

36-A
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

SINTESIS DE N-ISOBUTILCINAMAMIDAS Y
CARACTERIZACION DEL EFECTO EN LA
FOTOSINTESIS.

T E S I S

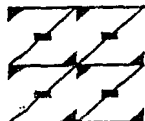
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

HAYDEE MEJIA FLORES

U N A M
F E S
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1994

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 está 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Dr. BLAS LOTINA HENNSEN.
VOCAL	M. EN C. LINO JOEL REYES TREJO.
SECRETARIO	Q. GUADALUPE MIRANDA JIMENO.
1er. SUPLENTE	Q. ADELFO REYES RAMIREZ.
2do. SUPLENTE	Q.F.B. ANGEL ROJAS ZAMORANO.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

EN LA FACULTAD DE QUIMICA EN LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA Y EN EL CONJUNTO E EN EL
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FES ZARAGOZA UNAM, MEXICO D.F., 1994.

SUSTENTANTE: HAYDEE MEJIA FLORES.

DIRECTORES DEL TRABAJO: M. EN C. LINO JOEL REYES TREJO.

Dr. BLAS LOTINA HENNSEN.

DEDICATORIAS.

Dedico esta tesis a mis padres:

María Magdalena Flores Reza y Apolinar Mejía Vega.

Por brindarme toda su comprensión y cariño en todos los momentos de mi vida, el esfuerzo de ambos es muy valioso, ya que siempre han sacrificado muchas cosas por mi hermano y yo para que vivamos mejor y siempre continuemos superandonos, les agradezco que me hayan apoyado en terminar mis estudios, es la mejor herencia que me pudieron otorgar, ya que los conocimientos que adquirí en esta carrera son muy importantes para mí, me esforzaré por ejercer dignamente mi profesión, gracias por haberme conducido por el buen camino, yo sé que ésta es una pequeña etapa de nuestra vida que compartimos juntos, espero que sigamos siendo una familia unida como hasta ahora, los quiere Haydée.

A mi hermano:

Héctor Francisco Mejía Flores.

Dedico esta tesis con respeto y cariño, por el apoyo que siempre me brindas para que continúe en mis estudios y no tropiece por muy fuertes que sean los problemas a los que me enfrente, tus consejos son siempre importantes, para poder continuar superandome cada día, te quiere sinceramente Haydée

A una persona muy especial:

Miguel.

Dedico esta tesis con cariño, con quien he compartido los mejores momentos de mi vida, desde que te conocí siempre me has apoyado en todo lo que me he propuesto, gracias por tu especial afecto, por tu comprensión y consejos, espero que continúe esta amistad tan maravillosa y nunca te olvides de mí. te quiere Haydée.

Quienes convivimos muchos momentos maravillosos y difíciles pero al fin logramos enfrentar todos los obstáculos, llevo un recuerdo muy bonito de todos ustedes: Olivia, Luis, Jaime, Noe, Senovina, María, Juan, Araceli, Patricia, Mónica, Angeles, Ciro, Miguel, Martha, Angel y Manuel.

*A toda mi familia y demás amigos:
Dedico esta tesis con especial cariño a todos por su apoyo y comprensión.*

*A todos los del laboratorio de Química Orgánica y Bioquímica
Gracias por brindarme su amistad y apoyo en todos los momentos, quienes hicieron que fuera más agradable mi estancia: Jacqueline, Beatriz, Gabriela, Leslie, Susana, Silvia, Mónica, Fermín, Dr. Rogelio, Liliana, Josefina, Marisela, María Esther y Enelud.*

AGRADECIMIENTOS:

Se agradece en forma especial a mis asesores de tesis al M. en C. Lino Joel Reyes Trejo y Dr. Blas Lotina Hennsen por su apoyo para la realización de este trabajo, por sus valiosos consejos y conocimientos transmitidos.

Se agradece a la Dra. Rocio Pozas Horcasillas y a todos los integrantes del laboratorio de Química Orgánica por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Se agradece al B. Oscar César Santoyo Martínez por su asesoría y colaboración en los programas de computación y por las digitalizaciones presentadas en este trabajo.

Se agradece a la Q. Marisela Gutierrez Franco y Q.F.B. Graciela Chávez Beltrán por la realización de los espectros de infrarrojo y U.V.

Se agradece a todas las personas que realizarón los espectros de RMN en la facultad de Química Orgánica en la División de Estudios de Posgrado.

Por las facilidades brindadas para utilizar las instalaciones del Laboratorio de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado y al Laboratorio de bioquímica en el Edificio E, Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

	Página
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Fundamento del tema.....	4
3.1. Propiedades farmacológicas de N-Isobutilcinamidas.....	4
3.2. Aleloquímicos.....	7
3.3. Herbicidas.....	9
3.4. Clasificación de los inhibidores de la fotosíntesis.....	10
3.5. Correlación estructura-actividad.....	10
3.6. Parámetros de los sustituyentes.....	12
3.6.1. Parámetros Hidrofóbicos.....	13
3.6.2. Parámetros Electrónicos.....	14
3.6.3. Parámetros Estéricos.....	15
3.7. Fotosíntesis.....	15
3.7.1. Pigmentos fotosintéticos.....	17
3.7.2. Fotosistema I y II.....	17
3.8. Síntesis de N-Isobutilcinamidas.....	19
3.8.1. Formación de los ácidos α,β -insaturados.....	19
3.8.2. Formación de la N-Isobutilcinamida.....	19
4. Justificación del tema.....	21
5. Objetivos.....	22
6. Hipótesis.....	23
7. Material y Método de la Síntesis Orgánica.....	24
7.1. Material, reactivos y equipo.....	24
7.1.1. Equipo.....	24
7.1.2. Reactivos.....	24
7.1.3. Material.....	25
7.2. Método de la síntesis orgánica.....	26
7.2.1. Síntesis de derivados del ácido cinámico.....	26

7.2.2. Síntesis de N-Isobutilcinamidas.....	26
8. Material y Método de la parte de Bioquímica	29
8.1. Material, reactivos y equipo.....	29
8.1.1. Equipo.....	29
8.1.2. Reactivos.....	29
8.1.3. Material	30
8.1.4. Material biológico.....	31
8.2. Métodos bioquímicos.....	29
8.2.1. Aislamiento de cloroplastos.....	31
8.2.2. Determinación de clorofila	31
8.2.3. Soluciones concentradas de los compuestos a ensayar.....	31
8.2.4. Medición de la velocidad del transporte de electrones en cloroplastos	32
8.2.5. Determinación de la velocidad del transporte de electrones no cíclico basal (T.E.B.).....	32
8.2.6. Velocidad del transporte de electrones no-cíclico fosforilante (T.E.F.).....	32
8.2.7. Velocidad del transporte de electrones no cíclico-désacoplado (T.E.D.).....	32
8.2.8. Síntesis de ATP.....	33
8.2.9. Captación de protones.....	33
8.2.10. Reacciones parciales	33
8.2.11. Fotosistema I.....	34
8.2.12. Fotosistema II	34
8.2.13. Reacción parcial de $H_2O \rightarrow SiMo$	34
8.2.14. Reacción parcial de $DPC \rightarrow DCIP$	34
8.2.15. Reacción parcial de $TMPQH_2 \rightarrow MV$	34
8.2.16. Reacción parcial de $PMS \rightarrow MV$	35
8.2.17. Obtención del coeficiente de partición	35
8.2.18. Obtención del coeficiente de extinción.....	35
9. Resultados y Discusión de resultados.....	36
9.1. Síntesis de derivados de N-Isobutilcinamidas	36

9.2. Caracterización bioquímica de los derivados de N-Isobutilcinamidas en las diferentes actividades de la fotosíntesis.....	39
10. Conclusiones.....	54
11. Propuestas.....	56
12. Apéndice.....	57
12.1. Abreviaciones.....	57
12.2. Espectros.....	59
13. Bibliografía.....	66

1. RESUMEN.

Las N-Isobutilcinamamidas se encuentran en diferentes plantas del género *Zanthoxylum*, estos compuestos presentan diferentes actividades farmacológicas.

En este trabajo se sintetizó N-Isobutilcinamamida y 12 derivados con diferente sustituyente como son: 3,4-Metilendioxi, 3-Fluor, 3-Metoxi, 4-Metoxi, 4-Bromo, 3-Bromo, 4-Metil, 4-Cloro, 3-Cloro, 4-Nitro, 3-Nitro, 2-Nitro. Se caracterizaron espectroscópicamente por RMN, IR, UV y se determinó el punto de fusión de cada compuesto.

Posteriormente se evaluó el efecto biológico en diferentes actividades de la fotosíntesis como transporte de electrones basal, desacoplado, fosforilante, síntesis de ATP, captación de protones, y se encontró que los compuestos inhiben todas las actividades de la fotosíntesis, es decir son inhibidores de la reacción de Hill. De acuerdo al 150, el compuesto más activo fue el derivado 3-Metoxi, se localizó el sitio de inhibición en las reacciones parciales de la fotosíntesis. Se obtuvieron experimentalmente los coeficientes de partición y se realizaron estudios de estructura-actividad se llegó a la conclusión que los compuestos que favorecen más la actividad inhibitoria de la reacción de Hill son los metoxilados.

