

300627 3
24



Universidad La Salle

**Escuela de Química
Incorporada a la U.N.A.M.**

"EFECTO DE LAS N-ISOBUTILCINAMAMIDAS EN LOS
PROCESOS DE GERMINACION, RESPIRACION
Y FOTOSINTESIS"

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a:

LESLIE ARTEAGA SANCHEZ

D. en C. José Domingo Méndez Francisco

México, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES

CON EL AMOR QUE ME HAN SABIDO DAR,
ESFUERZO Y GRAN EJEMPLO PARA SALIR
ADELANTE ANTE LAS ADVERSIDADES
POR DARME LA LIBERTAD DE SER LO QUE SOY

A USTED DOCTOR

POR SU CONTINUA ENSEÑANZA Y SU GRAN BONDAD
EN DEMOSTRAR QUE NO HAY LÍMITES PARA TODO
AQUEL QUE TENGA FE EN DIOS Y EN SI MISMO.

A MIS HERMANAS

POR BRINDARME APOYO, CARIÑO Y
LUCHAR A MI LADO SIEMPRE.

A TI ESPOSO MIO

POR TU GRAN AMOR Y COMPRENSIÓN
QUE ME IMPULSAN A SER MEJOR CADA DÍA.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al M. en C. Lino Reyes del departamento de Química Orgánica de la división de estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM por la dirección en la síntesis de los compuestos que se ensayaron bioquímicamente en esta tesis.

INDICE

PARTE I

BASE TEORICA

Objetivos	1
Antecedentes	2
Acción Farmacológica del <i>Xanthoxylum</i> .	4
Introducción a herbicidas	10
Modo y acción de los herbicidas	13
Herbicidas selectivos	14
Herbicidas no selectivos	14
Característica de los herbicidas	16
Inhibidores de la fotosíntesis.	
Fotosíntesis	22
Fase luminosa	23
Mecanismo de Interacción herbicida fotosistema II	26
Reacciones oscuras	28
Introducción a mitocondrias vegetales	31

PARTE II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Actividad herbicida in vivo en el proceso	
de germinación de semillas	32
Germinación	34
Respiración	37
Extracción y purificación de mitocondrias vegetales	39
Determinación de proteína por el método de Biuret	40
Resultados de fotosíntesis in vivo	41
Resultados de germinación de semillas	46
Resultados de respiración de semillas	52
Resultados de la cuantificación de mitocondrias	59
Conclusión	61
Glosario	
Bibliografía	

PARTE I

BASE TEORICA

OBJETIVO GENERAL

Serán los estudios que se efectuarán en esta tesis para determinar el efecto de los compuestos de la familia de las N-Isobutilcinamamidas, en la germinación, respiración y fotosíntesis que forma parte de un estudio para caracterizar nuevos compuestos con actividad herbicida.

OBJETIVOS PARTICULARES

Fotosíntesis

- Objetivo: Determinar la concentración del nuevo herbicida a la que inhibe el 50% o la destrucción de la hoja aplicada por aspersión
- Conocer la potencia de los nuevos y diferentes herbicidas a trabajar.

Germinación

- Objetivo: Conocer la actividad de la familia de las n-isobutilcinamamidas en el proceso de germinación en semillas seleccionadas de malezas y plantas agrícolas
- Determinar una posible concentración que inhiba la germinación en las semillas seleccionadas.

Respiración

Objetivo: Determinar la respiración por polarografía utilizando un electrodo de tipo Clark. Para demostrar en forma directa la inhibición de la respiración de las semillas seleccionadas de malezas y plantas agrícolas se medirá la actividad respiratoria en presencia y ausencia de las N-isobutilcinamamidas en concentraciones crecientes de estos compuestos.

ANTECEDENTES

México cuenta con una amplia variedad de recursos naturales entre los cuales destacan los vegetales. Es evidente que la principal razón de la riqueza vegetal, reside en su amplia variedad de condiciones fisiográficas y climáticas.

Entre la flora mexicana existe una gran variedad de especies las cuales desde tiempos prehispánicos los indígenas las utilizaban ya sea como alimento o como un medio curativo. El siguiente trabajo es realizado en base a los extractos de la planta denominada Colopahtle de el genero *Xanthoxylum* debido a sus interesantes actividades biológicas que presentan, y de las que nos evocaremos para demostrar su actividad herbicida.

Estudios recientes realizados en el laboratorio de productos naturales incluyen el estudio fitoquímico de *Xanthoxylum lebmannianum* (Engl.) P. Wilson, conocido como "Colopahtle". Esta planta es utilizada como amebicida y antihelmíntico en el valle de Tehuacán, Puebla, México. De la corteza de esta especie se aislaron β -sitosterol d-(+)-Sesamida, 1β -6-dihidroxiudesm-4(15)eno y Sanshool; y de el extracto hexánico de las hojas se separaron d-(+)Asarinina, Lupenona y d-(+)Sesamina. Para la separación y purificación de los compuestos se utilizaron métodos cromatográficos. La identificación se hizo por medio de sus constantes físicas y espectroscópicas, rmn, (Mejía, F.A., 1994).

La composición química de está planta presenta analogía con el genero al que pertenece sin embargo la presencia de 1β ,6-dihidroxiudesm-4(15)eno y lupenona, constituyen una diferencia importante, ya que estos metabolitos no han sido aislados anteriormente en el genero *Xanthoxylum*.

Del genero *Xanthoxylum* se han aislado esteroles, triterpenos, lignanos, N-

isobutilaminas, trioles monoterpénicos, monoterenos, sesquiterpenos, cumarinas y alcaloides. (Mejía, F.A., 1994)

De la corteza del *Zanthoxylum liebmaniaum* (Colopahtle) se obtuvieron como un metabolito secundario la isobutilanida α -Sanshool, la cual se le atribuye el efecto adormecedor en la lengua cuando la corteza es masticada, por otro lado en el bioensayo preliminar presentó un efecto larvicida (Ramírez, Z. y M.), sin embargo no presentó actividad insecticida contra *Prosthephanus truncatus* y *Sitophilus zeamays* que son plagas en los almacenes de granos (silos). (Ramírez, Z. y M.),

Los metabolitos bioactivos aislados de este género de planta son las N-isobutilcinamidas del tipo alifático y/o aromático, algunas de éstas han sido estudiadas desde el punto de vista farmacológico y toxicológico .

Se encontró que las amidas α -Sanshool y Spllanthol, poseen una baja toxicidad para los animales de sangre caliente, característica apreciada para el desarrollo de Insecticidas biodegradables.

ACCION FARMACOLOGICA DE ALGUNOS COMPUESTOS AISLADOS DE PLANTAS DEL GENERO *XANTHOXYLUM*

Actividad Anti-inflamatoria del piperonil-4-acril isobutil amida un extracto del *Xanthoxyloides xanthoxylum*.

El extracto de la raíz de la planta de *Fagara* es usada ampliamente en tratamientos locales, fiebres de varias etiologías y en crisis de células falsiformes. (Mabayoje A. O.1982)

El análisis químico ha demostrado que la planta es un reservorio abundante de muchas alcaloides, flavonoides, terpenoides y sustancias fenólicas relacionadas; recientemente se han hecho reportes de la actividad anti-inflamatoria y antiprostaglandinica de estas plantas.

En esta breve revisión se encontró que la actividad anti-inflamatoria del piperonil-4-acril isobutil amida es similar a la actividad presentada por la indometacina.

En este estudio lo que se hizo es introducir una substancia conocida la cual produjo una reacción inflamatoria importante, observándose resultados con efecto inflamatorio similar al de las prostaglandinas. A la dosis que se ensayó, se observó que la indometacina indujo una reacción importante del edema y que necesito menos dosis que la *Fagara*.

Así mismo se comparó en un determinado tiempo que la indometacina empieza a reducir el edema en un menor tiempo, para empezar a actuar y reducir el edema se mantuvo después en un 20% durante aproximadamente de 2 a 6 horas, esto sugiere que la indometacina sigue actuando más rápidamente que la fagaramida. Por lo que la *Fagara* tiene una modesta actividad anti-Inflamatoria sobre los casos de edemas inducidos en ratas, en estos casos la preparación de fagaramida fue 20 veces menor que con respecto a la indometacina.

La actividad anti-inflamatoria es característica por la liberación secuencial de mediadores a las 3 horas como son histamina, hidroxitriptimida, radisinina y prostaglandinas. Las prostaglandinas liberadas pueden detectarse rápidamente en el edema inducido, aproximadamente una hora después de la inducción del edema, estas aparecen en exudados de la parte infectada. En los resultados sugieren que la actividad anti-inflamatoria de la fagaramida se llevó por la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas.

Efecto del extracto del raíz de *Fagara xanthoxylum* sobre la coagulación sanguínea.

Las raíces de la *Fagara xanthoxyloides* de la familia de las rutaceas son utilizadas en Nigeria como goma de masticar que ha sido un sustituto del cepillo dental tradicional, una vez que ha sido lavada y secada la raíz es masticada posteriormente y utilizada como cepillo dental, este extracto se ha estudiado anteriormente ya que se han encontrado algunas sustancias como cumarina, furanoquinolonas, etc.

Recientemente la atención se ha concentrado sobre los constituyentes de la raíz, particularmente las propiedades antiplaquetarias .

Del extracto acuoso de la raíz dicen que mantienen intactas las células rojas en cultivos dentro de una zona de inhibición, esta observación sugiere que el extracto entre otras acciones puede tener un posible efecto de estabilización sobre las células rojas y sugieren que podrían tener un efecto similar sobre proteínas del sistema. El extracto sobre la coagulación sanguínea sistémica fué por ellos analizada.

El tiempo de protombina de un plasma normal fue progresivamente acortado en incubación agregando el concentrado de *Fagara xanthoxyloides* un extracto de su raíz, esto llegó a ser más marcado a los 5 minutos de su incubación, un efecto similar fué observado con el plasma anormal a la adición del extracto de la raíz diluido, ya que acuoso o reconstituido no acortó el tiempo de trombina y fue ligeramente prolongado.

Discusión: Un número de actividades han sido atribuidas al extracto de la *Fagara xanthoxyloides* esto incluye inhibición de tumores y actividad anticélulas falsiformes. Este reporte muestra por primera vez que un concentrado de extracto acuoso inhibe la coagulación o la formación del coagulo in vitro. Como se hizo referencia el extracto acuoso concentrado significativamente acortó el tiempo de trombina y tromboplastina de un plasma normal, así como un plasma con deficiencia de

factor 8, pero no acortó el tiempo parcial de un plasma con deficiencia de factor 9. Este extracto liofilizado contiene *xanthoxyloides*, espidina ambos alcaloides y una pequeña cantidad de Fagaramida. El *xanthoxyloides* fué extraído con cloroformo y metanol. Del jugo de la planta se han observado propiedades antiagregantes las cuales fueron atribuidas a la fracción soluble del extracto de la raíz como el *Xanthoxylum* o sus formas modificadas.

La promoción de la actividad de coagulación quedó manifiesta por altas concentraciones del extracto acuoso crudo que podría no ser demostrado en cada fracción derivada en otras pruebas realizadas en contraste el *Xanthoxylol* y la espidina demoraron la formación del coagulo en plasmas normales .

**Distribución de aminoácidos alifáticos insaturados
de especies *Xanthoxylum* japonesas.**

Siete especies y dos variedades fueron investigadas y separados los aminoácidos alifáticos insaturados. Además de los aminoácidos conocidos en el extracto del *Xanthoxylum* como el α -Sanshool e hidro- β -Sanshool fueron aislado y establecidos con bases a evidencias espectroscópicas y químicas (Reyes, Et. Al. 1991).

Los componentes encontrados corresponden a derivados de hidroxilaminas, los cuales se encontraron en el pericarpio de la corteza del material recolectado.

Las especies japonesas del *Xanthoxylum* fueron divididas quimotaxonomícamente en dos taxas, estas taxas difieren de las dos asignadas sobre las bases de clasificación botánica.

El género *Xanthoxylum* dentro de las rutáceas puede ser dividido en dos taxas. Dos clasificaciones de este género son descritas de acuerdo a las diferentes estructuras periféricas.

Algunas autoridades separan el género en dos, el *Xanthoxylum* y la *Fagara*, otros prefieren a la *Fagara* como un subgénero del *Xanthoxylum*.

