteínas del suero humano se separaron por fraccionamiento con sulfato de amonio¹² y subsiguiente diálisis y liofilización. La fijación de las quinonas se estudió por el método de diálisis en equilibrio de Klotz¹³ y la determinación cuantitativa de las mismas por espectrofotometría a 255 milimicras. Los resultados se dan en la tabla III.

Con proteínas de suero de conejo los resultados no difieren significativamente.

TABLA III
MGRS. DE METILQUINONAS FIJADOS POR 100 MGRS.
DE PROTEÍNAS DEL SUERO HUMANO

Metilquinona	Mgms. de metilquinona fijados por 100 mgms. de proteína		
	α y β -globulinas	γ -globulinas	Albúminas
2,3-dimetil-	0,87	2,57	1,70
2,5-dimetil-	0,85	1,71	1,14
trimetil-	0,77	0,86	1,10

Fosfato buffer 0,01 M. pH 7,4; concentración de metilquinona 1×10^{-3} M.; concentración de las proteínas 70 mgms. %.

EXPERIMENTACION SOBRE PARASITOS

Se trató de discriminar acerca de la importancia relativa de las combinaciones con los grupos amino y sulfhidrilo en la actividad antibiótica y parasiticida de las metilquinonas.

Tenia *Himenolepis nana* de intestino de rata blanca fue tratada por 10 minutos con metilquinonas (1×10^{-2} M. en fosfato buffer pH 7.4) directamente y previa eliminación del grupo amino por nitrito de sodio (0.1 M.) o bloqueo del grupo tiol por ácido p-Cl-Hg-benzoico (0.005 M.). En el tratamiento directo las tenias se colorearon en rojo y en amarillo indicando combinación con ambas funciones, amina y tiol. En las tenias tratadas con nitrito sólo apareció la coloración amarilla de las quinonas con el grupo tiol mientras que, en las tratadas con ácido p-Cl-Hg-benzoico, únicamente los grupos amino dieron compuestos de característico color rojo púrpura.

Estas reacciones pueden ser base de una técnica histoquímica para revelar los grupos amino y tiol.

Del mismo modo, *Tenia marginata* y *Dipylidium* fueron eliminadas muertas por perros tratados por vía oral con 2,3-dimetilquinona. El parásito presentó una fijación selectiva de la metilquinona formando un dibujo rojo púrpura a lo largo del cuerpo que indica el bloqueo de grupos amino libres, esenciales para los intercambios del parásito con el medio.

EFEECTO CATALITICO EN LA OXIDORREDUCCION BIOLOGICA

Estos compuestos quinónicos producen efecto catalítico en la oxidación de glucosa-6-fosfato a través del ciclo del hexosa monofosfato por el eritrocito adulto de mamífero.¹⁴ Es decir, que hay marcado aumento de la velocidad de oxidación del TPNH por intervención catalítica de las metilquinonas en algún punto de la cadena de transporta-

dores redox. Por otra parte, la inhibición, que con altas concentraciones puede ser total, del consumo de oxígeno a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos indica que las metilquinonas interfieren con los sistemas enzimáticos o con los transportadores de la cadena respiratoria, ya sea por combinación química o por alteración del equilibrio de oxidación-reducción celular normal.

Sistemas DPN \leftrightarrow DPNH y TPN \leftrightarrow TPNH.—Se estudió el efecto directo de las metilquinonas sobre el di y trifosfopiridín-nucleótico reducidos según técnica de Lehninger.¹⁵ Se midieron las variaciones de las formas reducidas del DPN y TPN por cambios de la densidad óptica a 340 milimicras, a cada adición de la quinona. La tabla IV muestra la rápida oxidación del trifosfopiridín-nucleótido-reducido por 2,5-dimetilbenzoquinona como estaba previsto, dada la diferencia de potencial entre los sistemas

TABLA IV

EFEECTO DE LA 2,5-DIMETIL-1,4-BENZOQUINONA SOBRE TPN REDUCIDO

Total μ M. quinona adicionada	Total disminución de la densidad óptica a 340 m μ
0,21	0,018
0,42	0,038
0,64	0,056
0,85	0,078
1,07	0,148

Las medidas se hicieron en espectrofotómetro de Beckman en cubetas de 1 cm. de espesor.