Los derivados de N-Isobutilcinamamidas son considerados como aleloquímicos debido a que la planta los utiliza para su protección contra los insectos y contra otras plantas. Este trabajo contribuye a entender la acción alelopática de las N-Isobutilcinamamidas.

2. INTRODUCCION.

Las malezas originan diversos problemas como son: dificultades en las labores de cultivo, recolección y uso de plaguicidas para su eliminación, disminuyen en la producción agrícola y repercuten considerablemente sobre la economía del agricultor. La disminución en las cosechas originadas por el crecimiento de tales plantas varía de acuerdo a las zonas climatológicas y pueden ser del 15 al 50 % del valor total, debido principalmente a la competencia que se origina entre ellas y plantas agrícolas por espacio, minerales, luz y agua. El hombre desde tiempos muy remotos ha desarrollado métodos mecánicos, biológicos y químicos para combatir las malezas, resultan más eficientes y económicos los métodos de control químico (Audus, 1979).

El desarrollo de herbicidas para protección vegetal se hace cada vez más importante sobre todo en países eminentemente agrícolas como es el caso de México. Los mejores son sustancias con una actividad máxima contra las malezas y lo menos dañino posible hacia los cultivos y otras formas de vida. El diseño de estos se podrá lograr cuando se conozca mejor la forma en la que actúan y el sitio o zona de ataque de estos compuestos, así como la fisiología vegetal de las malezas en presencia de los herbicidas (Lotina, 1989).

El modo de acción de la gran mayoría de los herbicidas no han sido aún esclarecido, su descubrimiento se ha hecho en forma empírica.

El estudio de las relaciones estructura-actividad biológica de series de compuestos pueden contribuir al conocimiento de los mecanismos de la acción herbicida (Moreland, 1980).

La incorporación de compuestos alelopáticos dentro de la agricultura puede reducir el uso de herbicidas, fungicidas e insecticidas sintéticos, los aleloquímicos causan menos contaminación, ya que son biodegradables. La interacción de las plantas con diversos organismos, a través de su historia evolutiva ha traído como consecuencia que estos desarrollen mecanismos de defensa tales como la producción de compuestos aleloquímicos, que el hombre utiliza para su beneficio. Estos productos proporcionan materia prima para la síntesis de herbicidas, pesticidas y fungicidas.

Los agentes químicos de alelopatía (aleloquímicos) son liberados por la planta donadora a través de raíces, tallos, polen y hojas éstos interaccionan con aquellas plantas que compiten por las sales minerales, luz y agua para exterminarlas o interaccionan con los insectos que los atacan.

Las N-Isobutilcinamamidas presentan actividad biocida (insecticida, amebicida, antihelmíntica, herbicida), aunque no se ha esclarecido la relación estructura-actividad por cuya interacción biológica conduzca al organismo atacante (insecto, planta), tampoco se conoce el blanco de ataque de estos compuestos, no existen investigaciones que indiquen si las N-Isobutilcinamamidas del género *Zanthoxylum* actúan como aleloquímicos que afecten a la fotosíntesis.

En este trabajo se hace un estudio de la relación estructura-actividad para establecer si las N-Isobutilcinamamidas afectan el metabolismo energético de las plantas a nivel de fotosíntesis, por tal razón se sintetizó N-Isobutilcinamamida y 12 derivados con diferente sustituyente, se estudió su efecto en diferentes actividades de la fotosíntesis in vitro en cloroplastos aislados de hojas de espinaca.

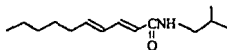
3. FUNDAMENTO DEL TEMA

3.1. Propiedades farmacológicas de N-Isobutilcinamidas.

En nuestro país existe una notable tradición en el uso de la flora para diversos propósitos, y esto explica que desde los inicios de la investigación química se practique el estudio químico de la vegetación. El género *Zanthoxylum* de la familia de las rutáceas, se considera como sinónimo de fagara (Yasuda, et al., 1982). Este comprende alrededor de 80 especies encontradas principalmente en Africa, Australia y America. En México se localiza en diferentes estados de la República como son: Michoacán, Puebla, Oaxaca, Chiapas, Zacatecas, Sinaloa, Baja California, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis potosí, Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco y Nayarit (Reyes, et al., 1991).

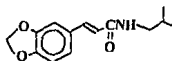
La planta medicinal mexicana conocida con el nombre de "Colopatle" *Zanthoxylum Liebmannianum* se utiliza en el valle de Tehuacán Puebla como amebicida y antihelmíntico, al ser masticada, su corteza produce una sensación de adormecimiento en la lengua y sabor picante. Los metabolitos bioactivos aislados de este género son N-Isobutilamidas de tipo alifático y/o aromático. Algunas de estas han sido estudiadas farmacológica y toxicológicamente, tal es el caso de las amidas α -Sanshool, que poseen una toxicidad relativamente baja para los animales de sangre caliente, característica apreciada para el desarrollo de insecticidas biodegradables. Se ha encontrado que la actividad biológica de las N-Isobutilamidas olefinicas es diversa y varía de acuerdo a el número de dobles enlaces, la geometría molecular y la longitud de la cadena (Reyes, et al., 1991; Jacobson, 1971).

En el oriente de Africa el árbol medicinal *Fagara macrophylla* es conocido por ser relativamente inmune al ataque de insectos. Un examen químico de los extractos de la corteza realizado para establecer la causa de la resistencia observada, llevó al aislamiento de cinco compuestos inhibidores y/o tóxicos contra insectos, uno de los cuales fué identificado como Pellitorina [1], que es el segundo en abundancia en el extracto y resultó ser una amida muy activa contra larvas de *Pectinophora gossypiella*, plaga que afecta a la agricultura (Jacobson, 1971).

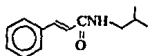


N-Isobutil-2E, 4E-decadienamida (Pellitorina). [1]

Otro grupo de amidas que resulta de gran interés es el de las aromáticas, algunas de estas han sido aisladas de la planta llamada *Piper amolago*, conocida en la India y América Central por ser un remedio eficaz contra malestares estomacales; estudios recientes demuestran la actividad hipotensiva de extractos de las hojas y raíz se han aislado 36 amidas algunas de ellas son: Fagaramida[2], y N-Isobutilcinamamida [3] (Achenbach, et al., 1986).



Fagaramida [2]

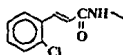


N-Isobutilcinamamida [3]

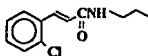
La actividad anticonvulsiva de N-Isobutilcinamamidas se ha estudiado por un grupo de investigadores de la Universidad de Beijing en China, para lo cual se sintetizaron una serie de compuestos y entre los más activos son las N-Isobutil-3-clorocinamamida y N-Isobutil-2,4-diclorocinamamida (Shuyu, et al., 1986).

En 1984 Kubo mostró que las N-Isobutilamidas aisladas de *Fagara macrophylla* como la fagaramida tienen actividad moluscocida (Kubo, 1984).

La actividad herbicida de N-alquilamidas obtenidas de raíces y tallos de diferentes variedades de vegetales, se sintetizaron diversos derivados de clorocinamamidas, dos de los cuales resultaron ser muy activas como herbicidas N-metil-2-clorocinamamida[4] y N-propil-2-clorocinamamida[5]. En este mismo trabajo se estudiaron 30 cinamamidas que presentan efecto potente contra malezas, tales como: *Monochoria vaginalis*, *Rotola indica*, *Dopatrium junceum*, *Eleocharis acicularis*, *Sagittaria pygmaea* y *Scirpus juncooides* (Shinohara, 1975).



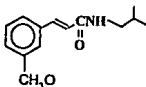
N-metil-2-clorocinamamida [4]



N-propil-2-clorocinamamida [5]

Otro tipo de respuesta farmacológica inducida por estas amidas es el de relajante muscular, las halosustituidas en posición meta como la N-butil-3-bromocinamamida y la N-ciclopropil-3-fluorocinamamida, derivados de productos naturales la presentan (Grivsky, 1983).

En 1987 Michael Elliott inició el estudio de relación estructura-actividad insecticida de algunas N-Isobutilamidas aisladas de Piperaceas, demostro que estos compuestos naturales que tienen una considerable actividad biológica poseen una doble ligadura conjugada con el grupo amida y que algunas de estas amidas presentan más de un doble enlace. La estereoquímica del doble enlace juega un factor importante ya que todos los compuestos biológicamente activos presentaron la configuración E, mientras que aquellos en los que la estereoquímica fué cambiada a Z disminuyó la actividad. Además encontró que los halosustituyentes en el anillo aromático le confieren a la amida la mayor actividad que la obtenida con otro tipo de sustituyentes sintéticos, sin embargo ésta no llega a ser más potente que la molécula natural que no tiene sustituyente. En el caso de la monohalogenación, la posición *orto* es la menos favorable para la actividad, anulando completamente la actividad, en cuanto a la posición *meta* la actividad decrece conforme se incrementa el tamaño del halógeno, mientras tanto la posición en *para* favorece la actividad en grado aceptable. Posteriormente los halógenos los sustituyó por metilos, sin que estos aportaran grandes cambios en la actividad, solamente la posición orto sustituida disminuyó la actividad de los compuestos metoxilados en las tres posiciones de la N-isobutilcinamamidas presentó actividad, fue el 3-Metoxi [6] (Elliott, et al., 1987).