Ishii (Ichiro Yasuda 1982) ha investigado los alcaloides y cumarinas en especies *Xanthoxylum* japonesas, en esta revisión se ha investigado las estructuras de los aminoácidos alifáticos insaturados en plantas usuales y recientemente se reportó el aislamiento y la estructura de dos nuevos aminoácidos en el pericarpio del *Xanthoxylum xanthoxyloides*.

La corteza fresca y el pericarpio fueron utilizadas como materiales de investigación ya que los aminoácidos alifáticos insaturados en la corteza y el pericarpio del *Xanthoxylum piperitum* ha sido reportado de diferir en sus componentes

El uso de plantas con fines medicinales ha prevalecido durante miles de años y la medicina herbolaria tanto antigua como moderna ha sido la fuente de terapias muy útiles.

Nuestro país cuenta con una gran diversidad de plantas como la del género Colopahtle que en Náhuatl significa hierba de la lengua, se utiliza en el valle de Tehuacán Puebla como amebicida y antihelmíntico basado en el conocimiento empírico de sus habitantes.

(Reyes, Et. al., 1991)

En la República Mexicana se encuentra en los estados de Michoacán, Puebla, Oaxaca, Chiapas, Zacatecas, Sinaloa, Baja California, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Jalisco y Nayarit. (Reyes, Et. al., 1991)

Presenta una actividad insecticida alta a la mosca doméstica y se han realizado bioensayos como larvicida, observando un 100% de mortalidad en solución al 10% de acetona. (Reyes, Et. al., 1991)

Se ha probado actividad herbicida de las N-alquilamidas aisladas y caracterizadas en raíces y tallos de diferentes variedades de vegetales, por lo que se han preparado sintéticamente diversos derivados de las N-isobutylcinamidas. (Mejía, Et. al., 1994). Con el objeto de entender que parte de la estructura es importante para su actividad.

INTRODUCCIÓN A HERBICIDAS

Durante su ciclo vegetativo, los cultivos sufren considerables pérdidas en rendimiento y calidad de sus productos debido principalmente a plagas vegetales. Las plagas vegetales pueden causar considerables pérdidas en la producción, debido a su competencia en el cultivo con respecto a la luz, espacio, agua y nutrientes disponibles. Las malezas son en realidad parásitos indirectos. También se conocen como plantas adventicias o perjudiciales. Las malezas son todas las plantas que no pertenecen al cultivo. Las malezas tienen las siguientes desventajas respecto del crecimiento y desarrollo respecto a los cultivos. (Ashton, F.J. 1973)

- Compiten con el cultivo en luz
- Compiten con el cultivo en espacio
- Compiten con el cultivo en agua
- Compiten con el cultivo en nutrientes
- Dificultan la labranza de la tierra
- Dificultan la cosecha y el secado de los productos
- Dificultan la limpieza y clasificación de la semilla
- Transmiten una gran variedad de enfermedades.

Propagación de las malezas

Las malezas se producen por semillas, por bulbos o bulbillos o por brote de los tallos subterráneos o rizomas. El método de control depende muchas veces de la forma de reproducción, por ejemplo si se trata de una infestación de tallos subterráneos, el control se efectúa más bien con una labranza adecuada y la aplicación de productos químicos antes de la siembra. Las malezas que se reproducen por semilla se combaten principalmente por medio de maquinaria con manejos de cultivos o por la aplicación foliar de productos químicos o herbicidas. La mayoría de las plantas perjudiciales en un cultivo se reproducen mediante semillas. Cada planta puede producir una cantidad considerable de semillas. Además

numerosas plantas dañinas producen semillas cuya germinación puede escalonarse durante varios años, estas causan la aparición repentina y generalizada de hierbas indeseables aún en campos aparentemente limpios, así el suelo puede acumular miles de semillas de malezas indeseables por metro cuadrado. (Ashton, F.J. 1973).

Características de un herbicida. Los herbicidas pueden ser clasificados según la afinidad de sus grupos químicos los cuales con sus estructuras se puede predecir la actividad del grupo funcional, sin embargo la menor diferencia en las estructuras químicas puede causar una notable diferencia en la selectividad.

Selectividad. La selectividad en los herbicidas se define como la eficiencia para matar a las plantas indeseables sin afectar a los cultivos. Esto puede ocasionar en algunos casos el retardamiento de los cultivos porque puede ser afectado el metabolismo en la acción bioquímica de la planta causada por el herbicida.

Naturaleza de acción.- Los herbicidas de contacto afectan solamente las partes de la planta en la cual fue aplicada. Los materiales de contacto que poseen son relativamente fitotóxicos, en el sistema de la membrana y el tejido de las hojas inhibiendo la fotosíntesis y el metabolismo respiratorio.

Región de aplicación.- Los herbicidas pueden ser clasificados según su aplicación, ya sea foliar o en la tierra. Los de aplicación en terrenos son compuestos normalmente absorbidos por las raíces y transportados hasta las hojas. Los compuestos de aplicación foliar penetran por dentro de la dermis de las hojas y son absorbidos en los tejidos y tallos .

Tiempo de aplicación .- El tiempo de aplicación es normalmente descrito según el campo de cosecha. El desarrollo en el sembrado merece un tratamiento de pre-emergencia y post-emergencia. Los herbicidas de pre-emergencia son usados en el

control de malas hierbas y la competencia con la cosecha, la selectividad depende principalmente en las raíces de las malezas indeseables y las plantas agrícolas.

Los compuestos de post-emergencia son aplicados en el control de malezas cuando existe una competencia de nutrientes con la planta agrícola.

Formación del herbicida.- La parte activa de un herbicida se conoce como ingrediente activo. La formulación es generalmente líquidos concentrados o partículas sólidas, estas formas generalmente se diluyen con agua, y las partículas sólidas insolubles están hechas para emulsificarlas con agua. Las concentraciones emulsificantes contienen ingredientes activos en disolventes orgánicos. Muchas formulaciones de herbicidas contienen coadyuvantes los cuales tienen una penetración y retención en la epidermis de la hoja.

Modo de acción de los herbicidas aplicados en tierra. Estos normalmente son poco solubles en agua, idealmente mantienen una banda discreta en la superficie de la tierra.

Una cantidad importante de herbicida absorbido es determinado por el número de factores incluyendo la degradación (fitoquímica, química o microbiana) o pérdida física. Estos son normalmente absorbidos y emergidos hasta los tallos de las malas hierbas siendo transportados por el xilema hacia las hojas y el meristemo apical.

Muchos compuestos como la S-urea y S-triazina actúan con reacción a la luz en la fotosíntesis. Una adición selectiva puede dar diferencias en los sitios de acción, por ejemplo la tolerancia en los herbicidas de triazina tienen atribuciones en el metabolismo rápido de descodificación y pueden modificar la actividad uniéndose a los cloroplastos .

Herbicidas de aplicación foliar.-Las plantas agrícolas y malas hierbas emergen en un mismo tiempo por lo que la selectividad del herbicida depende del rociado, la

absorción y penetración en el tejido de las hojas y tallos. La epidermis puede actuar como una barrera entre el herbicida y la membrana impidiendo el paso hasta las clorofilas las cuales están localizadas en las laminas que parecen existir en forma de un complejo formado con los lípidos y las proteínas de modo que el extremo porfirico se asocia a la proteína y la cadena lipídica a las capas lipídicas, por lo cual es de gran importancia la polaridad del herbicida.

MODO Y ACCIÓN DE LOS HERBICIDAS

Compuestos inorgánicos.- Las sales inorgánicas tienen un total uso de herbicidas selectivos algunos como el sulfato de cobre CuSO_4 , introducido en Francia en 1896 por Bonnet fue usado para el control de malezas en plantas de cereales, posteriormente el ácido sulfúrico H_2SO_4 fue usado como herbicida de contacto, estos fueron superados por compuestos inorgánicos más efectivos como el clorato de sodio, NaClO_3 , que fue usado para matar la raíz en las semillas perenes también en algunas aplicaciones posteriores inhiben el crecimiento: Otros compuestos como el disodio tetraborato decahidratado $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ o compuestos derivados del borax, como la sal del ácido bórico o el disodio tartrato borato pentahidratado, Inhiben también el crecimiento de la raíz.

Ácidos haloalcanoicos.- Son efectivos contra las semillas de pastos y en las hojas producen clorosis y posteriormente necrosis después de algunos días. En 1947 el TCA (tricloroacetato de sodio) fue usado a lo largo de los cultivos para el control de pastos.

Estos compuestos son herbicidas selectivos de contacto y también pueden controlar los rizomas funcionando como inhibidores del crecimiento.

Los compuestos ácidos haloalcanoicos son conocidos por afectar gran parte del proceso fisiológico incluyendo el metabolismo de carbohidratos, lípidos y del nitrógeno.

Sitio de ataque.- Se distinguen herbicidas de contacto, y herbicidas sistémicos o fitohormonas. Como indica el nombre, los herbicidas de contacto eliminan las

plantas por contacto. La aplicación es foliar por medio de la pulverización del producto en solución con agua u otro vehículo. Al cubrir las hojas actúa como veneno de las células, matando las hojas y por consiguiente toda la planta, su acción no dura más que unos días, es decir no tiene efecto residual, el producto no circula por el interior de la planta

Los herbicidas de fitohormonas o sistémicos penetran en los tejidos vegetales de las plantas, provocando trastornos que conducen a su muerte. Su acción es entonces diferente a los herbicidas de contacto. Estos herbicidas son de efecto residual, su acción dura un mes o más después de la aplicación.

HERBICIDAS SELECTIVOS

Los herbicidas selectivos pueden ser sistémicos y de contacto. Tienen la propiedad de ser activos sólo contra determinadas plantas. Esto permite utilizarlos en cultivos para destruir las plantas perjudiciales sin dañar el cultivo mismo.

Por ejemplo, los cereales, de un modo general todas las gramíneas y monocotiledóneas son bastante insensibles a los herbicidas de contacto, así como también a los herbicidas de fitohormonas. Por otro lado muchas de las dicotiledóneas, incluyendo gran número de malezas, son sensibles a estos herbicidas. Esta diferencia en la resistencia al herbicida permite su acción selectiva, destruyendo las malezas sin dañar el cultivo .

HERBICIDAS NO SELECTIVOS

Los herbicidas no selectivos presentan a un grupo de productos químicos que pueden eliminar todas las plantas, En otras palabras casi todas las malezas e incluso la mayoría de los cultivos son sensibles al tratamiento con estos productos.

Por consiguiente, estos productos no se utilizan durante el crecimiento de los cultivos. Se les emplea por ejemplo en la fase de reposo vegetativo para limpiar viñas, para la desecación de plantas de papa que facilitan su cosecha mecánica, en

frutales o para la aplicación de pre-emergencia.

En el caso de un cultivo altamente sensible al herbicida, en un campo donde predominan malezas bastante resistentes, se emplean herbicidas no selectivos de acción amplia antes de la siembra. En este caso se aplica el producto con bastante anticipación para que su efecto residual no dañe al cultivo.

Influencia del medio ambiente en el metabolismo. El comportamiento físico de los herbicidas puede ser entendido, comprendiendo las condiciones del medio ambiente particularmente el agua tiene una profunda influencia en el funcionamiento de los herbicidas y algunos efectos de la descodificación. Los efectos del medio ambiente tienen un mérito considerable en la naturaleza del metabolismo. (Ashton, F.M. 1973).

Cerca del 50% de los herbicidas comerciales afectan la fotosíntesis, la mayoría de estos actúa a nivel de cadena transportadora de electrones entre Q y PQ, otros como las 1,2,3-tiadiazolil-fenilureas son inhibidores de la fosforilación o síntesis de ATP, otros como las alquilaminas son desacoplantes, se sabe que algunos inhiben la biosíntesis de clorofila, pero hasta ahora no se ha encontrado un herbicida inhibidor de la ruta de asimilación del CO₂.

Se han detectado diferentes sitios de ataque de inhibidores sobre los componentes de la cadena transportadora de electrones.

Los sitios de inhibición son localizados mediante una gran variedad de técnicas bioquímicas y biofísicas, suelen emplearse sistemas artificiales de donadores y aceptores de electrones (un donador proporciona electrones a la cadena en determinado paso y un aceptor los acepta en otro). Esto significa ir probando en partes las reacciones de la cadena y determinar en que sitio este afectando por una sustancia externa.