Cubeta blanco: fosfato buffer 0,1 M. pH 7.4 + blanco de la reducción del TPN.

Cubeta control con TPN: fosfato buffer 0,1 M. pH 7.4 + 1,05 μ M. TPN.

Cubeta ensayo con TPNH: fosfato buffer 0,1 M. pH 7.4 + 1,05 μ M. TPNH.

La metilquinona fue agregada a las tres cubetas y en cada adición la reacción se estabilizó rápidamente.

quinona-hidroquinona y TPN-TPNH. Con DPNH y trimetilbenzoquinona los resultados fueron los mismos.

Flavinas.— Los flavina-mononucleótido y flavina-adenina-dinucleótido reducidos son rápidamente oxidados por los tres derivados metilquinónicos estudiados, como se prevee por las diferencias entre los E° de aquellos sistemas redox y los de las metilquinonas.

Se ha demostrado previamente¹⁴ que el aumento del consumo de oxígeno causado por las metilquinonas en el eritrocito adulto de mamífero no es influido por la adición de cianuro. Esto indica que la intervención catalítica de las metilquinonas se efectúa con prescindencia del sistema de citocromos y, presumiblemente, a la altura de una enzima-flavina.

Esta suposición ha sido confirmada por el resultado del experimento que registra la figura 1. La supresión del efecto de la 2,3-

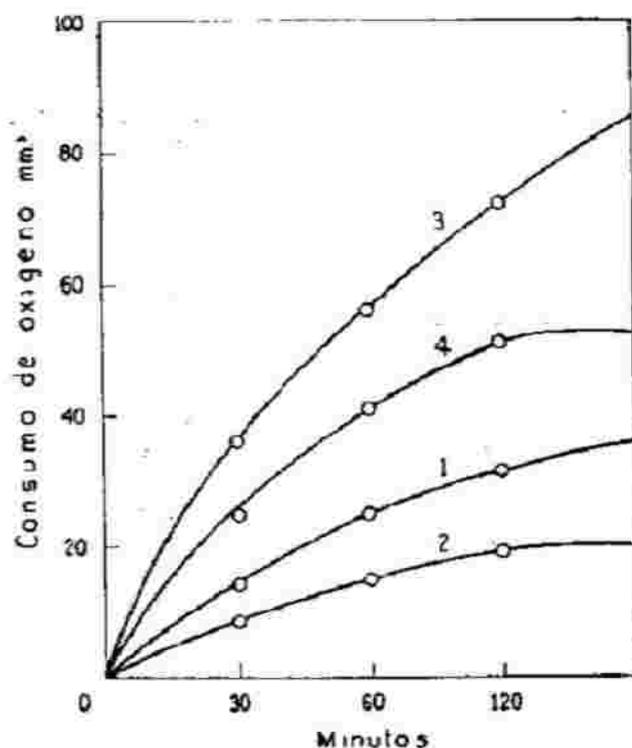


Fig. 1.— Efecto de la atabrina en el aumento del consumo de oxígeno por el eritrocito de conejo, causado por la 2,3-dimetilbenzoquinona. 1: Control. 2: Atabrina agregada, 3×10^{-3} M. 3: 2,3-dimetilbenzoquinona agregada, $1,5 \times 10^{-3}$ M. 4: Atabrina y 2,3-dimetilbenzoquinona agregadas en la misma concentración que en 2 y 3.