3-Metoxi N-Isobutilcinamamida [6]

3.2. ALELOQUIMICOS.

La agricultura moderna se encuentra en un período de transición hacia un peligro ambiental de agroquímicos y con esfuerzos para reducir la erosión. Este es un tiempo ideal para explotar la aleopatía como una alternativa para mejorar la productividad agrícola y sustituir a los herbicidas sintéticos; para ello se necesitan efectuar modificaciones genéticas en las plantas generadoras de metabolitos secundarios.

La comercialización de aleloquímicos requerirá de serios esfuerzos para aislar y caracterizar la actividad biológica de muchos productos naturales. Algunos aleloquímicos quizá se modifiquen y desarrollen para herbicidas. Esto ya ha sido demostrado con la entrada de productos naturales basado en cinmetilina y metoxifenona dentro del mercado herbicida. (Rice, 1987).

Los productos naturales identificados como agentes alelopatóxicos han sido divididos como:

- a) hidrocarburos, b) ácidos orgánicos y aldehídos, c) lactonas insaturadas, d) cumarinas, e) quinonas, f) flavonoides, g) taninos, h) alcaloides, i) terpenoides y esteroides, j) fenoles y k) sustancias desconocidas.

Aunque muchos de estos compuestos son metabolitos secundarios de la planta, algunos son productos de degradación de esta (Putnam, 1985).

Chung-Shih Tang y Chin-Chung de la universidad de Hawaii en 1982 desarrollaron un método para obtener las sustancias químicas de las raíces de las plantas, éstas son absorbidas en una resina, la solución del nutriente es circulada selectivamente y la resina absorbe las toxinas mientras permite que los nutrientes esenciales pasen (Tang, et al., 1982).

El aislamiento de un compuesto involucra recolección de la planta y extracción con apropiados disolventes como alcoholes, agua, la extracción con agua simula la liberación natural de los compuestos por acción de la lluvia. Las separaciones químicas son acompañadas por las propiedades de las sustancias tales como la polaridad, tamaño de la molécula, carga o características de adsorptividad, varios métodos cromatográficos son usados en las separaciones como son: cromatografía en columna, capa fina, gas-líquido y alta presión (Putnam, 1983).

Muchas sustancias químicas no aparecen siempre en la planta sino que se presentan en forma esporádica. El metabolismo primario produce proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, los cuales son importantes en el metabolismo de las células, los metabolitos secundarios pueden ser clasificadas dentro de 5 grupos (Figura 1) aunque con algunas

excepciones como son: fenilpropanos acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides (Whittaker & Feeny, 1971).

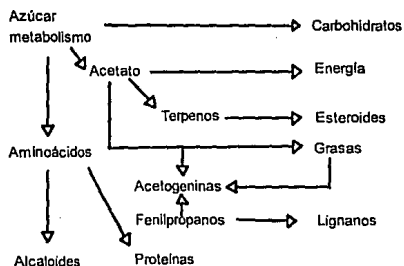


Figura 1. Relación metabólica de los principales grupos de metabolitos secundarios en el metabolismo primario.

El ácido cinámico y las sustancias volátiles de fenilpropanos contribuyen con las características de olor y sabor de muchas especies tales como el (cinamaldehído). Los alcaloides que se encuentran en las plantas especializadas son con frecuencia cadenas largas que contienen nitrógeno.

De acuerdo a Whittaker y Feeny muchos aleloquímicos son metabolitos secundarios derivados biosintetizados del metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos.

Muchos investigadores han utilizado el efecto inhibitorio de la germinación y el crecimiento, para estudiar a los aleloquímicos, estos compuestos alteran una gran variedad de procesos fisiológicos. Einhellig, et al., encontraron que la escopolina afecta la fotosíntesis en el tabaco, la cual contribuye con la inhibición del crecimiento.

Un número de aleloquímicos alteran la respiración como son: ácidos cinámicos, alcoholes, cumarinas, aldehídos, ácidos benzoicos y quinonas; generalmente las sustancias que inhiben el crecimiento alteran la respiración, como inhibidores o estimuladores del consumo de oxígeno desacoplado, y algunos no afectan a concentraciones de 5×10^{-3} ó 10^{-3} M, las quinonas estimulan la respiración.

Del género *Zanthoxylum* se tienen muchos antecedentes fitoquímicos, en los que se describen una gran variedad de metabolitos secundarios que se biosintetizan tales como:

alcaloides, esteroides, lignanos, amidas ácidas insaturadas, fenilpropanoides, monoterpenos, triterpenos, y sesquiterpenos. De la corteza del colopahitle *Z. Liebmannianum* se tiene un reporte previo en el que se aislaron; un lignano (sesamina), un esteroide (β -sitosterol), un sesquiterpeno (1- β hidroxijunonol) y una isobutilamida (α -sanshöl) (Navarrete, et al., 1987).

3.3. HERBICIDAS.

Los herbicidas son compuestos químicos que exterminan malezas, las cuales crecen en lugares no deseados por el hombre, pues reducen la producción y calidad de las plantas porque compiten por la disponibilidad de luz solar, agua y nutrientes del suelo (Lotina, 1989).

Los sitios primarios de acción de los herbicidas orgánicos pueden ser cualquier enzima en una vía metabólica o una proteína que regula la actividad. Muchos de estos sitios de ataque de los herbicidas en las malezas son desconocidos a nivel molecular. Los sitios de ataque mejor conocidos son la fotosíntesis, la formación de microtubulos y la biosíntesis de carotenos.

Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis son los más estudiados por diferentes razones, una de ellas es por su baja toxicidad en mamíferos. El 50% de los herbicidas comerciales actúan inhibiendo este proceso. El mecanismo de acción de los herbicidas se refiere a la interferencia bioquímica primaria o interferencia biofísica impuesto por un herbicida que permite la letalidad (Audus, 1979).

3.4. CLASIFICACION DE LOS INHIBIDORES DE LA FOTOSINTESIS.

Los herbicidas que inhiben las reacciones fotoquímicas de los cloroplastos han sido rutinariamente llamados inhibidores de la reacción de Hill. (Este es definido como el desprendimiento de oxígeno por una suspensión de cloroplastos que es iluminado en presencia de un aceptor de electrones artificial o natural) (Moreland, 1980). Clasifica a los herbicidas que afectan a la fotosíntesis como:

a) Inhibidores del transporte de electrones: Es inhibido cuando uno o más de los intermediarios del transporte de electrones acarreadores son removidos o inactivados. Estos compuestos inhiben el transporte de electrones en presencia y ausencia de ADP y fosfato o en presencia de NH_4Cl como desacoplante, así como la síntesis de ATP al afectar a uno o más intermediarios de la cadena fotosintética.

b) Desacoplantes: Estos compuestos disocian el transporte de electrones y síntesis de ATP por disipación del estado energizado de la membrana tilacoidal. Estos compuestos estimulan el transporte de electrones basal, acoplado, inhibiendo la síntesis de ATP y captación de protones, sin afectar el transporte de electrones desacoplado.

c) Inhibidores de la transferencia de energía: Estos compuestos actúan directamente en la fotofosforilación, ellos inhiben el transporte de electrones fosforilante y la formación del ATP en sistemas acoplados, sin efecto sobre el transporte de electrones basal, desacoplado y la captación de protones.

d) Desacoplantes-Inhibidores: Estos compuestos estimulan el flujo de electrones basal y fosforilante, e inhiben la síntesis de ATP y captación de protones, simultáneamente empiezan a inhibir el flujo de electrones desacoplado.

e) Aceptores de electrones: Estos compuestos compiten con cofactores de las enzimas redox responsables del flujo de electrones y que tienen un potencial de reducción adecuado que le permite hacer pareja redox con la enzima donde acepta los electrones (Moreland, 1980).

3.5. CORRELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

Un gran número de herbicidas comerciales que afectan la fotosíntesis son inhibidores del fotosistema II. Algunas familias químicas de herbicidas inhiben el transporte de electrones (Trebst & Draber, 1978). Los objetivos de estudios realizados anteriormente son:

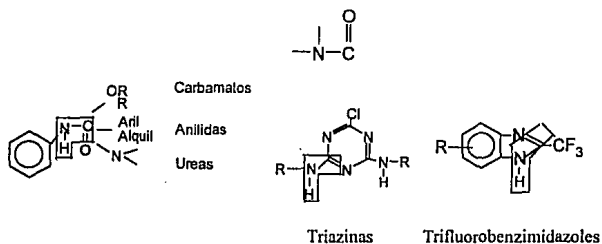
a) Identificar sustituyentes que requieran la máxima efectividad inhibitoria.

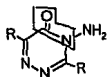
b) Las propiedades físicas y químicas de los herbicidas en la acción inhibitoria.

- c) Determinar el ambiente en el cual operan los inhibidores.
- d) Identificar interacciones entre los sustituyentes de los inhibidores.