En 1977 Tischer introdujo una técnica en la cual un inhibidor marcado radioactivamente es reemplazado de la membrana por el mismo inhibidor no

radioactivo, cuando el sitio de inhibición es idéntico, lo que sugiere que la unión entre el inhibidor y el receptor en el sitio de acción no es muy fuerte.

Muchos herbicidas y todos los que actúan en el sitio 4 interaccionan con una proteína, que afecta la función de un transportador de electrones; esta proteína tiene una área de unión con sitios específicos para diferentes herbicidas, lo que denota la estereoespecificidad de la reacción. Esto se ha demostrado con mutantes en las que la efectividad inhibitoria de un herbicida se pierde pero no la del otro, aunque ambos actúen al mismo nivel de la cadena redox.

CARACTERISTICAS DE LOS HERBICIDAS QUE INHIBEN LA FOTOSINTESIS

Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis son conocidos como inhibidores de la reacción de Hill, es decir inhiben el transporte de electrones y de acuerdo con la conducta que presentan en las diferentes mediciones de la reacción de Hill puede ser, de acuerdo con Moreland:

a) Inhibidores de transporte de electrones (i.t.e.); b) Desacoplante (D); c) Inhibidores de la transferencia de energía (I.T.E.); d) Inhibidores desacoplantes (I.D.) y e) Aceptores de electrones (A.e).

Inhibidores del transporte electrónico

Inactivan o desplazan a uno o más de los transportadores de electrones, se considera que su sitio de acción (fig. 1, sitio 3 y 4) está localizado cerca del fotosistema II (5) y por eso inhiben la reacción, acopladas al mismo, tales como el transporte de electrones basal (t.e.b.), acoplado (t.e.a.), desacoplado (t.e.d.), teniendo como donador de electrones al agua y como aceptor al ferricianuro de potasio, al NADP* ó al viológeno (MV); también inhiben la bomba de protones (B,H*) y la fosforilación acoplada, así como desacoplada .

No inhiben ciertas reacciones parciales, como la fosforilación cíclica o fotoreducción de NADP* con un donador de electrones que actúe en el fotosistema I (ascorbato +

DPIP) estos herbicidas no inhiben la fosforilación oxidativa realizada por la mitocondria, los herbicidas de este tipo son fenilureas cloradas, bicarbamatos, s-triazinas cloradas, uracilos sustituidos, piridazinonas, difeniléteres, 1,2,4-triazinona ureas carbamatos, etc.

Desacoplantes

Son compuestos que separan el transporte de electrones de la fosforilación del ADP y el ATP por lo tanto los desacoplan. Disipan el gradiente electroquímico y por eso evitan tanto la fosforilación cíclica como la no-cíclica estimulando el transporte de electrones. Los desacoplantes revierten la inhibición del transporte de electrones producida por los inhibidores de la transferencia de energía (fig. 1, sitio 5) la perfuidona es un herbicida que actúa como un desacoplante puro a pH 8. Los desacoplantes son compuestos que tienen propiedades ácido-base.

Los compuestos que desacoplan la fotofosforilación también desacoplan la fosforilación oxidativa realizada en mitocondria.

Inhibidores de la transferencia de energía

Actúan directamente sobre el complejo enzimático de la fosforilación. Inhiben el transporte de electrones y la fosforilación en sistemas acoplados; sin embargo, en la presencia de un reactivo desacoplante que disipa el gradiente electroquímico y libera el flujo de electrones, se evita la fosforilación. Se han descrito como herbicidas de este tipo a las 1,2,3-tiadiazolil-fenilureas. En la figura se muestra el sitio que afecta (fig.1 sitio 6) sobre la formación cíclica y no cíclica de ATP.

Inhibidores-desacoplantes

Son compuestos no específicos que presentan ambas propiedades la de inhibir el transporte de electrones y la de desacoplar; a concentraciones altas se comportan como inhibidores y a concentraciones bajas como desacoplantes.

Sus sitios de acción se muestran en la fig. 1, sitio 4 y 5. Herbicidas como éstos,

actuando como inhibidores del transporte de electrones inhiben el transporte de electrones basal (t.e.b.), acoplado (t.e.a.) y desacoplado (t.e.d.) con ferricianuro o MV como aceptor y agua como donador de electrones; también evitan la bomba de protones y la fosforilación acoplada.

No inhiben la fotoreducción del NADP* cuando se usa ascorbato y DCPIP como sistema donador artificial es decir, cuando se mide sólo PS II. Cuando actúan como desacoplantes presentan sus propiedades, así evitan la fosforilación y estimulan el transporte de electrones, ejemplo de este tipo de herbicidas son los dinitrofenoles, N-fenil carbamatos, acil-anilidas, benzonitrilos halogenados, imidazoles sustituidos, bromofenoximas, 2,4-dinitroanilinas sustituidas, piridinoles y 1,2,4-tiadiazoles sustituidos .

Figura N.1

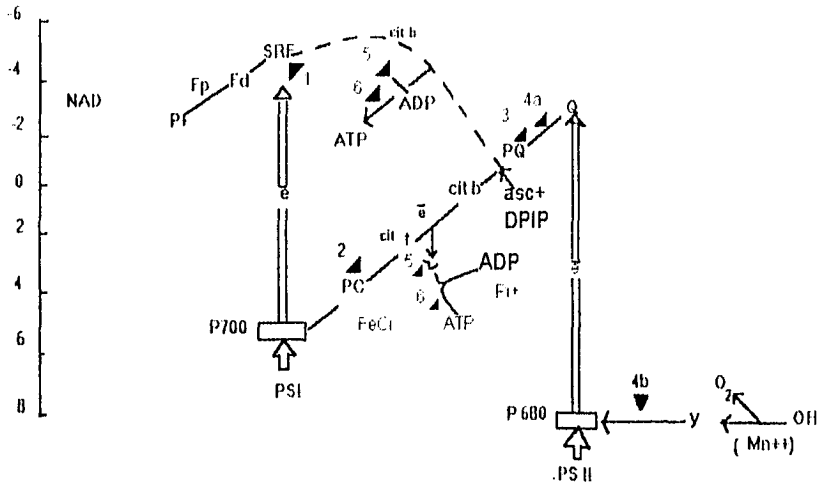


Fig. 1 El esquema anterior muestra el transporte de electrones fotoinducción y las reacciones de fosforilación acopladas (5). Las líneas blancas indican reacciones luminosas, las negras reacciones oscuras, y las puntadas representan el camino cíclico.

Abreviaturas usadas; PS I, fotosistema I; PS II, fotosistema II; Y, donador de electrones postulado para el fotosistema II; Q, aceptor primario de electrones para PS II; PQ, plastoquinonas; cit b, citocromo tipo b; cit f, citocromo tipo f; PC, plastocianina; P700, centro de reacción de PS I; P680, centro de reacción de PS II; SRF, substancia reductora de ferredoxina; fd, ferredoxina; Fp, ferredoxin-NADP-oxidoreductasa; Fci, ferricianuro; asc, ascorbato; y DPIP, 2,6 diclorofenolindofenol. Los números indican los sitios de acción de los inhibidores.

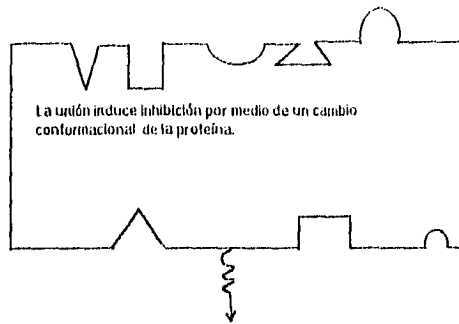
Aceptores de electrones

Estas sustancias tienen potenciales redox semejantes a algún componente enzimático de la cadena y pueden competir con alguno de los componentes de dicha cadena y de esta manera son susceptibles de reducirse. Hay compuestos como el ferricianuro, que trabajan de esta manera y sin embargo no son tóxicos.

Existen herbicidas como las sales de bupiridilo, paraquat y diquat que tienen potenciales redox entre menos 300 y menos 500 mv, pueden aceptar electrones compitiendo con el aceptor del fotosistema I desviando la cadena transportadora de electrones. Mantienen la fosforilación no-cíclica y cíclica, son fotoreducidos al iluminar los cloroplastos en condiciones anaeróbicas e inhiben la fotoreducción de NADP*, esta inhibición no se impide por la adición de DCPIP reducido.

Sitio de unión :

herbicida tras-			+	+	fenol
lapados en una		+	+	+	ureas
area de unión	+	+	+		triazinas



_____ PS II _____ Q _____ B _____ PQ _____ PC _____

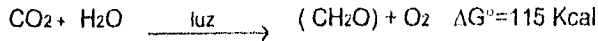
Representación esquemática de los sitios de unión de herbicidas tales como fenoles, ureas y triazinas sobre una proteína protectora, catalizadora del flujo de electrones desde PS II a PQ.

Para tener un conocimiento más amplio acerca del mecanismo de acción de los herbicidas en el proceso de fotosíntesis es necesario conocerlo detalladamente por lo que nuestro siguiente tema es la fotosíntesis.

FOTOSÍNTESIS

Es el proceso mediante el cual las algas y plantas superiores elaboran materia orgánica a partir de CO₂ atmosférico y agua.

El proceso total de la fotosíntesis en las plantas se representa por la ecuación empírica:



El dióxido de carbono es reducido al nivel de carbohidrato con la siguiente transformación de oxígeno. La reacción que es fuertemente endergónica se debe a la absorción de energía luminosa.

La energía almacenada en forma de carbohidrato y de otros compuestos reducidos puede << recobrase >> más tarde en forma de ATP durante la respiración y la fosforilación de la cadena respiratoria. Investigaciones recientes han demostrado que la energía luminosa puede ser convertida en ATP durante la fosforilación fotosintética. Aunque la ecuación anterior representa con exactitud la estequiometría de la fotosíntesis en los vegetales, no define la reacción básica de la fotosíntesis.

En las bacterias fotosintéticas, por ejemplo, nunca se desprende oxígeno y los compuestos tales como el acetato pueden remplazar al dióxido de carbono como fuente de carbono. Parece ser que la reacción básica de la fotosíntesis es la fosforilación del ADP a ATP mediante una fosforilación fotosintética cíclica. La fotosíntesis en las plantas verdes transcurre a través de dos tipos de reacciones lumínicas. El fotosistema I genera poder reductor en forma de NADPH. El fotosistema II transfiere electrones del agua a una quinona y simultáneamente produce O₂. El flujo de electrones entre los fotosistemas genera un gradiente de protones transmembrana que se emplea para posibilitar la síntesis de ATP, del mismo modo que en la fosforilación oxidativa.

FASE LUMINOSA

La primer etapa de la fotosíntesis es la absorción de un fotón de la luz por los pigmentos, inmersos en las membranas, los que transfieren su energía de excitación a una clorofila (la cual es una porfirina con un ion magnesio coordinado) especial llamado centro de reacción (cuya energía de estado de excitación es menor que el de las demás) ahí comienzan las reacciones químicas. Las clorofilas son unos fotoreceptores muy eficaces que contienen una red alternante de enlaces dobles y simples (un tetrapirrol sustituido). En otras palabras, son polienos los cuales tienen un poder de absorción muy fuerte en la región visible del espectro, en la zona en que la energía solar que llega a la tierra es máxima.

En las plantas verdes existen dos centros de reacción que son pigmentos que absorben a 680 y 700 nm, se les denomina P680 y P700, están rodeados de otros pigmentos secundarios o accesorios que constituyen el complejo antena (son los que captan la energía y la transfieren a los centros de reacción) el conjunto de pigmentos que rodea a P680 y P700 junto con los aceptores primarios de electrones formando los centros de reacción constituyen el fotosistema I y II (PS I y PS II) respectivamente.

La energía que se absorbe al excitar los electrones de las clorofilas es aprovechada mediante una serie de transportadores de electrones que sacan de la clorofila al electrón excitado y a éste le quitan lo excitado aprovechando su energía poco a poco. Por otro lado la clorofila vuelve a su estado original al aceptar electrones provenientes de la fotólisis del agua.

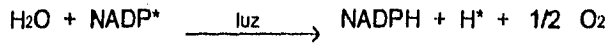
La transferencia de un electrón desde una sustancia a otra (transporte de electrón fotoinducido) activado por la luz, es en contra de un potencial electroquímico: Esto lo demostró Robert Hill.