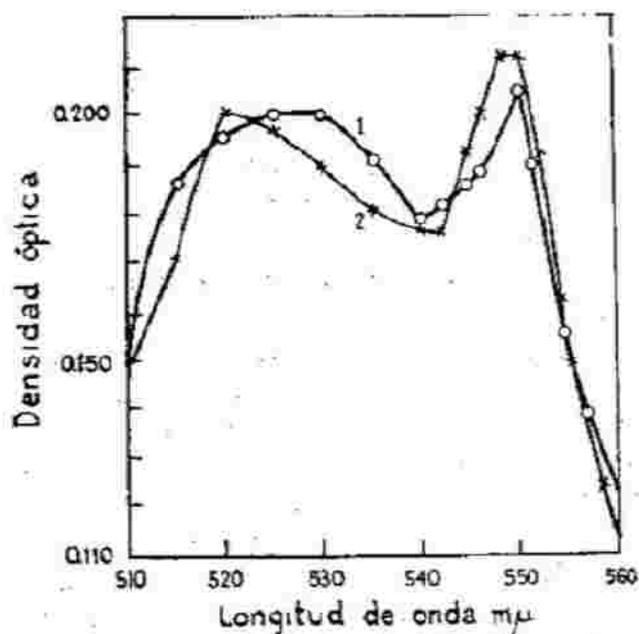


Fig. 2.— Cambio en la densidad óptica del citocromo c entre 510 y 560 milimicras por adición de 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona. 1: Citocromo c y Fe^{+++} , concentración $2,3 \times 10^{-5}$ M. 2: Citocromo c y Fe^{+++} y 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona, concentración $1,5 \times 10^{-4}$ M.

dimetilquinona por atabrina (clorhidrato de quinacrina), inhibidor de las flavinas, indica que éstas son los transportadores catalizados por las metilquinonas en el eritrocito de mamífero. A la concentración de 3×10^{-3} M., la atabrina inhibe el consumo de oxígeno casi totalmente entre los 90 y 120 minutos, de acuerdo a una lenta penetración del inhibidor en la célula.

La intervención de las di y trimetilquinonas en la cadena de transportadores redox biológicos, acelerando algunos procesos e inhibiendo otros, indica que no tiene función de coenzima Q^{10} compuesto relacionado a aquellas que se encuentra normalmente en la mitocondria.

Citocromo c.— El citocromo c se combina con las metilquinonas por los grupos amino de su proteína con visible cambio de color. Los compuestos tienen máxima absorción alrededor de 550 milimicras que interfiere cuando se mide la desaparición del citocromo c reducido a esta longitud de onda, por adición de compuestos quinónicos (fig. 2).

TABLA V

OXIDORREDUCCION DEL SISTEMA Cit. c Fe⁺⁺⁺-Cit. c Fe⁺⁺
 POR EL SISTEMA 2,5-DIMETIL-QUINONA-2,5-DIMETIL-HIDROQUINONA

Hidroquinona μ M. agregadas	Cit. c Fe ⁺⁺⁺ Cambio D. ópt. 550 m μ	Quinona μ M. agregadas	Cit. c Fe ⁺⁺ Cambio D. ópt. 550 m μ
—	0,110	—	0,277
0,2	0,168	0,2	0,268
0,4	0,235	0,4	0,257
0,6	0,235	0,6	0,250
0,8	0,234	0,8	0,240
1,0	0,234	1,0	0,235

Los ensayos se realizaron en fosfato buffer 0,1 M. pH 7,4.

Cubeta 1: blanco; Cubeta 2: Cit. c 0,05 μ M.; Cubeta 3: blanco de reducción del Cit. c; Cubeta 4: Cit. c reducido 0,05 μ M.

Además el citocromo c reducido es oxidado por las metilquinonas como corresponde a la diferencia de potencial entre ambos sistemas.

La tabla V muestra el equilibrio redox del citocromo c partiendo de sus formas oxidada y reducida, en presencia del sistema 2,5-dimetilbenzoquinona-2,5-dimetilbenzohidroquinona.