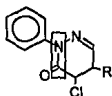
La potencia inhibitoria de los herbicidas se puede correlacionar con valores de I_{50} , esto se obtiene directamente de concentraciones inhibitorias de los compuestos. Estos deberán poseer propiedades de penetración en el sitio activo, configuración espacial precisa para complementar la arquitectura molecular del centro activo y bloquear la reacción, las propiedades que son importantes incluyen características de partición (hidrofílico/lipofílico), relaciones estéricas, resonancia, tautomerización ceto-enol, relación cis y trans en relación al hidrógeno de la amida y el oxígeno del carbonilo y la posición de una carga de los sustituyentes los cuales participan en interacciones intermoleculares en los centros activos. Una característica de los inhibidores es la reversibilidad de su acción, muchos pueden restaurar el transporte de electrones, esta reversibilidad indica que enlaces débiles involucrados en la interacción entre los inhibidores y los componentes reactivos del transporte de electrones (Moreland, 1980).

El estudio de enlaces hidrógeno fue postulado por Hansch en 1969 el observó que para acilanilidas, uracilo, benzimidazoles, imidazoles y triazinas el enlace es N-H, el cual está unido a una deficiencia de electrones sp^2 del átomo de carbono, el enlace de los inhibidores se visualiza que ocurre entre el par de electrones libre del nitrógeno del herbicida y la deficiencia de electrones del grupo carbonilo de la amida, para herbicidas que poseen anillos heterociclicos, pero carecen de una amida libre de hidrógeno como triazinonas, pirrolidonas, piridazinonas, pirazolonas, triazilonas y oxadiazolinonas (Figura 2) en el anillo heterociclico el elemento común es:

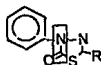




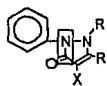
Amino - triazinonas



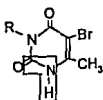
Piridazinonas



Tiadiazolonas



Pirazolonas



Uracilos



Pirimidinonas

Figura 2. Estructura de familias herbicidas, inhibiendo el transporte de electrones en el sitio aceptor del fotosistema II. Un elemento común esencial para la inhibición es indicado en la fórmula.

3.6. PARAMETROS DE LOS SUSTITUYENTES.

El análisis de regresión múltiple (ahora referido a la relación del análisis cuantitativo estructura-actividad ó QSAR) es utilizado en la interpretación de los resultados obtenidos en los estudios de estructura-actividad con inhibidores del transporte de electrones, principalmente utilizado por Hansch & Deusch, 1966 en fenilurca y derivados de acilanilida, los cambios en la actividad biológica pueden estar correlacionados con las moléculas o parámetros de los sustituyentes esto se basa en la energía libre, la cual considera la interacción química con el sistema biológico, esta puede ser representada como:

$$R \equiv \Delta G^h + \Delta G^e + \Delta G^s$$

R=Respuesta biológica medida es el resultado de la suma de las contribuciones independientes.

ΔG^h =Hidrofóbico

ΔG^e =Electrónico

ΔG^s =Estérico

Las contribuciones hidrofóbicas, electrónicas y estéricas son expresados como medidas de los parámetros de los sustituyentes tales como σ , π y E_s , respectivamente. El análisis involucra ecuaciones del siguiente tipo: (Moreland, 1980).

$$p_{150} = a\pi + b\sigma + cE_s + d$$

Donde:

π = Es el coeficiente de partición obtenido generalmente en octanol/agua.

σ = Es el coeficiente de Hammett.

E_s = Es el factor estérico de Taft.

a, b, c, d son constantes.

Una relación lineal entre constantes de los sustituyentes y el logaritmo del inverso de la actividad de los compuestos se puede usar para correlacionar la actividad biológica con la estructura molecular. Para poder aplicar este método a los datos biológicos se requieren de tres requisitos básicos (Purcell, et al., 1971) como son:

- 1) La serie de moléculas en estudio deberán ser similares para incrementar la probabilidad de que tengan el mismo mecanismo de acción
- 2) Los datos de actividad biológica deben ser precisos, cuantitativos y medidos bajo las mismas condiciones para toda la serie.
- 3) Las contribuciones del grupo deberán ser intrínsecamente aditivas para elegir los parámetros.

3.6.1. Parámetros Hidrofóbicos.

Meyer y Overton mostraron en 1895 que la actividad narcótica de muchos compuestos orgánicos es paralelo a su coeficiente de partición (P) aceite/agua, iniciando el uso de tales medidas como un medio para definir lipoficidad (ahora llamada hidrofobicidad) de compuestos orgánicos biológicamente activos. En los años 50 Collander generó un nuevo interés en los coeficientes de partición aceite/agua al demostrar que la velocidad de penetración de una gran variedad de compuestos orgánicos en la membrana de las células de las plantas, estaba relacionado con sus coeficientes de partición (Collander, 1951).

Se han usado varios pares de disolventes (siempre el agua ha sido uno de ellos) y aunque ahora se use octanol/agua, no significa que sea el ideal (Hansch & Leo, 1979).

Los valores de log P se obtienen analizando una de las 2 fases. El log P es una definición operacional de la hidrofobicidad de una molécula, frecuentemente se trabaja con un grupo de

derivados de un compuesto en el cual una gran porción de la estructura permanece constante. En este caso conocer la hidrofobicidad de los sustituyentes puede ser suficiente para hacer una correlación (Hansch, 1965; Purcell, et al., 1970; Delaney, et al., 1969; Currie, et al., 1970).

El coeficiente de partición es obtenido de la siguiente ecuación:

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H$$

P_H = Es el coeficiente de partición del compuesto no sustituido.

P_X = Es el coeficiente de partición del derivado.

π = Es el logaritmo del coeficiente de partición del sustituyente x.

3.6.2. Parámetros Electrónicos.

Los efectos electrónicos de los sustituyentes en la ionización del ácido benzoico son usados como modelo para el efecto de sustituyentes sobre otros centros de reacción unidos a sistemas aromáticos. Hammett parametrizó estos efectos, los representó con la letra sigma (σ), y definió el parámetro como sigue:

$$\sigma = \log K_X - \log K_H$$

En donde K_H es la constante de ionización para el ácido benzoico en agua a 25°C y K_X es la constante de ionización para un derivado meta ó para bajo las mismas condiciones experimentales.

El valor de la constante sigma depende de la posición del sustituyente dado, en la posición meta (σ_m) es diferente a la de el mismo sustituyente en la posición para (σ_p).

Valores positivos de σ indican que el sustituyente atrae electrones del anillo aromático y valores negativos de σ indican una donación de electrones del sustituyente hacia el anillo aromático (Purcell, 1970).

3.6.3. Parámetros Estéricos.

Las primeras publicaciones acerca de la cuantificación de los efectos estéricos de sustituyentes sobre la velocidad en reacciones orgánicas fueron realizadas por Meyer en 1895. El postuló que el peso atómico de los sustituyentes orto determinaban la facilidad de esterificación de ácidos aromáticos orto sustituidos (Hansch & Leo, 1979).

3.7. FOTOSÍNTESIS.

La fotosíntesis es la conversión de la energía luminosa a energía química por las plantas y consta de 2 fases. La primera involucra la captura de la energía luminosa y su transducción a energía química (ATP) y equivalentes reducidos (reduce la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato; NADP), estos procesos son reacciones luminosas (Stryer, 1990).

La segunda el ATP y NADP reducidos son consumidos en la reducción del dióxido de carbono a azúcares por asimilación del ciclo del carbono en las reacciones oscuras.

La fotosíntesis en las plantas verdes tiene lugar en los cloroplastos, orgánulos que tienen normalmente una longitud de 5µm, constan de una membrana externa y una membrana interna separadas por un espacio intermembranal (figura 3 y 3.1). La membrana externa rodea al estroma que contiene las enzimas solubles y unas estructuras membranosas llamadas tilacoides que son sacos aplanados. Una pila de estos sacos constituye un granum. Las diferentes grana están conectadas por regiones membranosas llamadas lamelas del estroma. Así pues los cloroplastos tienen tres membranas diferentes (externa, interna y tilacoidal) y tres compartimentos separados (intermembranal, estroma y espacio tilacoidal) (Stryer, 1990).

Las membranas tilacoidales contienen la maquinaria transductora de energía y los pigmentos captadores de luz, los centros de reacción, las cadenas de transporte electrónico y la ATP sintasa, estructuralmente son proteínas responsables de estas actividades.

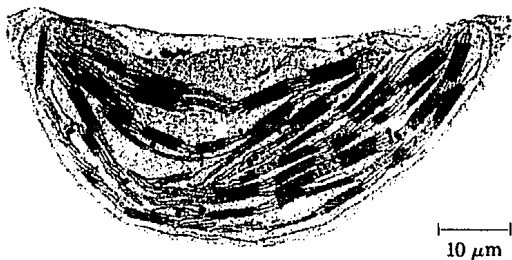


Figura 3. Representación externa de un cloroplasto.