Llevándose a cabo la separación de las dos etapas de la fotosíntesis observaron que puede haber desprendimiento de oxígeno sin la reducción del CO₂, empleando

en su lugar aceptores artificiales de electrones tales como el ferricianuro de potasio; la reducción del ion férrico a ferroso por la acción de la luz es una transformación de la energía luminosa en química. Siendo la ecuación general:



Donde A es el aceptor de electrones y AH₂ es su fórmula reducida; como aceptor final también puede usar metil-viológeno (MV). Esta reacción es conocida como la reacción de Hill. En 1951 se reportó que el NADP^{*}, un componente normal de los cloroplastos actúa como aceptor natural de electrones de la reacción de Hill de acuerdo con la siguiente ecuación:



La luz induce el movimiento de electrones vía varios aceptores de electrones los cuales están eslabonados en la cadena transportadora de electrones fotosintética. No todos los eslabones de la cadena han sido plenamente caracterizados pero se está de acuerdo en la existencia de lo siguiente; un sistema enzimático fotolizador (Y); un donador primario de electrones del centro de reacción del fotosistema II (P680); un aceptor primario de electrones del fotosistema II llamado por algunos como Q o citocromo 550 (cit 550) o X 320, un carrusel de moléculas de plastoquinonas (PQ); citocromo b559 (cit b3); citocromo f 553 (cit F); plastocianina (PC); donador de electrones del centro de reacción del fotosistema I (P700); una sustancia reductora de ferredoxina (FRS), ferredoxina (Fd); ferredoxin NADP oxidoreductasa (Fp); citocromo b564 (cit b6). Aunque actualmente se discute la secuencia precisa de algunas de las reacciones redox efectuadas y sus mecanismos de encadenamiento, un esquema general de la secuencia sería el que nos propone Moreland (Fig. 1)

Los componentes de la cadena transportadora de electrones están inmersos en la doble membrana formando complejos con componentes proteicos (4) y están dispuestos de una manera asimétrica como se muestra en la (fig. 3). Al funcionar la cadena transportadora se produce NADPH en el exterior del tilacoide se acidifica, ya que el exterior del mismo se alcaliniza (fig.2) .

Este gradiente de pH formado a través de la membrana es aprovechado por una enzima ATP sintetasa, que en realidad es un complejo enzimático al que se le llama CFI y que está constituido por cinco tipos de subunidades las que se unen a la membrana por otro componente proteico llamado TI, para sintetizar ATP (fig.2) la enzima ATP sintetasa no puede utilizar más protones de los proporcionados al interior de la vesícula del tilacoide por la cadena transportadora de electrones, a su vez la cadena transportadora de electrones no puede producir más protones que los aprovechables por la enzima ATP sintetasa, por lo se dice que ambos eventos están acoplados..

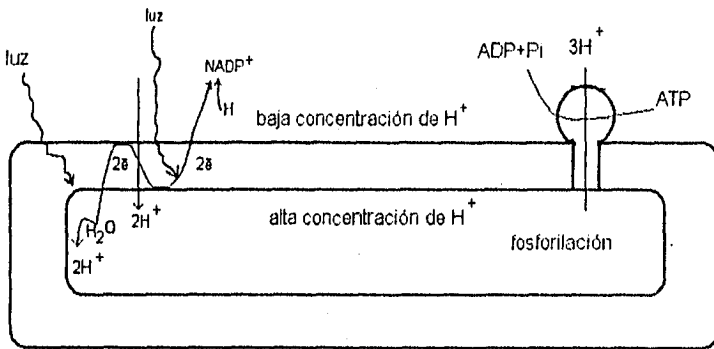


Figura 2.

En la figura 2. Se muestra el esquema de un saco tilacoide funcional. La cadena transportadora de electrones dependiente de luz y la fosforilación acoplada.

Dando una semblanza de lo anterior, definiremos como actúan los mecanismos de interacción del herbicida con el fotosistema II.

MECANISMO DE INTERACCIÓN HERBICIDA CON EL FOTOSISTEMA II

Los componentes de la cadena transportadora de electrones, inmersos en la membrana del tilacoide, se encuentran vinculados a proteínas algunas de las cuales los protegen y mantienen dentro de la dicha cadena, se sabe que los herbicidas del tipo DCMU ó también conocidos como Diurón, interrumpen el transporte de electrones en el sitio de reducción en el fotosistema II entre el aceptor primario X-320 y el carrusel de plastoquinona o "pool" (que son una serie de moléculas parecidas, a las quinonas todas, que acarrear electrones como si fueran un carrusel).

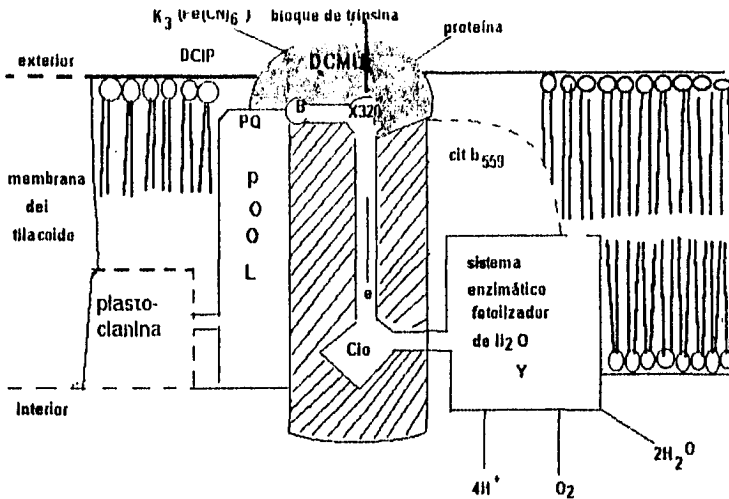
Renger (Amhrhein, N., Decs 1983) ha elaborado un modelo de la organización funcional y estructural de la transferencia electrónica entre X-320, B y el carrusel de plastoquinona, en donde establece que los componentes Redox X-320 y B están embebidos en una proteína que regula el transporte electrónico. Experimentos con mutantes resistentes al herbicida atrazina, que actúan al mismo nivel que el tipo Diurón en la cadena, han demostrado que en la proteína, hay una área de unión herbicida en la que hay varios receptores y subreceptores para todos los inhibidores del tipo del Diurón y atrazina. Actualmente se investiga el mecanismo molecular de la inhibición herbicida y se habla de dos diferentes modos de acción.

a).- Uno de ellos es el llamado Efecto cinético, en el que la modificación estructural de la proteína debido a la unión con los inhibidores del tipo del Diurón puede cambiar la orientación relativa y la separación entre las moléculas involucradas (X-320, B y plastoquinona), lo que modifica la barrera energética alterando la velocidad en el transporte de electrones.

b).- En segundo lugar el llamado Efecto termodinámico; donde la transferencia electrónica entre X-320 y B se regula termodinámicamente a través de sus potenciales redox los que dependen del microambiente existente; al modificarse la proteína debido a la unión que hay con el inhibidor se producen cambios en los potenciales redox del par B*/B más bajo que el del par X-320*/X-320, y de esta manera se evita el transporte de electrones de una manera termodinámica, el cambio debido al Diurón sobre la reacción $X-320^* + B \longleftrightarrow X-320 + B^*$ se ha demostrado por medidas de luminiscencia y fluorescencia.

Otros experimentos como incubación de cloroplastos en tripsina (enzima hidrolítica) evitan la inhibición que hace el DCMU, en la presencia de un aceptor de electrones tal como el $K_3Fe(CN)_6$. Estos resultados han permitido postular, que el ataque de tripsina cambia las propiedades del área de unión de la proteína con los inhibidores del tipo DCMU y atrazina. Fig. 3

Figura N.3



Esquema simplificado de la organización funcional y estructural del fotosistema II del cloroplasto; se muestra el sitio de acción del Diurón, tripsina, $K_3Fe(CN)_6$, fenil para benzoquinona y p-BQ y DCIP.

REACCIONES OSCURAS

Las cuales se inician con la fijación del CO_2 a la ribulosa 1,5 difosfato y en varios pasos enzimáticos es convertida en carbohidratos en el ciclo de Calvin.

Las plantas que tienen este metabolismo se llaman plantas C-3, ya que el primer metabolito estable después de la fijación del CO_2 es de 3 átomos de carbono. En cambio hay otras plantas que dan como primer producto un ácido dicarboxílico de 4 átomos de carbono, el ácido oxaloacético; dependiendo de la especie pasa inmediatamente a ácido málico ó ácido aspártico, a estas plantas se les llama plantas C-4. Posteriormente el malato o el aspártato es transportado al tejido de la vaina vascular donde son descarboxilados y el CO_2 que se desprende es reasimilado por la vía C-3 al ciclo de Calvin.

Las reacciones dependientes de la luz son las que corresponden a la reacción de Hill o cadena transportadora de electrones acíclica.

A continuación describiremos brevemente la reacción de Hill con el objeto de tener una imagen del sitio que bloquean los herbicidas al inhibir la fotosíntesis.

Para la reducción del CO_2 se requieren de 4 electrones y el donador natural de esos electrones es el agua en algas y plantas. El flujo de electrones del agua al bióxido de carbono se efectúa contra un gradiente electroquímico de 1 ó 2 volts y requiere de dos eventos fotoquímicos para vencerlos, proporcionados por los fotosistemas I y II conectados en serie. Los 4 electrones que se requieren para reducir al CO_2 se transportan de uno en uno en la cadena, se libera una molécula de oxígeno y se asimila una de CO_2 . El proceso de la fotosíntesis comienza con la absorción de un fotón de luz solar por los pigmentos antena del fotosistema II. La energía de excitación es transmitida por resonancia y transportada por las moléculas de clorofila (a los pigmentos antena están formado por 300 moléculas de clorofila y por un centro de reacción). Al centro de reacción P-680 de la unidad fotosintética.

El P-680 excitado dona su electrón al aceptor primario Q_A quedando P-680* como un oxidante fuerte e inmediatamente acepta un electrón del donador Z oxidándolo. Después de que Z ha donado 4 electrones al centro de reacción P-680 se libera una molécula de O_2 y cuatro protones al medio ambiente, la oxidación de 2 moléculas de agua en tanto el P-680 queda reducido.

Volviendo a Q-reducido los electrones son transportados por acarreadores de electrones a favor de un gradiente electroquímico son localizados entre los fotosistemas (I y II) conocidos como B (plastoquinona); PQ (almacén de plastoquinona); cit F (citocromo F) y Pc (plastocianina una proteína con dos átomos de cobre).

La plastocianina reducida dona su electrón a P-700 (dímero de clorofila) que absorbe luz por sus propios pigmentos antena y P-700 excitado dona electrones de uno en uno al receptor primario del fotosistema I, llamado X(el cual es una sulfoferroproteína, finalmente X reducido transfiere sus electrones a la proteína

reductora de ferredoxina (PFS), de aquí la ferredoxina (FD) y de ésta al NADP^+ para dar NADPH; esta última reacción es catalizada por la enzima ferredoxina (FD), NADP^+ reductasa. El transporte de electrones de X^- a NADP^+ se efectúa a favor de un gradiente electroquímico.

Podemos resumir que la reacción de Hill se transportan electrones desde el agua hasta el NADP^+ . Artificialmente se pueden sacar electrones a nivel X^- (con ferricianuro de potasio) y la reacción de Hill será entonces desde el agua hasta el ferricianuro; estas reacciones ocurren en el transporte de electrones acíclico y abarca los fotosistemas I y II.

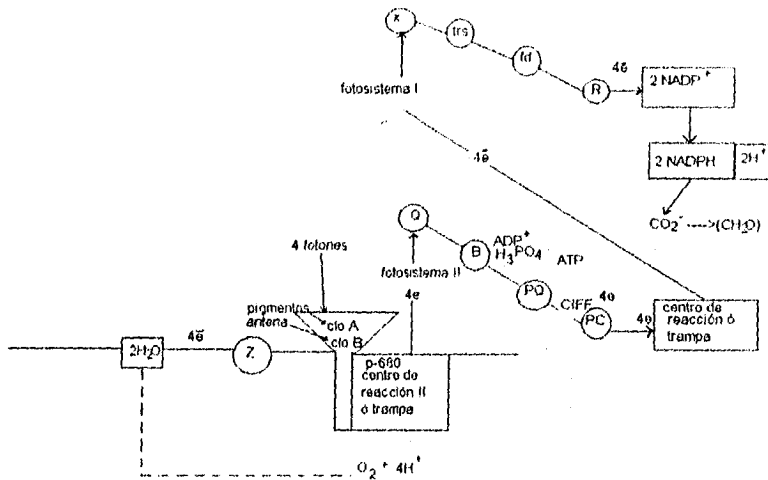


Figura 4.