CONCLUSIONES

Las 2,3-dimetil-, 2,5-dimetil- y trimetil-1,4-benzoquinona interfieren en los sistemas biológicos produciendo efectos diversos por tres reacciones principales:

1) Combinación con el grupo amino de aminoácidos, polipéptidos, proteínas y aminas dando productos de color que va del rojo al violeta.

2) Reacción con la función tiol de aminoácidos, polipéptidos y proteínas dando derivados amarillos.

3) Alteración del equilibrio redox normal de los sistemas transportadores de hidrógeno y de electrones.

La actividad antibiótica, parasiticida y tóxica general de las di y trimetilbenzoquinonas es debida a la acción combinada de estas reacciones.

SUMMARY

The 2,3-dimethyl-, 2,5-dimethyl- and trimethyl-1,4-benzoquinone interfere in biological systems by producing various effects through three main reactions:

1) Combination with the amino group of amino acids, polypeptides, proteins and amines giving products the colour of which ranges from red to violet.

2) Combination with the thiol group of amino acids, polypeptides and proteins originating yellow derivatives.

3) The upsetting of the normal redox equilibrium of the hydrogen and electron transfer systems of the cell.

The antibiotic, parasiticidal and toxic activity of the di and trimethylbenzoquinones is due to the combined effects of this reactions.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Q. I. Simón Diettrich del Instituto de Investigación Libre y de Asesoramiento, Facultad de Química y Farmacia, Montevideo, la realización de los análisis elementales de los derivados quinónicos de aminoácidos y al Dr. John R. Totter de la Facultad de Medicina, Montevideo, su generosa cooperación.

BIBLIOGRAFIA

1. FIESSER, L. F. and ARDAO, M. I.—Investigation of the chemical nature of gonyleptidine. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 774, 1956.
2. ESTABLE, C. and col.—Gonyleptidine. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 4042, 1955.
3. PRADINES BRAZIL, N. y LABORDE, H. F.—La acción ténica de la gonileptidina. **II Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo**, **1**: 633, 1957.
4. FREYRE, H. A.; ROVIRA, M. y ARDAO, M. I.—Toxicidad de metil-1,4-benzoquinonas y metil-1,4-benzohidroquinonas. *Arch. Soc. Biol.* (En prensa.)
5. FISCHER, E. y SCHRADER, H.—*Ber.*, **43**: 525, 1910.
6. SCHONBERG, A. and col.—Action of coal-tar dyes and related compounds on relative aminoacids. *J. Chem. Soc. London*, **1**: 176, 1948.
7. POTTER, V. B. and DUBOIS, K. P.—Studies on the mechanism of hydrogen transport in animal tissues. *J. Gen. Physiol.*, **26**: 301, 1943.
8. NACHMANSON, D. and BERMAN, M.—Studies on choline acetylase. *J. Biol. Chem.*, **165**: 551; 1946.
9. KUHN, R. and col.—Inhibitors of carboxylase. *Chem. Ber.*, **80**: 101, 1947.
10. HOFFMAN OSTENHOF, O. and col.—Bacteriostatic quinones and other antibiotics. *Monatsh.*, **78**: 53, 1948.
11. MEYERHOFF, O. and RANDALL, L. O.—The inhibitory effects of adrenochrome on cell metabolism. *Arch. Biochem.*, **17**: 171, 1948.
12. COHN, E. J. and col.—Serum proteins: separation and properties. *J. Am. Chem. Soc.*, **62**: 3386, 1940.
13. KLOTZ, I. M.—Some metals complexes with proteins and others large molecules. *Modern trends in physiology and biochemistry*. Ed. E. S. Guzmán Barrón, Academic Press Inc., 1952, p. 427.
14. ARDAO, M. I. and FREYRE, H. A.—Effect of gonyleptidine on the metabolism of mammalian erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**: 334, 1956.
15. LEHNINGER, A. L.—Preparation of reduced DPN. *Methods in enzymology*. Ed. S. Colowick and N. Kaplan, Academic Press Inc., **3**: 885, 1957.
16. CRANE, F. L. and col.—Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**: 220, 1957.