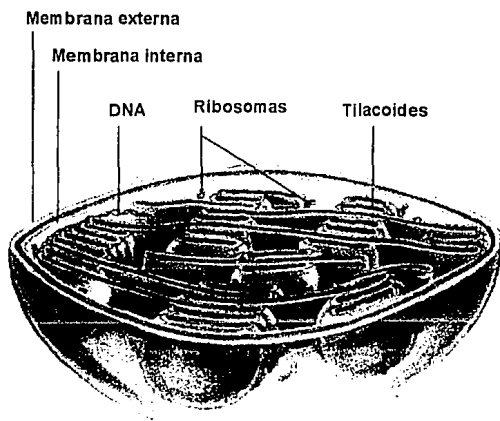


Figura 3.1. Representación del interior de un cloroplasto.

3.7.1. Pigmentos Fotosintéticos.

Dentro de las células fotosintéticas se reconocen tres clases de pigmentos fotosintéticos: clorofilas, carotenoides y ficobilinas.

La clorofila **a**, es una porfirina cuyos átomos de nitrógeno centrales se coordinan con un ion Mg^{+2} . A esta se adiciona una larga cadena lateral de fitol (Stryer, 1990).

La clorofila **b** difiere de la clorofila **a** en que tiene un grupo formilo en lugar de un grupo metilo en uno de sus pirroles.

Las ficobilinas son los pigmentos que se encuentran en las algas y contienen un tetrapirrol abierto como cromoforo unido a las apoproteínas (Govindjee & Govindjee, 1974).

3.7.2. Fotosistema I y II.

La clorofila **a** de las plantas son los principales pigmentos de los sistemas reactivos de la luz conocidos como **fotosistema I** el centro de reacción es $P700$ y en el **fotosistema II** el centro de reacción es $P680$.

En el "esquema **Z**" se muestra el transporte de electrones no-cíclico en las plantas verdes indicando la ruta tomada por los electrones para la oxidación del agua a la reducción de NADP, el esquema muestra que los dos fotosistemas están en serie (Figura 4).

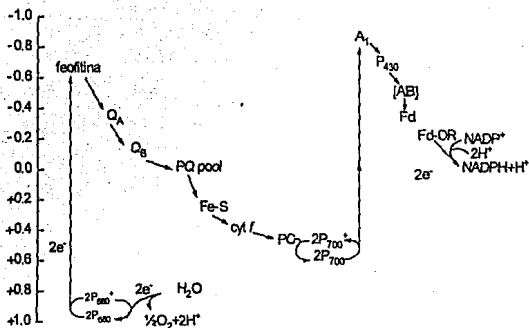


Figura 4. Esquema Z del transporte de electrones en la fotosíntesis. La feofitina es un derivado de la clorofila que carece de magnesio central; Q_A ; Q_B y la plastoquinona (PQ) son quinonas. De PQ los electrones se transfieren a un complejo que contiene citocromo *f*, citocromo *b563* y una proteína Fe-S. La plastocianina (PC), es una proteína que tiene cobre en su sitio activo. A_1 es una clorofila que se une débilmente a $P700$, mientras que las proteínas $P430$, A y B ([AB]) y la ferredoxina (Fd) tienen Fe-S en su sitio activo. Esta última reduce al $NADP^+$ del estroma en una reacción catalizada por la ferredoxina: $NADP^+$ oxidoreductasa.

Las reacciones de transporte de electrones en la cadena oxidorreductora o reacción de Hill son dependientes de luz y forman parte de la fotosíntesis, éstas pueden medirse de diferentes formas, ya sea cuantificando la reducción o la disminución del estado oxidado de los aceptores artificiales por métodos espectrofotométricos o midiendo los cambios de concentración de oxígeno que se desprende en el sistema al fotolizarse el agua. En sistemas en los cuales la medición no se puede efectuar de esta forma, como en el flujo cíclico de electrones, se mide la velocidad de síntesis de ATP asociada al transporte de electrones. La importancia del uso de aceptores, donadores e inhibidores del flujo de electrones radica en poder separar funcionalmente tramos de la cadena, así en el fotosistema II (FS-II) los electrones fluyen del

agua hasta Q o PQ en presencia de inhibidores que actúan en estos sitios, el flujo de electrones en el fotosistema I (FS-I) se separa inhibiendo el FS-II en PQ con DCMU o en Q con DBMIB (Lotina, et al., 1989).

3.8 SINTESIS DE N-ISOBUTILCINAMAMIDAS.

3.8.1. Formación de los ácidos α,β -insaturados.

La ruta sintética que se empleó es la denominada modificación de Doebner, la cual ocurre entre un aldehído alifático o aromático y ácido malónico. Esta reacción se caracteriza por el efecto activante de los dos grupos carboxílicos sobre el átomo de carbono alfa, el cual favorece la formación de un carbanión al separar un hidrógeno alfa con una base como piperidina. Una vez formado el carbanión se adiciona nucleofílicamente al grupo carbonilo del aldehído (Vogel, 1989).

Los compuestos con metilenos activos producen reacciones de condensación con aldehídos y cetonas, esta se conoce como condensación de Knoevenagel y son catalizadas por bases muy débiles. Se llevan a cabo con ácido malónico por lo general la descarboxilación es espontánea.

3.8.2. Formación de la N-Isobutilcinamamida.

Una amida es un compuesto que posee en su estructura un nitrógeno trivalente unido a un grupo carbonilo, las amidas que tienen un sustituyente en el nitrógeno o ninguno, son capaces de formar puentes de hidrógeno con interacciones fuertes entre sí, lo que les confiere altos puntos de fusión (Zabicky, 1970).

Estos compuestos pueden prepararse en muy diversas formas a partir de cloruros de ácido, anhídridos de ácido, ésteres, ácidos carboxílicos y carboxilatos; estos métodos implican reacciones de sustitución nucleofílica con amoníaco o una amina en un carbono acílico. Entre los derivados de los ácidos carboxílicos más reactivos, están los halogenuros de ácido y los anhídridos. Esto es debido a que los halogenuros y los carboxilatos son buenos grupos salientes, ambos son aniones relativamente estables de manera que normalmente no hace falta catalizador para que tenga lugar la reacción (Solomons, 1981).

Las aminas primarias, secundarias y el amoníaco reaccionan rápidamente con cloruros de ácido para formar amidas, con respecto a las amidas terciarias, también reaccionan por

sustitución nucleofílica, sin embargo, el ion amonio acílico que se forma no es estable en presencia de agua o de cualquier disolvente hidroxílico.

Los cloruro de acilo se preparan normalmente a partir de ácidos carboxílicos mediante la sustitución del grupo hidroxilo por cloruro, los reactivos normalmente utilizados para la reacción son el cloruro de tionilo o los halogenuros de fósforo, PCl_3 o PCl_5 . El cloruro de tionilo es menos reactivo que los halogenuros de fósforo, pero es el reactivo más utilizado, debido a que puede actuar en la preparación de cloruros de acilo como disolvente y como reactivo. Normalmente se adiciona el ácido carboxílico sobre un exceso de cloruro de tionilo, se deja hasta el fin de la evolución de los productos gaseosos (SO_2 y HCl) y se elimina entonces por destilación el exceso de reactivo. De acuerdo al derivado de amida que se quiera sintetizar es el tipo de halogenuro de ácido que se emplea, en el caso de las amidas insaturadas, antes de formar el halogenuro de ácido se tiene que preparar el ácido insaturado, si éste no se tiene como reactivo comercial (Pine, et al., 1984).

4. JUSTIFICACION DEL TEMA.

Uno de los elementos más importantes de la flora mexicana lo constituye el género *Zanthoxylum* por las interesantes actividades biológicas que presentan algunos metabolitos secundarios aislados de ciertas especies de éste.

Desde el punto de vista farmacológico el interés en estas plantas radica principalmente en su actividad amebicida y antihelmíntica (Reyes, et al., 1987).

Los metabolitos bioactivos aislados de estas plantas son N-Isobutilcinamamidas de tipo alifático y/o aromático. A la fecha no se conocen para que la planta sintetiza estos compuestos.

En el presente trabajo se sintetizó N-Isobutilcinamamida y una serie de derivados relacionados estructuralmente con este, bioactivas aisladas del género *Zanthoxylum*, se planteó el estudio de su efecto en la fotosíntesis con el objeto de establecer como afectan a la fotosíntesis y tratar de dilucidar que parte de la estructura es importante para la actividad y contribuir a entender el porque son biosintetizadas en el *Zanthoxylum* y posteriormente caracterizarlas como herbicidas.

Los derivados a sintetizar son moléculas sencillas que no se han sometido anteriormente a estudios de actividad herbicida, hasta la fecha se desconocen estudios sistemáticos de la relación existente entre la estructura y la actividad herbicida de N-isobutilcinamamidas por lo que se estudió la relación que guarda el grado de actividad presentada por los compuestos sintetizados con el número y la naturaleza de los sustituyentes presentes en el anillo aromático con el objeto de sintetizar nuevos compuestos con una mayor actividad.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Sintetizar y caracterizar una serie de derivados relacionados estructuralmente con N-Isobutilcinamamidas de origen natural y el estudio de su efecto en la fotosíntesis.