INTRODUCCIÓN A MITOCONDRIAS

Siendo las funciones mitocondriales de importancia clave en el metabolismo celular, resulta lógico que estructural y fisiológicamente el organelo halla sido conservado en la escala evolutiva tanto en los phyla animal como en las divisiones vegetales. No obstante el mantenimiento de las características básicas de las mitocondrias tanto en los organismos autotrofos como en los heterotrofos presentan diferentes estructuras y metabolismos.

Existen varias características que son exclusivas de las mitocondrias de tejidos vegetales y que son las siguientes:

- 1).- Respiración insensible al cianuro. Este fenómeno está dado por la presencia de una oxidasa terminal diferente a la citocromo oxidasa, como aceptor final de electrones. Esta vía de transporte de electrones parece operar cuando la cadena primaria no tiene capacidad de funcionamiento.
- 2).- Oxidación de NADH exógeno. Esta reacción está catalizada por un NADH deshidrogenasa constituida por una flavoproteína y quizá por un citocromo, se localiza en la membrana interna mitocondrial, pero orientado hacia el espacio intermembranal, lo cual le permite ser accesible al NADH citoplásmico
- 3).- Oxidación de glicina
- 4).- Oxidación de ácidos grasos
- 5).- Presencia de una enzima málica

PARTE II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Experimentos de Post emergencia *in vitro* para caracterizar nuevos compuestos herbicidas.

Objetivos: Determinar la concentración del nuevo herbicida a la que inhibe el 50% o la destrucción de la hoja aplicado por aspersión.

- Conocer la potencia de los nuevos y diferentes herbicidas a trabajar

ACTIVIDAD HERBICIDA EN LA FOTOSÍNTESIS *IN VIVO*

Se aplica el reactivo en las hojas de las plantas cultivadas en el laboratorio, por aspersión para observar la concentración óptima que puede afectar en una planta agrícola y de maleza.

Actividad herbicida *in vivo* en el proceso de germinación.

Fundamento: Se basa en el desarrollo y crecimiento de las plantas seleccionadas a un tiempo determinado utilizando controles de la misma especie que tengan las mismas características, para tener resultados precisos acerca del comportamiento de los nuevos herbicidas.

Técnica:

Se procederá a germinar las semillas seleccionadas de malezas y de plantas agrícolas hasta obtener plantas con 3 o 4 hojas mínimo, a las hojas de estas plantas se les aplicará a diferentes concentraciones de N-isobutilcinamidas. Con el siguiente diseño experimental.

Los compuestos disueltos del nuevo herbicida se aplican por aspersión en las hojas y se determinará la concentración efectiva para provocar clorosis, necrosis o blanqueamiento en función del tiempo (de 5 a 7 días) es la adecuada.

Posteriormente se realizará un experimento por triplicado para determinar la concentración del nuevo herbicida. Los datos obtenidos se les dará un tratamiento estadístico.

En este trabajo se utilizaron las concentraciones que se obtuvieron en experimentos del efecto de las N-isobutilcinamidas en la fotosíntesis así como las que obtuvimos en los experimentos de germinación de semillas.

- Respiración efecto inhibitorio en semilla y mitocondria aislada.

Para la realización de todos los experimentos de respiración, germinación y fotosíntesis se utilizaron semillas de tomate, maíz, pasto y *Cassia obtusifolia*; con los siguientes compuestos:

<i>Lycopersicon esculentum</i>	4-Br isobutilcinamida
<i>Zea mays</i>	3-Cl isobutilcinamida
<i>Lolium multiflorum</i>	4-Cl isobutilcinamida
<i>Cassia obtusifolia</i>	4-Br isobutilcinamida

GERMINACIÓN

Actividad herbicida in vivo en germinación de semillas.

Fundamento: Se basa en la observación de pruebas cuantitativas de la germinación de semillas que nos puedan demostrar la efectividad del herbicida; con el objeto de encontrar el tiempo de óptima germinación de los controles y ver si esta actividad biológica es inhibida, acelerada o retardada, así como la concentración óptima que inhibe el 100% la germinación de las semillas.

Material y método

3 cajas Petri de diámetro 8.75 cm. por cada especie de semilla

Agua destilada

Papel filtro

Semillas de maleza de hoja angosta (pasto)

semillas de maleza de hoja ancha(*Cassia obtusifolia*)

Semillas de planta agrícola hoja ancha(tomate)

Semillas de planta agrícola hoja angosta(maíz)

Para la siguiente experiencia se utilizó un sustrato el cual tiene la función de proveer de humedad adecuada y sostén a la semilla durante la germinación, se pueden utilizar diferentes tipos de sustratos como: Papel secante, papel filtro, papel kimpak, tela, algodón, arena y tierra.

En las pruebas realizadas de germinación se utilizó el papel filtro con las siguientes características:

papel filtro	resistencia a ruptura	ascención capilar (cm)	acidez
Medio	1.00kg/m ²	3.0	6.0 - 7.5

Humedad y aireación: El sustrato debe de estar lo suficientemente húmedo para suplir las necesidades de agua de la semilla. A excepción de aquellas especies que requieren mucha humedad durante su germinación, el sustrato nunca debe de estar tan húmedo como para formar películas de agua alrededor de la semilla, porque esto restringe una buena aireación.

La adición de agua después de establecida la prueba de germinación depende de la evaporación de esta en la cámara de germinación, dado que el grado de evaporación depende de la humedad relativa del aire deben colocarse pocitos con agua para mantener una humedad relativa del 95%.

Evaluación de las plántulas.

Usualmente se efectúan dos conteos de plántulas en una prueba de germinación. El primer conteo se puede eliminar si existen semillas muertas y duras, registrándose las plántulas normales.

Al final de la prueba se puede determinar el porcentaje de semillas viables no germinadas. Las plantas dañadas seriamente por hongos y/o bacterias, deberán ser consideradas como normales siempre y cuando estén presentes sus estructuras esenciales y la fuente de inóculo no provenga de la misma semilla, si sucede lo anterior las semillas deben ser tratadas antes con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Si se desarrollan algunos síntomas típicos de alguna enfermedad esto deberá ser registrado, si se utiliza alguna sustancia para reducir o inhibir el desarrollo del microorganismo, durante la prueba esto se debe de anotar.

Para determinar que la prueba de germinación fue satisfactoria esta debe de tener una germinación mayor del 90%. Repita la prueba cuando considere que los resultados no son confiables debido a factores tales como:

- Condiciones impropias para la prueba
- Errores en la evaluación de plántula
- Presencia de hongos y bacterias
- Poca precisión en el conteo y registro de datos.

Para la siguiente experiencia se utilizaron las semillas de las especies seleccionadas de malezas y plantas agrícolas, con el nuevo herbicida a diferentes concentraciones utilizando un control como base de referencia.

Posteriormente se hará un experimento por triplicado para tener un mayor número de muestras, para hacer un tratamiento estadístico de los datos de desviación estándar y ver si la variación es significativa entre un compuesto y otro.

Técnica: Se utilizaron 3 cajas petri por cada especie de semilla conteniendo en su interior de la caja papel filtro el cual es utilizado como base para la germinación de las semillas, estas cajas son esterilizadas previamente para evitar la presencia de hongos y bacterias, las semillas son embebidas durante 30 minutos y puestas en la cajas con 7 ml de agua estéril. Cada especie de semilla de maleza y planta agrícola que fue seleccionada es sembrada por triplicado con diferente concentración de herbicida, utilizando una caja sin sustancia como blanco.

Son expuestas a temperatura ambiente durante 5 días y cada 24 horas se observan, para determinar su crecimiento comparado con su control correspondiente.

RESPIRACION

Fundamento:

Se realizaron experimentos de respiración en semillas de las mismas especies utilizadas anteriormente en experimentos de germinación y observar si la respuesta es afectada con la concentración creciente de las N- Isobutilcinamamidas, los datos se obtuvieron en el oxímetro (aparato que sirve para determinar la concentración de oxígeno por 100/polarografía) en donde se observó una disminución de la concentración de O₂ en la cubeta al consumirse por la respiración.

El principal objetivo de la experiencia es la determinación de la respiración por polarografía utilizando un electrodo de tipo Clark, el cual mide cambios en la corriente que se generan cuando se reduce el O₂ agua y es observado el consumo de oxígeno. Para demostrar en forma directa la inhibición de la respiración en semillas se debe analizar la inhibición de la respiración en mitocondrias aisladas, se procederá a aislarlas y en estas se medirá la actividad respiratoria en presencia y ausencia de las N-isobutilcinamamidas en concentraciones crecientes de estos compuestos.

Estos experimentos se repiten de tres a cuatro veces, los datos obtenidos se les dará tratamiento estadístico.

Diseño experimental

Para la siguiente experiencia se utilizó el oxímetro YSI modelo S300, conectado a un electrodo de Clark (determinación de cambios de concentración de oxígeno en la respiración en función del tiempo). Se colocaron cierta cantidad de semillas en un volumen determinado de agua, dependiendo del tamaño y forma de la semilla, se detectó respiración en el oxímetro, después de varios intentos con cada especie de semilla seleccionada encontrándose los resultados respecto a la cantidad de

semillas y volumen de agua para los ensayos óptimos de respiración de semillas son:

- 300 semillas de tomate de cascara
en un volumen de 4 ml de agua.

- 50 semillas de maleza hoja ancha *Cassia obtusifolia*
en un volumen de 4ml de agua.

- 100 semillas de pasto *Lolium multiflorum*
en un volumen de 3 ml de agua.

- 10 embriones de maíz
en un volumen de 4 ml de agua.

El aparato oxímetro es calibrado con agua a una apertura de 80° en el canal N.1

Los estudios realizados se hicieron según el tiempo de germinación de cada semilla, utilizando diferentes concentraciones de las N-Isobutylcinamamidas.

La corriente que se genera en la respiración al consumirse el O₂ se traduce a voltaje y graficado por un registrador se obtendrá la señal correspondiente

Sembrar en cajas petri estériles con los compuestos crecientes de las N-Isobutylcinamamidas como se muestra a continuación y tomar respiración cada tercer día, anotar y observar hasta su germinación.

- 100 semillas de pasto(*Lolium multiflorum*)---concentración 0 μ M
- 100 semillas de pasto(*Lolium multiflorum*)---concentración 30 μ M
- 100 semillas de pasto(*Lolium multiflorum*)---concentración 60 μ M

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS

Metodología:

Extracción de mitocondrias a partir de raíces de maíz.

Las mitocondrias son aisladas de la raíz de maíces de 3 ó 4 días de edad,

Se cortan las raíces de 1 cm. y se homogenizan en un mortero con arena previamente fríos; se filtra con cuatro capas de gasa, el líquido homogenizado es centrifugado a 10000 rpm 10 min. en una centrifuga Beckman J-21 Sorvall R-C 5B cabezal Maxser 461.

Purificación de mitocondrias

Se prepara un gradiente de sacarosa con 0.1 ml de albúmina bovina desgrasada BSA y 10 μ M de fosfato de potasio a pH de 7.6, agregar en los tubos de centrifuga : 6 ml de 1.8 M sacarosa, otra capa de 6ml de 1.45 M sacarosa, otros 6 ml de 1.2 M sacarosa, otra capa de 3 ml de 0.6 M sacarosa y en la parte superior agregar una capa de mitocondrias aisladas centrifugar a 18000 rpm durante 30 minutos en una centrifuga Sorvall RC-5B de cabezal número Max ser 461.

Las mitocondrias se separan en las fronteras de 1.2 y 1.45 de sacarosa, con una pipeta paster ponerlo el concentrado en un tubo de ensaye, diluir la sacarosa a concentración de 0.3 M pasar a tubos de centrifuga y centrifugar a 15000 rpm 3 min. después se decanta y la pastilla es resuspendida en medio de HEPES pH 7.2

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR MÉTODO DE BIURET

Fundamento:

Todos los compuestos que contienen uno o más enlaces peptídicos forman un complejo color violeta con las sales de cobre en soluciones alcalinas. Cada ion cobre $2+$ parece formar un complejo con 4 nitrógenos peptídicos.

El método toma el nombre de Biuret

$(H_2N-C-NH-C-NH_2)$ que es uno de los compuestos más simples que forman el complejo violeta con los iones de cobre.

$$\begin{array}{c} \text{II} \quad \text{II} \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$$

Reactivo: Sulfato de cobre al 0.15%, tartrato de sodio. potasio al 6%, hidróxido de sodio al 3%..

Preparación del reactivo utilizando agua hervida destilada y desionizada durante 20 minutos. Disolver 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado y 6 g de tartrato de sodio ò potasio en 500 ml de agua a temperatura ambiente.

Añadir 300 ml de hidróxido de sodio al 10% con agitación constante, aforar a 1000 ml con agua y almacenar en una botella de polietileno en la oscuridad.

Procedimiento: Blanco; conteniendo la cantidad adecuada de amortiguador en que se encuentra la muestra y aforando a 0.8 ml con agua.

Curva estándar de proteína: Contener 1-6 mg de albúmina bovina usando una solución de 10 mg de albúmina por ml de agua.

Aforar la muestra de proteína problema conteniendo aproximadamente 0.25 a 5 mg a 1 ml con agua. Agregar 2 ml del reactivo de Biuret y esperar de 20 a 30 minutos a que desarrolle color y leer absorbancia a 540 y 550 nm contra el blanco.

Gráficar los datos de absorbancia contra concentración de proteína en miligramos y extrapolar la absorbancia del tubo que contiene una alícuota de proteína mitocondrial para obtener la concentración de esta.

RESULTADOS DE FOTOSÍNTESIS *IN VIVO*

Experimentos de Post-emergencia

Inhibición de la fotosíntesis *in vivo*. Los resultados son observados después de 7 días de aplicación con las N-isobutilcinamamidas para cada planta agrícola y de malezas.

***Zea mays*:** Se observa que las hojas se han deteriorado a una concentración de 30 μM y sufrido necrosis a una concentración de 60 μM con el compuesto 3-Cl isobutilcinamamida en las hojas más tiernas, y en otras observamos una carencia de clorofila, ya que presentaba un color marrón. fotografía N.1

Lycopersicum esculentum- . A una concentración de 60 μM con el compuesto 4-Br isobutilcinamamida apenas se percibía clorosis en las hojas más tiernas, mientras que en las otras hojas menos desarrolladas no fueron afectadas con la concentración de 30 μM .

Por seguir el experimento a 240 hrs, se observó que después de este tiempo la planta era capaz de biotransformar la sustancia, sin causarle la muerte.

fotografía N.2

***Lolium multiflorum*:** El crecimiento del pasto es afectado considerablemente a una concentración de 30 μM y a una de 60 μM del compuesto 4-Cl isobutilcinamamida la planta sufre necrosis en las hojas y tallo; observándose un color verde seco y café claro.

fotografía N.3

Maleza de hoja ancha: *Cassia obtusifolia*: Es afectada en menor grado que el pasto, puesto que esta no murió a una concentración de 60 μM 3-Cl isobutilcinamamida, pero los daños fueron irreversibles, notando que el borde de sus hojas fue necrosado y el resto de la hoja sufrió clorosis. Esto fue observado a los 7 días. Fotografía N.4

RESULTADOS DE FOTOSÍNTESIS *IN VIVO*

Fotografía N.1

Compuesto : 3-Cl isobutilcinamamida

Semilla : *Zea mays*

Control

concentración=30 μ M

concentración=60 μ M



RESULTADOS DE FOTOSÍNTESIS *IN VIVO*

Fotografía N. 2

Compuesto : 4-Br isobutilcinamida

Semilla : *Lycopersicum esculentum*

Control

concentración=30 μ M

concentración=60 μ M



RESULTADOS DE FOTOSÍNTESIS *IN VIVO*

Fotografía N. 3

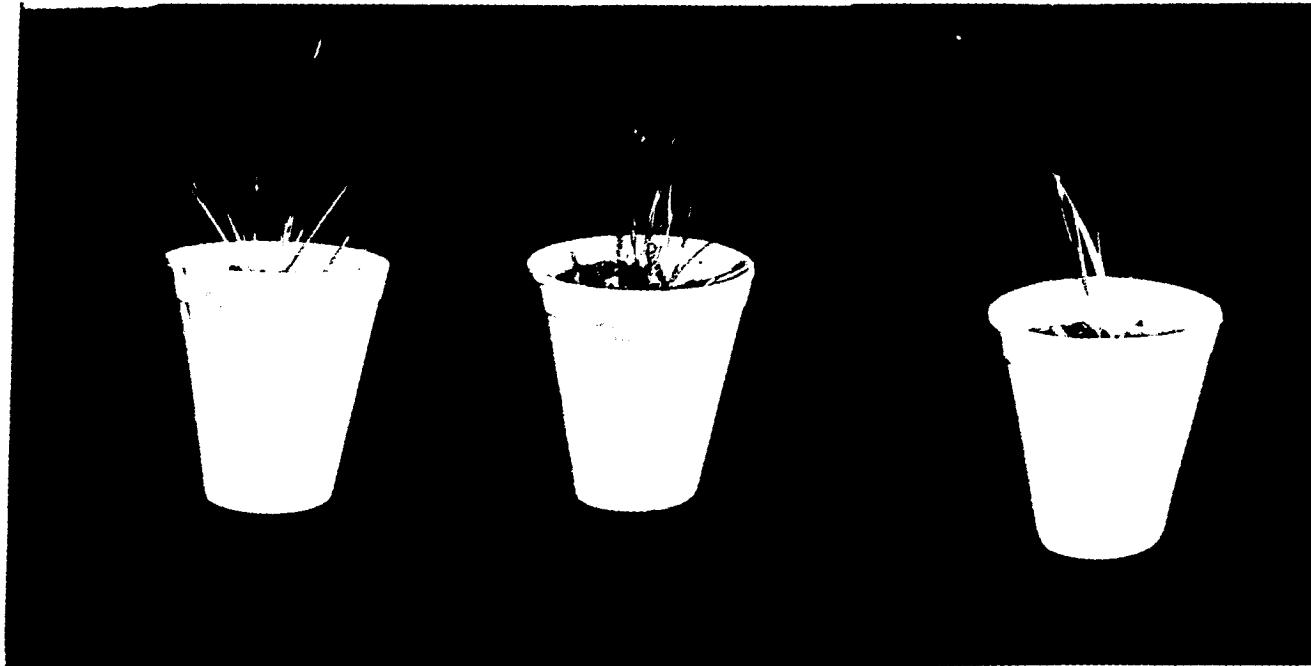
Compuesto : 4-Cl isobutilcinamamida

Semilla : *Lolium multiflorum*

Control

concentración=30 μ M

concentración=60 μ M



RESULTADOS DE FOTOSÍNTESIS IN VIVO

Fotografía N. 4

Compuesto : 4-Br isobutílicinamamida

Semilla : *Cassia obtusifolia*

Control

concentración=30 μ M

concentración=60 μ M



RESULTADOS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas del *Lycopersicum esculentum* fueron puestas a germinar con el compuesto 4- Br isobutilcinamamida a las 72 horas y 240 horas.

4-Br isobutilcinamamida

conc.(μM)	t(hrs.)	N. de semillas germinadas
0	72	198
30	72	126
60	72	148
0	240	289
30	240	280
60	240	280

En esta tabla se muestra la sustancia ensayada 4-Br isobutilcinamamida la cual no tuvo un mayor efecto más que el de retardar el tiempo de germinación de las semillas de *Lycopersicum esculentum* a una semana más, también se observó que de las 300 semillas puestas fueron germinadas casi en su totalidad a excepción de un porcentaje de 0.099%, lo cual es permitido, sin asegurar que la sustancia no inhibió a estas semillas.

Semillas de *Lycopersicum esculentum*

3-Cl isobutilcinamamida

conc.(μ M)	t(hrs.)	N. de semillas germinadas
0	72	194
30	72	48
60	72	29
0	240	290
30	240	287
60	240	267

Los resultados de la tabla demuestran que a las 72 horas se inhibe la respiración de las semillas y se recupera drásticamente a las 240 hora, lo que indica que estas semillas de *Lycopersicum esculentum* son capaces de biometabolizar a la sustancia.

En los siguientes experimentos se describirán los resultados de germinación de embriones de maíz en presencia de concentraciones crecientes de las N-Isobutilcinamamidas.

Embriones de Maíz

conc.(μ M)	tiempo (hrs.)	N. de semillas germinadas			
		4-Br	3-Br	4-Cl	3-Cl
0	48	10	9	10	10
30	48	8	8	9	8
60	48	8	7	8	7

Los resultados de esta tabla nos revelan que en los embriones de maíz es afectada

la germinación en un porcentaje de 30% a una concentración de 60 μ M, aunque este no sea tan significativo

Lolium multiflorum: Semillas de pasto

conc.(μ M)	tiempo (hrs.)	N. de semillas germinadas	
		4-Cl	3-Br
0	120	94	90
30	120	79	82
60	120	68	80

En este experimento de las 100 semillas de pasto puestas a germinar se observó un porcentaje de 10% a 32% de inhibición. Lo cual corresponde a presentar un daño en el metabolismo respiratorio de las semillas de *Lolium multiflorum*.

En las semillas de maleza de hoja ancha *Cassia obtusifolia* no se realizó el experimento de germinación ya que presenta una substancia que inhibe su crecimiento *in vitro*, como lo demuestra el análisis espectrofotométrico que se le realizó al líquido que desprendían las semillas.