Objetivos particulares:

Sintetizar y caracterizar espectroscópicamente N-Isobutilcinamamida y su diferente sustituyente como son: 3,4-Metilendioxi, 3-Fluor, 3-Metoxi, 4-Metoxi, 4-Bromo, 3-Bromo, 4-Metil, 4-Cloro, 3-Cloro, 4-Nitro, 3-Nitro, 2-Nitro.

Estudiar el efecto de los compuestos sintetizados en las diferentes actividades de la fotosíntesis: (Transporte de electrones basal, Fosforilante, Desacoplado, Síntesis de ATP y Captación de Protones), para tratar de dilucidar el mecanismo de acción en la fotosíntesis.

Determinar al Inhibidor de la reacción de Hill más activo y localizar su sitio de inhibición, efectuando reacciones parciales de la cadena redox.

6. HIPOTESIS.

Si la N-Isobutilcinamamida inhibe la fotosíntesis, los diferentes sustituyentes afectarán las actividades de la fotosíntesis en diferente grado, lo cual permitirá la correlación de estructura-actividad y deducir que parte de la estructura es importante en la acción inhibitoria.

7. MATERIAL Y METODO DE LA SINTESIS ORGANICA.

7.1. Material, reactivos y equipo.

7.1.1. Equipo:

Aparato de Fisher Johns para punto de fusión.

Balanza analítica.

Balanza granataria.

Espectrofótopmetro de infrarrojo Perkin Elmer Mod. 399-B.

Espectrofótopmetro de resonancia magnética nuclear Varian EM 390-90 MHZ.

Lámpara de luz ultravioleta.

Parrilla de calentamiento.

Rotavapor.

7.1.2. Reactivos:

Acetato de etilo.

Acido clorhídrico.

Acido cinámico.

Acido 3-Bromocinámico.

Acido 4-Bromocinámico.

Acido-3-Clorocinámico.

Acido-4-Clorocinámico.

Acido 3-Fluorocinámico.

Acido 3,4-Metilendioxicinámico.

Acido-4-Metilcinámico.

Acido 3-Metoxicinámico.

Acido 4-Metoxicinámico.

Acido-2-Nitrocinámico.

Acido-3-Nitrocinámico.

Acido-4-Nitrocinámico.

Acido malónico.

Benceno seco.

Benzaldehído.

3-Bromobenzaldehído

4-Bromobenzaldehído.

3-Clorobenzaldehído.
4-Clorobenzaldehído.
3-Fluorobenzaldehído.
3,4-Metilendioxiobenzaldehído.
3-Metoxibenzaldehído.
4-Metoxibenzaldehído.
4-Metilbenzaldehído.
2-Nitrobenzaldehído.
3-Nitrobenzaldehído.
4-Nitrobenzaldehído.
Bicarbonato de sodio.
Cloruro de calcio.
Cloruro de tionilo.

Hexano.

Hielo.

Sulfato de sodio anhidrido.

Placas de sílica gel GF-254.

Papel pH.

7.1.3.Material:

Anillos de fierro de diferentes tamaños.

Adaptador de termómetro.

Barras magnéticas para agitación.

Canastilla de calentamiento.

Capilares para punto de fusión.

Cabezas de destilación.

Colector de destilación.

Embudos buchner de diferentes tamaños.

Embudos de filtración tamaño corto.

Embudos de separación.

Espátulas.

Frascos ámbar de vidrio.

Matraces erlenmeyer de 50 ml, 100 ml.

Matraces kitazato de 250 ml.

Matraces balón de 50 ml, 100 ml.

Probetas de 50 ml, 100 ml.
Pinzas de tres dedos con nuez.
Refrigerantes.
Soportes universales.
Trampas para vacío.
Termómetro.
Vasos de precipitado de 100 ml, 150 ml.
Vidrios de reloj.

7.2. Método de la síntesis orgánica.

7.2.1. Síntesis de derivados del ácido cinámico (Mundy, 1985).

En un matraz bola de 50 ml, equipado con agitación magnética, canastilla de calentamiento y refrigerante en posición de reflujo provisto de una trampa de humedad de cloruro de calcio, se agregaron 0.33 moles de aldehído aromático y 0.72 moles de ácido malónico a una mezcla de 8.2 ml de piridina y 0.22 ml de piperidina. Se calentó a reflujo con agitación continua durante 8 horas, terminado ese tiempo la mezcla de reacción se enfrió y se le adicionaron 10 ml de HCl concentrado en 30 ml de agua, en baño de hielo.

El precipitado formado se filtró al vacío en un embudo Buchner, se lavó con una solución de HCl al 10%, seguido de un lavado con abundante agua hasta pH neutro. El producto obtenido se cristalizó con una mezcla de acetato de etilo-hexano.

7.2.2. Síntesis de N-Isobutircinamamidas (Elliott, et al., 1987).

En un matraz bola de 50 ml, equipado con refrigerante y trampa de humedad de cloruro de calcio, se colocaron 5.7 mmoles del ácido cinámico correspondiente y se le agregaron 27.3 mmoles de cloruro de tionilo.

La mezcla de reacción se calentó a reflujo con agitación durante 5 horas o más. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, agregándose después 20 ml de benceno seco, el exceso de cloruro de tionilo se destiló a una temperatura no mayor de 70°C.

Una vez que dejó de destilar el cloruro de tionilo, se suspendió el calentamiento y se añadió 50 ml de benceno seco, volviéndose a destilar. Esta operación se repitió varias veces hasta que el destilado dejó de dar positiva la reacción ácida con papel indicador.

La mezcla de reacción anterior se enfrió en un baño de hielo, adicionandose 20 ml de benceno y 13 mmoles de isobutilamina con agitación magnética y trampa de humedad. La agitación se continuo por 24 horas a temperatura ambiente. Terminado este tiempo, la mezcla de reacción se filtró al vacío a sequedad en un rotavapor y el residuo formado se disolvió en acetato de etilo, se siguió la reacción por cromatografía en capa fina, las cromatoplacas realizadas se revelaron en una cámara de yodo.

La fase orgánica se lavó en un embudo de separación 3 veces con HCl al 5% y 3 veces con bicarbonato de sodio al 5% y con agua hasta pH neutro. A continuación se secó con sulfato de sodio anhidrido, el acetato de etilo se evaporó al vacío en rotavapor, el producto se cristalizó en una mezcla de acetato de etilo-hexano.

Algunos compuestos se purificarón por cromatografía en columna utilizandose 1 gramo de muestra por 30 gramos de silica gel, se eluyo con una mezcla de acetato de etilo-hexano.

Las amidas obtenidas se identificaron por medio de sus propiedades físicas y espectroscópicas. (Figura 5).

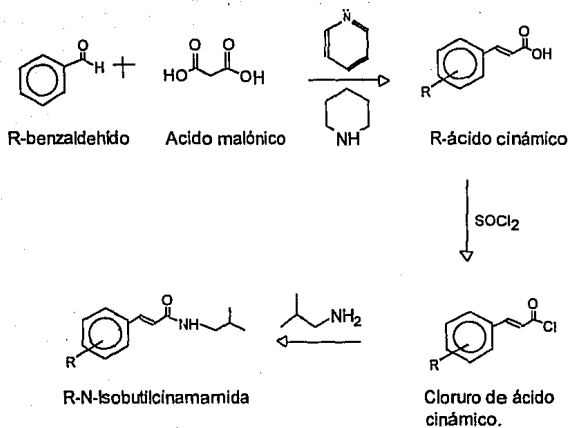


Figura 5. Síntesis de N-Isobutílcinamamidas.

8. MATERIAL Y METODO DE LA PARTE BIOQUIMICA.

8.1 Material, reactivos y equipo.

8.1.1. Equipo:

Balanza analítica.
Balanza granataria.
Centrífuga Beckman J-21.
Centrífuga clínica modelo CL.
Electrodo combinado marca Orión.
Espectrofotómetro Beckman modelo DU-650.
Licuadora Osterizer Custom modelo L-21.
Oxímetro tipo Clark.
Potenciómetro Corning modelo 12.
Registrador gráfico.
Vortex.

8.1.2. Reactivos:

Acetona.
Acido ascórbico.
Acido clorhídrico.
ADP.
3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU).
2,6 diclorofenolindofenol (DCIP).
2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona (DBMIB).
Cloruro de potasio.
Cloruro de magnesio.
Cloruro de amonio.
Difenilcarbocida (DPC).
Etanol.
Ferricianuro de potasio.
Hidróxido de sodio.
Hepes.
Hielo.

Metilviológeno.
N-Isobutil-3(3-Bromofenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(4-Bromofenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(3-Clorofenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(4-Clorofenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3-fenil-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(3-Fluorfenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(3,4-Metilendioxfenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(3-Metoxifenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(4-Metoxifenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(4-Metilfenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(2-Nitrofenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(3-Nitrofenil)-2(E)propenamida.
N-Isobutil-3(4-Nitrofenil)-2(E)propenamida.

Sacarosa.

Silico molibdato de sodio.

Sorbitol.

Tricina.

8.1.3. Material:

Barras magnéticas.

Frascos ambar de 1 lt, 2 lt.

Gradillas.

Matraces aforado de 100 ml, 1 lt, 2 lt.

Pipetas glixon de 20 p , 200 p.

Pipetas graduadas de 3 ml.

Pipetas pasteur.

Pinceles.

Puntillas.

Recipientes para agua y hielo.

Frascas.

Tubos de centrifuga.

Tubos de ensaye.

Tapa de la licuadora.

Vaso de la licuadora.

Vasos de precipitado de 10 ml, 100 ml, 2 lts.

8.1.4. Material biológico:

Hojas de espinaca

8.2 Métodos bioquímicos.

8.2.1. Aislamiento de Cloroplastos.

Se pesaron 30 g de hojas verdes y turgentes de espinaca (*Spinacia oleracea*) previamente lavadas, se eliminó la nervadura central y ápice, estos se cortaron en pequeños trozos con tijeras o navajas, se agregó en un vaso de licuadora Osterizer Custom Modelo L-21 200 ml de medio de aislamiento el cual contiene sacarosa 400mM, tricina 30mM, KCl 20mM, $MgCl_2$ 5 mM a pH 8 y homogeneizó por 5 segundos, se filtró en 8 capas de gasa, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga Beckman J-21. Se decanto el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 1-2 ml de medio de aislamiento, se guardó para la determinación de clorofila y ensayos en la fotosíntesis.

Todas las fases del aislamiento se realizaron a 4°C y protegidos de la luz (Hooper, 1984; Mills, et al., 1980).

8.2.2. Determinación de Clorofila (Arnon, 1949).

La clorofila se cuantificó de acuerdo al método de Arnon. Se tomó un alícuota de 30µl de cloroplastos, se aforó con acetona al 80%, se dejó reposar la muestra, se centrifugó en una centrifuga clínica modelo CL a velocidad máxima 2000 rpm durante 5 minutos y al sobrenadante se le determinó la absorbancia a 663nm y 645nm en un espectrofotómetro modelo DU-650 Beckman celdas de 1 cm de cuarzo. Se realizaron los cálculos con la siguiente ecuación:

$$[Chl] (A_{663} \times 8.05) + (A_{645} \times 20.29) =$$
$$[Chl] = \mu g \text{ Chl / ml}$$

8.2.3. Soluciones concentradas de los compuestos a ensayar.

Se preparó una solución de 15mM de N-Isobutlclnamamida y cada uno de los derivados a ensayar (3,4-Metilendioxi, 3-Fluor, 3-Metoxi, 4-Metoxi, 4-Bromo, 4-Metil, 3-Cloro,

4-Cloro, 3-Bromo, 2-Nitro, 3-Nitro, 4-Nitro.). Se disolvieron en una mezcla de etanol-agua. Se probaron concentraciones de 0,10,20,40,60,100 μ M.

8.2.4. Medición de la velocidad del transporte de electrones en cloroplastos.

El transporte de electrones se determinó midiendo la producción de oxígeno de la fotólisis del agua, mediante un oxímetro con electrodo tipo Clark a un voltaje fijo de 0.8V, que relaciona proporcionalmente la corriente generada en la reacción y registrada con la concentración de oxígeno producida en el medio de reacción. Como fuente de iluminación se empleó una lámpara de proyector de 250 watts (Izawa & Pan, 1978).

El haz luminoso se hace pasar a través de una lente de Izawa que contiene $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 2% para eliminar el calor, además de que sirve como filtro de radiación UV y concentra la luz.

8.2.5. Determinación de la velocidad del transporte de electrones no cíclico basal(T.E.B.).

En la cubeta de reacción, se agregaron 3 ml de medio de transporte de electrones el cual contiene sacarosa 100mM, MgCl_2 5mM, KCl 10mM, tricina 15mM, metilviológeno 50 μ M, más 60 μ g de cloroplastos y se adicionaron concentraciones por separado del compuesto de 0, 10, 20, 40, 60 y 100 μ M, después se iluminó durante 1 minuto, la señal que genera la reacción en la cubeta se detectó al ser traducido en un registrador Beckman (Trebst, 1972).

8.2.6. Velocidad del Transporte de electrones no-cíclico Fosforilante(T.E.F.).

Se realizaron de la misma manera que para el T.E.B. pero se adicionó 1mM ADP y 3mM fosfato al medio de reacción (Trebst, 1972; Mc. Carty, 1977).

8.2.7. Velocidad del transporte de electrones no cíclico desacoplado(T.E. D.).

Se realizaron de la misma manera que las determinaciones anteriores pero se adicionó 60 μ l de NH_4Cl de 250mM al medio de reacción (Trebst, 1972; Mc. Carty, 1977; Mitchell, 1977).

Controles: Se efectuaron desde el principio del experimento y posteriormente a cada compuesto caracterizado, los controles carecen de compuesto a estudiar.

Calibración: Se agregarán 3ml de medio de transporte de electrones sin metilviológeno, 60µg de cloroplastos, 10µl de $K_3Fe(CN)_6$ [0.05M], se iluminarán por 2 minutos. Se relacionó la amplitud del cambio de concentración de oxígeno con los equivalentes de electrones aceptados por el ferricianuro de potasio y la amplitud de cambios de concentración de oxígeno del problema que se esta estudiando (Trebst, 1972).

8.2.8. Síntesis de ATP.

Se evaluaron los cambios de pH en la mezcla de reacción producidos por la luz, se utilizó un potenciómetro Corning Modelo 12 de escala expandida al cual se conectó a un registrador gráfico y un electrodo combinado marca Orión. En contacto con 3ml de medio captación de protones que contiene sorbitol 100mM, $MgCl_2$ 5mM, KCl 100mM, tricina 1mM, 50µM metilviológeno y concentraciones crecientes del compuesto ensayado. El cambio de pH se controló al adicionar al medio de reacción una cantidad conocida de solución estandar de KOH.

Se agregarón a la cubeta 3ml de medio bomba, 30µl de ADP y fosfato a pH 8 se llevarón acabo las determinaciones al iluminar los cloroplastos (Dilley, 1972; Boyer, et al., 1977).

8.2.9. Captación de protones.

Se realizó de manera similar que el paso anterior, pero no se le adicionó ADP y fosfato al medio de reacción (Dilley, 1972).

8.2.10. REACCIONES PARCIALES.

Se realizaron con el equipo de transporte de electrones y el mismo medio el cual contiene sorbitol 100mM, $MgCl_2$ 5mM, KCl 10mM, Hepes 15mM, NH_4Cl 3mM. Para cuantificar la eficiencia del transporte de electrones en cada fotosistema por separado se adicionaron al medio de reacción; donadores, aceptores e inhibidores artificiales para cada uno (Hauska, 1977).

8.2.11. FOTOSISTEMA I: A 3ml del medio de reacción que contiene 10µM de 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) como inhibidor de fotosistema II, 100µM de 2,6-

diclorofenol indofenol (DCIP) y 300 μ M de ácido ascórbico como donadores de electrones y 50 μ M de metilviológeno como aceptor de electrones y lo equivalente en μ l a 60 μ g de cloroplastos se iluminó durante 1 minuto, se tituló con 10 μ l de ferricianuro de potasio 40mM (Izawa, 1977; Hauska, 1977).

8.2.12. FOTOSISTEMA II. Se determinó en 3ml de medio de transporte de electrones, con la adición de 1 μ M 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona (DBMIB) como inhibidor, 300 μ M de ferricianuro de potasio como aceptor de electrones y 50 μ M de 2,6-diclorofenol indofenol (DCIP) como donador de electrones y lo equivalente en μ l a 60 μ g cloroplastos, se iluminó durante 1 minuto, midiendo un cambio de concentración de oxígeno se tituló con 10 μ l de ferricianuro de potasio 40mM. La concentración DCIP reducido también se determinó con la ecuación de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de extinción. (Izawa, 1977; Trebst & Reimer, 1976).

8.2.13. Reacción parcial de $H_2O \rightarrow SiMo$.

Se determinó en el mismo medio del fotosistema II con la adición de 200 μ M de SilicoMolibdato y 10 μ M de DCMU (Giaquinta & Dilley, 1975).

8.2.14. Reacción parcial de $DPC \rightarrow DCIP$.

Se obtuvieron cloroplastos inhibidos con medio tris 0.8M pH 8, se tomó 1ml de medio por cada 300 μ g de cloroplastos, se incubó 30 minutos a 0°C con agitación, se centrifugo, resuspendio y determinó clorofila, se tomó lo equivalente a 60 μ g, se ensayó la actividad en el medio para reacciones parciales, agregando como donador 200 μ M DPC y como aceptor de electrones se utilizo 100 μ M de DCPIP, se adiciono 3ml de este medio a una celda del espectro y lo equivalente en μ l a 60 μ g de cloroplastos, agitar y leer la absorbancia a 600nm, despues iluminar, leer a 600nm, la concentración de DCPIP reducido se determino con la ecuación de Lambert-Beer (Yamishita & Warren, 1968; Izawa & Good, 1972; Trebst, 1972; Izawa, 1977).