RESULTADOS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Fotografía N. 1

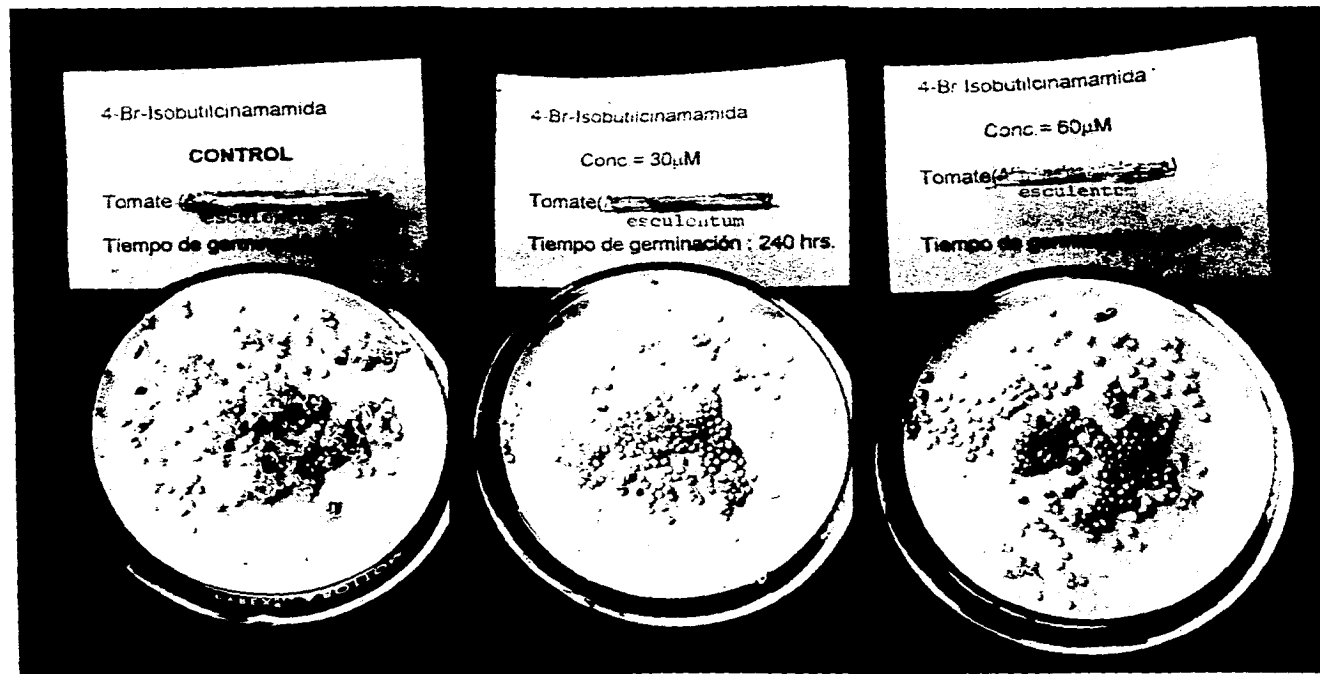
Compuesto : 4-Br isobutilcinamamida

Semilla : *Lycopersicon esculentum*

Control

concentración=30 μ M

concentración=60 μ M



RESULTADOS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Fotografía N.2

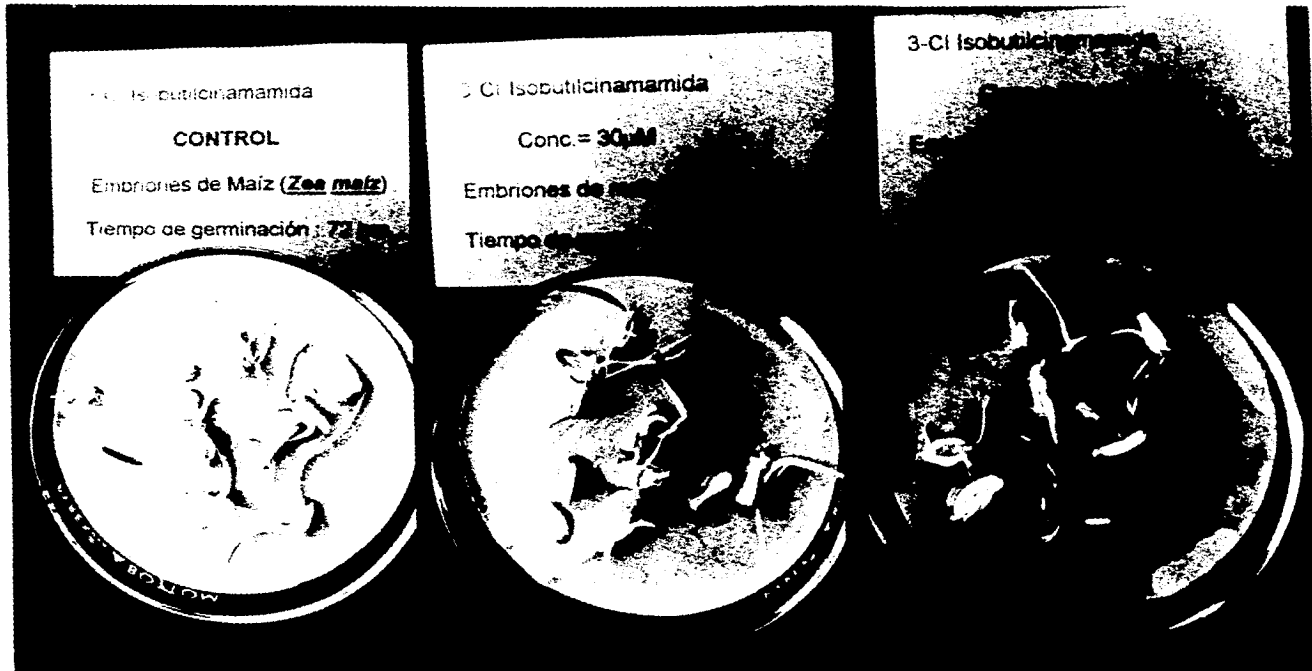
Compuesto : 3-Cl isobutiricinamamida

Semilla : *Zea mays*

Control

concentración=30 μ M

concentración=60 μ M



RESULTADOS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Fotografía N. 3

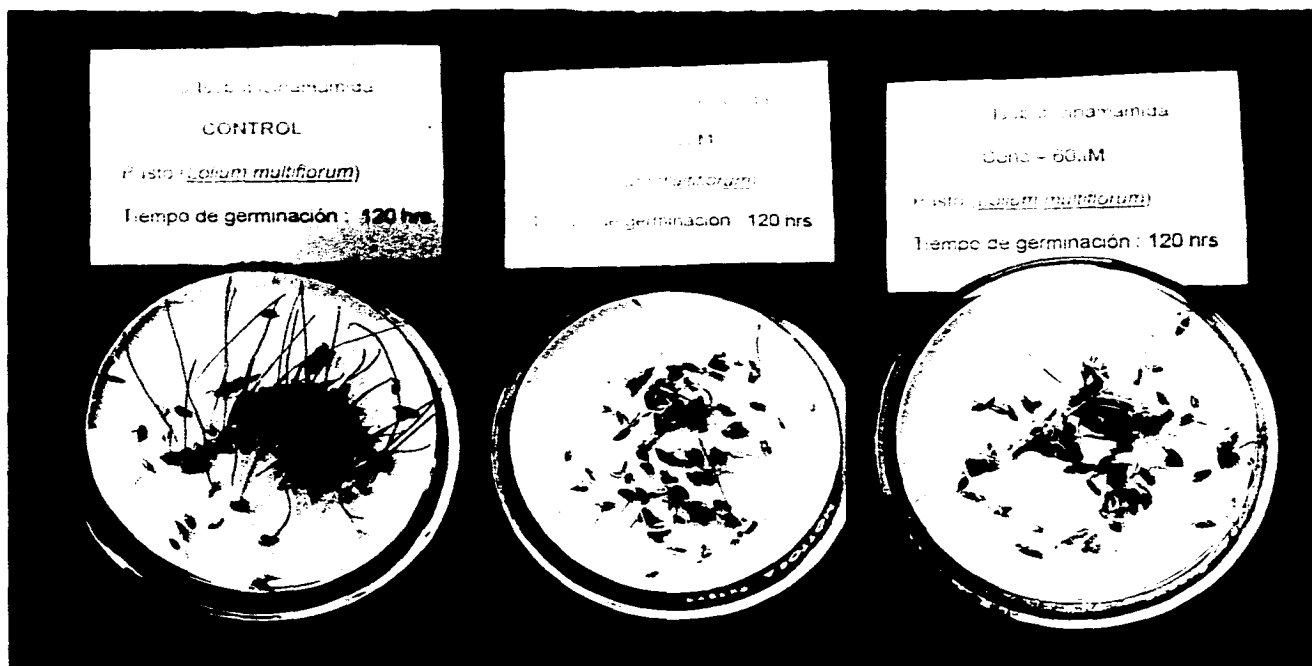
Compuesto : 4-Br isobutylcinamamida

Semilla : *Lolium multiflorum*

Control

concentración=30 μ M

concentración=60 μ M



RESULTADOS DE RESPIRACIÓN EN SEMILLAS

Semillas de tomate: 300 semillas de tomate embebidas 30 minutos en agua con dos lavados, incubados 24 horas en agua y otros compuestos de la familia de las *n*-isobutilcinamidas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el oxímetro, se tomó como referencia el segundo tiempo de dos minutos a partir del inicio, para obtener una pendiente más real y poder aplicar la siguiente ecuación para determinar la concentración de oxígeno en las semillas.

$$V_{rep} = \frac{(n_{10} O_2)}{(h \times n. \text{ de semillas})} N_{\text{-isobutilcinamidas}}$$

Tabla N.1

Resultados de respiración de 300 semillas de tomate de cascara

Concen tración (μ M)	Tiem po (hrs)	Velocidad de respiración Nato O ₂ /hx 300 semillas											
		4-Cl			4-Br			3-Cl			3-Br		
0	24	540	405	405	540	540	450	1890	1620	1655	1620	1890	1655
30	24	405	405	450	540	540	540	1890	1890	1890	1620	1790	1490
60	24	540	540	450	540	540	405	1350	1320	1585	1890	1890	1890
0	48	5130	5400	6210	5130	5400	5700	1350	1350	1350	1620	1620	1620
30	48	5400	5400	5400	6210	5130	5400	2890	2430	2460	2430	1890	2060
60	48	2970	3510	5130	6210	5130	5130	1050	1080	1015	1620	1690	1655
0	72	5130	5400	5400	5130	5400	5030	1890	1890	1890	1620	1620	1620
30	72	5400	5400	5400	4590	5510	4590	1890	2190	2140	1690	1630	1655
60	72	4320	4860	4960	5050	4880	5590	1890	1890	1890	1890	1890	1900

Los resultados encontrados muestran que los cuatro derivados de la N-isobutilcinamamida no afectan la respiración de las semillas de tomate a las 72 horas. La concentración ensayada corresponde a concentraciones que inhiben las diferentes actividades de la fotosíntesis.

Las siguientes tablas muestran la media de los datos obtenidos en los diferentes experimentos de respiración de las 300 semillas de tomate, así como la desviación típica o el error típico de las varianzas respecto a cada control.

Los valores de respiración de las semillas son reportados en N atO₂/h

4- Cl isobutilcinamamida

Concentración μM	Media μx	Varianza δ^2/x	Desviación estándar δX
0	12.22	18.71	4.32
30	12.45	20.53	4.53
60	9.3	3.91	1.97

4- Br isobutilcinamamida

Concentración μM	Media μx	Varianza δ^2/x	Desviación estándar δX
0	12.3	18.24	4.27
30	11.4	8.28	2.87
60	8.94	27.56	5.2

3-Cl isobutircinamamida

Concentración μM	Media μx	Varianza δ^2/x	Desviación estándar δX
0	5.55	33.94	5.82
30	6.76	33.10	5.75
60	5.61	31.01	5.56

4-Br isobutircinamamida

Concentración μM	Media μx	Varianza δ^2/x	Desviación estándar δX
0	5.55	0.075	0.2738
30	6.15	0.427	0.6534
60	6.15	0.670	0.8190

A los valores de las tablas anteriores se les realizó un tratamiento estadístico basado en una prueba no paramétrica denominada prueba de Kruskal-Wallis la cual generaliza el análisis de varianza para permitirnos prescindir de la suposición de que las poblaciones están distribuidas normalmente.

Se utilizo la siguiente formula:

$$K = \frac{12}{n(n+1)} \sum \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

en donde n_i =El número de elementos en la muestra j

R_j =La suma de los rangos de todos los elementos en la muestra j

k= El número de muestras

24 Hrs.	t=1.57	p=0.13		
	t=1.38	p=0.19	T=3.41	p<0.0007
	t=7.29	p<0.00001		

48 Hrs.	t=0.35	p=0.87		
	t=19.21	p<0.00001	T=12.29	p<0.0001
	t=19.31	p<0.00001		

72 Hrs.	t=5.05	p=0.000005		
	t=3.62	p=0.0003	T=4.98	p<0.000001
	t=6.29	p<0.00001		

En donde P es la significancia estadística; cuando $P > 0.05$ la prueba no es estadísticamente significativa, esto quiere decir que si realizamos el experimento anterior 100 veces, 95 experimentos tendrán resultados muy semejantes a los obtenidos en este experimento.

Tabla N.2

Resultados de respiración de 10 embriones de maíz

Concentración (μM)	Tiempo (hrs.)	Concentración de oxígeno N ato O ₂ /hx10 semillas			
		4 Br	3 Br	4 Cl	3 Cl
0	24	189	135	81	81
30	24	198	144	135	144
60	24	216	171	153	153
0	48	162	171	230	200
30	48	126	117	198	189
60	48	171	189	171	180

No se realizó una tercera lectura ya que los maíces habían germinado.

Los resultados de la tabla muestran que a 30 μM y 60 μM activan la respiración hasta aproximadamente un 60% a las 24 hrs de iniciado el experimento, normalizándose la respiración a las 48 hrs. por lo que los derivados halogenados de las N-Isobutilcinamidas ensayadas no afectan significativamente la respiración de los embriones de maíz ya que se recupera, lo cual sugiere que los embriones de maíz son capaces de biometabolizar el compuesto..

Tabla N.3

resultados de respiración

100 semillas de pasto *Lolium multiflorum*

Concentración (μM)	Tiempo (hrs.)	Concentración de oxígeno N ato O ₂ /hx100 semillas de pasto			
		4 Br	3 Br	4 Cl	3 Cl
0	24	315	360	360	270
30	24	270	270	270	270
60	24	360	360	180	180
0	72	720	630	810	810
30	72	630	540	810	720
60	72	630	540	630	810
0	120	990	990	1350	1460
30	120	1400	1170	1170	990
60	120	910	900	1200	990

En la tercer lectura nos indica que las semillas de pasto no fueron afectadas tanto como se esperaba, ya que el porcentaje no excedió de un 22% de inhibición como grado mayor, pudo ser metabolizado hasta un 10%. Lo cual nos indica que las cantidades que se ensayaron no fueron las adecuadas para la inhibición de la respiración en semillas

RESULTADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MITOCONDRIAS

Gráfica N.1 Curva estándar de proteína, para determinar la cantidad de proteína de mitocondria presente en la muestra.

Se hace una curva estándar a concentraciones crecientes de BSA para conocer la concentración de proteína de mitocondrias aisladas, se toma una alícuota de 0.1ml de suspensión y se trata de igual manera que el BSA, la absorbancia obtenida se extrapola en los tubos problemas A y B obteniéndose en la gráfica la concentración en mg.

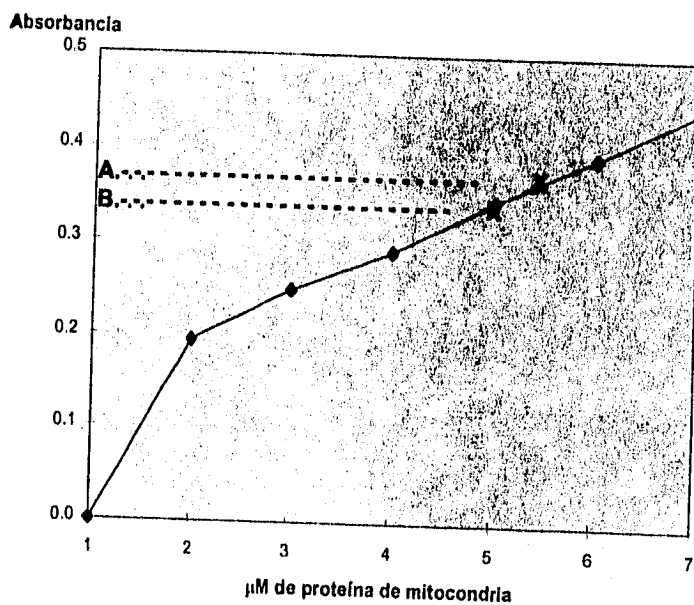


Tabla de resultados curva estandar de proteína

Tubo	absorbancias.
1	0.00
2	0.194
3	0.249
4	0.291
5	0.347
6	0.394
7	0.446

Tabla de cuantificación de mitocondria problema

Problema	Concentración Mitocondrias
Tubo 8 0.50 ml.	0.368
Tubo 9 0.55 ml.	0.330

2 mg proteína

Problema= $\frac{0.1 \text{ ml. Mitocondria aislada} \times 0.368 \text{ respiración mitocondria}}{0.50 \text{ ml.}}$
Problema = 0.1336 mg de proteína de mitocondria contenida en la muestra.

Con los resultados obtenidos en la interpolación de la gráfica se determina que la cantidad de proteína de mitocondria encontrada es de 0.3689 μM .

La cual fuè utilizada para determinar si algún compuesto halogenado de las N-Isobutilcinamamidas pudiese inhibir el metabolismo de la mitocondria.

El experimento realizado demuestra que no es afectado considerablemente el metabolismo respiratorio de las mitocondrias, cabe destacar que este experimento tiene que ser de suma destreza, ya que si se pasa un minuto más, esto bastaría para que las mitocondrias murieran.

CONCLUSIÓN

Para realizar un estudio sobre un nuevo herbicida y entender el mecanismo al cual fué afectado no es nada simple, ya que existen pruebas, que no tan sólo la metodología se lleva a cabo sino también el ingenio de cada de quién para tratar de imaginar como se puede comportar una planta con cierta las substancia ensayadas. Conociendo un poco acerca de las principales características de nuestra substancia obtuvimos cierta información para determinar en que sitio podría afectar nuestra molécula. La correlación entre la estructura química de los herbicidas y su reactividad no garantiza la actividad sobre las plantas de una substancia, pero permite diseñar nuevos y mejores herbicidas .

Por otro lado la actividad de una substancia en la fotosíntesis no garantiza su especificidad en ella. Solamente el conocimiento de todas aquellas posibles rutas en la pudiera afectar el herbicida, harían más predecible su actividad.

El presente trabajo fue con la finalidad de demostrar que la familia de las N-isobutilcinamamidas tienen un potencial inhibitor en las plantas y que en cierta planta agrícola es biodegradada después de un determinado tiempo.

Los estudios realizados en la respiración de semillas demuestran que algunas plantas agrícolas como el tomate no deja de captar oxígeno a pesar de tener una concentración elevada de las N-isobutilcinamamidas; mientras que las semillas de las malezas principalmente de hoja angosta fueron inhibidas casi en su totalidad siendo las substancia más activas ver tabla N.3.

En los estudios de germinación los resultados fueron similares, siendo las semillas que mas germinaron las de los tomates es decir aunque fue inhibida la respiración en las primeras horas posteriormente las semillas metabolizaron la substancia, también se observó que las de menor grado de germinación, lo obtuvieron los pastos a una concentración de 60µM.

En fotosíntesis *in vivo* a una concentración de 60µM de 4-Cl-isobutilcinamamidas sufrió necrosis los pastos, mientras que el tomate sólo se observó clorosis en algunas de sus hojas, por lo que se concluye que los compuestos más activos

fueron el 4-Cl-isobutilcinamamida y el 3- Br isobutilcinamamida

Para que una cierta sustancia actúe como herbicida debe de cumplir con ciertos requerimientos como una cierta lipofolicidad y una funcionalidad polar para que el herbicida entre en contacto con la proteína aceptora y que inhiba su proceso natural. Es difícil en realidad determinar con precisión a que nivel inhiben las N-isobutilcinamamidas, pero se determinó que bien se pudiera obtener un herbicida selectivo. Los estudios realizados en el laboratorio y en el campo corroboran lo anterior.

No se pudo tener con exactitud resultados de proteína de mitocondria, para determinar si es afectada la cadena respiratoria en está, pero se vio que a las cantidades ensayadas no afecta considerablemente.

Los sitios de inhibición son localizados mediante una gran variedad de técnicas bioquímicas y biofísica, suelen emplearse sistemas artificiales de donadores y aceptores de electrones (un donador proporciona electrones a la cadena en determinado paso y un aceptor los acepta en otro).

Esto significa ir probando en partes las reacciones de la cadena y ver en donde esta afecta por alguna sustancia externa, por lo que cuando se trata de desarrollar una nueva sustancia que inhiba la síntesis de la cadena se debe hacer un estudio minucioso acerca de la posible actividad de la sustancia, sino puede ocasionar una gran perdida de tiempo.

Otro experimento que debe ser notado, es cuando el metabolismo vegetal es capaz de metabolizar sustancias tóxicas en no tóxicas y no tóxicas en tóxicas como ejemplo, con el maíz y la triazina, cuando es destoxificada la triazina no es tóxica para el maíz y si para otras plantas, como ocurre con la planta de tomate y el 4-Br-isobutilcinamamida.

Limitaciones en el campo agrícola.

La mayoría de los herbicidas actuales tienden a empobrecer las tierras, si estos son usados por periodos prolongados ya que la mayoría de los herbicidas no son

biodegradables, por lo tanto se quedan depositados residuos químicos, que con el tiempo se van combinando con los minerales de la tierra formando complejos de coordinación, provocando como consecuencia la falta de minerales en la tierra y por tanto un desarrollo menor al esperado en las plantas agrícolas.

Por lo que actualmente se está tratando de producir herbicidas biodegradables o por lo menos que los depósitos que se acumulen en la tierra no dañen a las plantas o que en determinado momento lo puedan degradar.

La finalidad primordial de este trabajo realizado es dar a conocer el desarrollo de una nueva familia química dentro de la agricultura y sobre todo tratar de no dañar más nuestros campos que a largo plazo pudiesen quedar estériles.

GLOSARIO

CuSO ₄	Sulfato de cobre
TCA	Tricloro acetato de sodio
MV	Metil viológeno
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
Y	Sistema enzimático fotolizador
P-680	Donador primario de electrones del centro de reacción del fotosistema II
Q ó Cit 550 ó X320	Aceptor primario de electrones del fotosistema II
PQ	Carrusel de moléculas de plastoquinona
cit b ₃	Citocromo b559
cit F	Citocromo F553
cit b ₆	Citocromo b564
Pc	Plastocianina
P700	Donador del centro de reacción de fotosistema I
FRS	Sustancia reductora de ferredoxina
Fd	Ferredoxina
Fp	Ferredoxin NADP oxidoreductasa

REFERENCIAS

Amrhein N. Dees B. Gehrke P. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. Plant physiology . pp. 66, 830, 834.

Richard W. Pohl "How to know the grasses" Wm C. Brown Company Publishers. United States of American 1978, pp. 27, 61, 187, 110

Ashton, F. M. & Crafts, A.S. "Mode of action of herbicides John Wiley , New York 1973.

Bukovac. M. J. Sargent J.A. Powell.R.G. & Blackman. G.E. (1971) Studies of foliar penetration VIII. "Effects of chlorination on the movement of phenoxyacetic and benzoic acid through cuticles isolated from the fruits *Lycopersicon esculentum*"
L. Journal of experimental botany vol. 22 pp. 598-612.

Davies Giovanelli Rus. 1970 Bioquímica vegetal
Editorial Omega Barcelona España.

Carter, M. C. (1975) Amitrole in herbicides:Chemistry, degradation and mode the action. Vol. 1 pp 377-389. Marcel Dekker, New York.

Carringer. R.D. Rieck. C.E. & Bush L.P. 1978 "Metabolism of EPTC in corn (*Zea Mays*). Weed Science vol. 26 pp.157-168.

Mabayoje A. Oriowo

Journal of medicinal Plant Research "Anti-inflammatory activity of Piperonyl-4-acrylic Amide, an Extractive from *Zanthoxylum zanthoxyloides*
1982, vol.44, pp.54-56 University of Ibadan, Ibadan Nigeria.

Benito Reyes T., Andrés Navarrete C. y otros. "Constituyentes químicos de *Zanthoxylum liebmannianun* (encl.) p. Wilson "colopahtle", una planta medicinal Mexicana
1991 Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, México D.F.

Ramírez, Z. y Montesinos J.L. "Estudio químico y farmacológico preliminar de la corteza de Colopahtle (*Xanthoxylum liebmannianun*).
Tesis de Licenciatura ENEP Zaragoza UNAM

E.M. Essien and J.I. Okogun. 1976 " Effect of the root Extract of *Fagara Zanthoxyloides* on blood Coagulation
Department of Haematology university College Hospital Nigeria

Sofowora, E. A. Isaacs-Sodeye W. A. and Ogunkoya L.O.1975: "Isolation y characterisation of an antiscikling agent from *Fagara zanthoxyloides* root"
Lloydia 38 pp. 169

Ichiro Yasuda, Koichi Takeya and Hideji Itokawa. " Distribution of unsaturated Aliphatic acid amides in Japanese *Zanthoxylum* species"
Phytochemistry, vol.21 N.6 pp.1295-1298
1982

Wain, R.L. "Herbicide selectivity through specific action of plants on the compounds applied, Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol.3 pp.128-130

Roberto Martinez, Luis Velazco, Lino Reyes y varios "Electrón impact mass spectrometry of N-(2-methylpropyl)-3-3(o,m-and p-R-phenyl)-2-propenamides."
Spectroscopy 1994 IOS Press. pp-9-20

Govindjee and Rajni Govindjee(1979). "The absorption of light in Photosynthesis"
Science American vol.231 pp. 68-82

Michael Elliott, Andrew W., Farnham, y otros (1986). "Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides".
Pestic Science vol.18 pp.211-221

Harald Grerer (1984)"Alkamides:Structural Relationships, Distribution and Biological Activity" Review pp. 366-393

Flores Mejla Haydee 1994 " efecto de las N-Isobutilcinamidas en la fotosíntesis"
Tesis profesional ENEP Iztacala.

Murray R. Spiegel (1975)Probabilidad y Estadística
McGraw Hill USA

Lubert Stryer
Bioquímica. Tercera edición
Edit. Reverté S.A. España 1993