8.2.15. Reacción Parcial de $\text{TMPQH}_2 \rightarrow \text{MV}$.

Se determinó en 3ml de medio de transporte de electrones con la adición de $10\mu\text{M}$ de DCMU como inhibidor, $250\mu\text{M}$ de TMQH_2 como donador de electrones, $50\mu\text{M}$ de MV como aceptor y μl equivalente a $60\mu\text{g}$ de cloroplastos (Izawa, 1977).

8.2.16. Reacción Parcial de $\text{PMS} \rightarrow \text{MV}$.

Se obtuvieron cloroplastos inhibidos con 30mM de KCN incubados con 1 ml de medio de transporte de electrones y $300\mu\text{g}$ de cloroplastos, en la obscuridad 30 minutos a 0°C con agitación, se centrifugó, resuspendió y midió clorofila. Se ensayó la actividad en el mismo adicionando al medio de reacción $50\mu\text{M}$ de metilviológeno, $300\mu\text{M}$ de ácido ascórbico, 200mM de PMS y lo equivalente a μl en $60\mu\text{g}$ de cloroplastos (Trebst, 1972).

8.2.17. Obtención del Coeficiente Partición.

En un embudo de separación de 50ml se agregó 5ml de H_2O , 5ml de octanol y $5\mu\text{l}$ de solución del compuesto de concentración 15mM del compuesto, se agitó durante 5 minutos, se vació en un tubo y centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos, se separó las dos fases y leyó en el espectrofotómetro en UV, después se utilizó la ley de Lamber-Beer para conocer la concentración en cada una de las 2 fases (Puercell, et. al., 1971; Currie, et. al., 1966).

8.2.18. Obtención del coeficiente de extinción.

Se realizaron curvas estandar de cada uno de los compuestos a ensayar a diferentes concentraciones de $6\mu\text{M}$, $12\mu\text{M}$, $15\mu\text{M}$, $18\mu\text{M}$, $24\mu\text{M}$ se leyeron al espectrofotómetro a la longitud de onda en el cual se obtiene el máximo de absorción, después se procedió a trazar una gráfica de concentración contra absorbancia y a realizar la regresión lineal para obtener la pendiente de la recta, la cual, es el valor del coeficiente de extinción de cada uno de los compuestos (Castellan, 1988).

9. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

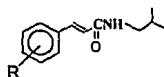
9.1 Síntesis de derivados de N-Isobutilcinamamidas.

Para la síntesis de los derivados de N-Isobutilcinamamidas primero se obtuvo el ácido cinámico con su sustituyente respectivo, mediante la reacción de condensación de Knoevenagel. Para la obtención del derivado cloruro de ácido cinámico correspondiente se utilizó SOCl_2 en presencia del ácido cinámico a reflujo durante 8 horas y destilación para eliminar el exceso de SOCl_2 al cual se le incorporó N-Isobutilamina. Esta reacción es muy violenta por ello se recomienda que la amina se agregue poco a poco y colocar la mezcla de reacción en un baño de hielo. Los compuestos se analizaron por cromatografía en capa fina y revelaron con yodo, algunos presentaban en el punto de aplicación una coloración café oscuro, estos se purificaron por cromatografía en columna, y los compuestos restantes por cristalización, obteniéndose rendimientos del 68% al 85%. A los compuestos obtenidos se le determinó el punto de fusión, después se determinaron sus espectros de infrarrojo, RMN, U.V. Con los datos obtenidos se propusieron las estructuras respectivas.

En la tabla 1 se presentan los puntos de fusión de cada compuesto sintetizado así como el rendimiento obtenido, el peso molecular estimado y los máximos de absorción en los espectros de UV.

En la tabla 2 se indican las bandas principales de los espectros de IR.

Tabla 1. Las principales características analíticas de los derivados de N-Isobutilcinamamidas.



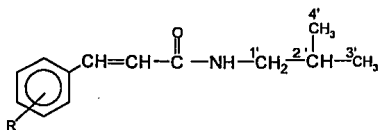
N-ISOBUTILCINAMAMIDAS

R	Peso Molecular (g/mol)	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C).	Ultravioleta (nm).
3-F	221	78	94-95	266
4-CH ₃	218	78	116	276
H	203	83	113	268
3-Br	282	81	108-109	268
3-NO ₃	248	68	119-120	261
3,4-OCH ₂	247	76	116-117	328
3-Cl	237	81	112-113	268
4-OCH ₃	233	85	110-111	288
4-Br	282	79	154-155	275
2-NO ₂	193	71	129-130	254
4-Cl	237	80	142-143	373
3-OCH ₃	233	85	73-74	272
4-NO ₂	248	73	153-154	309

Tabla 2. Principales bandas de los espectros de infrarrojo.

Grupo Funcional	Frecuencia ν
NH	3220-3300
C-H (Insaturado)	3020-3080
C-H (Saturado)	2915-2960
aromático	1600-1624
-CONH	1530-1564
C=O	1640-1654
-CH=CH- (Trans)	955-990
Sustitución orto	740
Sustitución meta	655-800
sustitución para	816-825

Los espectros de RMN se observan en el apéndice al final de este trabajo. Las principales señales se mencionan a continuación:



- a) Un doblete ($J=Hz$) entre 0.9-1.0 ppm, correspondiente a los metilos de la cadena isobutilica (C_3' y C_4').
- b) La señal múltiple (hepteto), que aparece aproximadamente en 1.9 ppm que corresponde al metino del isobutilo (C_2').
- c) El (dd) que aparece en forma de triplete aproximadamente 3.2 ppm, corresponde al metileno (C_1') del isobutilo. Esta banda se transformó en un doblete ($J=6 Hz$) al adicionarle D_2O debido a la sustitución del hidrógeno del nitrógeno por deuterio.
- d) La señal del protón del nitrógeno aparece en un rango de 5.5. a 6.3 ppm de acuerdo al compuesto, como una señal ancha, que al adicionarle D_2O desaparece.
- e) Para el doble enlace se observa dos dobletes ($J=15 Hz$), uno aparece entre 6.2-6.5 ppm y otro entre 7.5-7.9 ppm, el valor de acoplamiento confirma la geometría E.
- f) Las señales características del anillo aromático en general aparecieron entre 6.2 a 7.5 ppm, cada compuesto presentó el patrón de sustitución característico para el anillo bencénico.
- g) Las señales de los compuestos metoxilados aparecen de 3.5 a 4.0 ppm.

9.2. Caracterización bioquímica de los derivados de N-Isobutilcinamidas en las diferentes actividades de la fotosíntesis.

Con el propósito de conocer como se comporta cada uno de los compuestos sintetizados se probó su efecto en las diferentes actividades de la fotosíntesis in vitro en cloroplastos aislados de hojas de espinaca y se determinaron las velocidades de transporte de electrones Basal, Fosforilante, Desacoplado, Síntesis de ATP y Captación de Protones.

Los valores de velocidad obtenidos se les determina el % de actividad, se traza una gráfica (Figura 6), en la que se muestra el efecto de los diferentes derivados de N-Isobutilcinamidas en la síntesis de ATP (en cloroplastos lisados intactos aislados de hojas de espinaca) a medida

que aumenta la concentración de N-Isobutilcinamamida la inhibición se incrementa. La concentración de los compuestos llega a ser hasta de 100µM, siendo las amidas con los grupos más potentes 4-Nitro, 4-Cloro, siendo el de menor efecto el 2-Nitro. El orden de inhibición de menor a mayor de acuerdo a I50 es el siguiente 2-Nitro < 4-metil < 4-Metoxi < 3-Metoxi = H < 3-Fluor < 3,4-Metilendioxi < 3-Nitro < 3-Bromo < 3-Cloro < 4-Bromo < 4-Cloro < 4-Nitro.

Los compuestos que inhiben la Síntesis de ATP de agua a metilviológico (Fotofosforilación) pueden actuar como inhibidores de la reacción de Hill o como inhibidores de la transducción de energía (Inhibidor de la H⁺ ATPasa) o como desacoplantes en el cloroplasto. Con el objeto de conocer el mecanismo de acción de las N-Isobutilcinamamidas se estudió el efecto en la captación de protones (figura 7), el orden de acuerdo a I50 se presenta a continuación 4-Metil < 3,4-Metilendioxi < 3-Fluor < 4-Metoxi < H < 3-Nitro < 4-Nitro < 2-Nitro < 4-Bromo < 3-Bromo < 3-Cloro < 3-Metoxi. Se encontró que el orden de inhibición de los derivados en la síntesis de ATP es diferente a la captación de protones.

Para continuar la caracterización de las N-Isobutilcinamamidas sobre la fotosíntesis se determinó su efecto en el flujo de transporte de electrones basal (Figura 8), ya que esta actividad fue inhibida y presenta el siguiente orden 3-Nitro=4-Bromo < 3-Fluor < 3-Metoxi < 3-Bromo < 3,4-Metilendioxi < 4-Cloro < 4-Metil < 4-Metoxi < H < 2-Nitro < 3-Cloro < 4-Nitro. Notese que el orden de inhibición de ésta actividad es diferente a las otras dos actividades mencionadas anteriormente.

En la (figura 9) se observa el efecto inhibitorio sobre el flujo de electrones fosforilante con el siguiente orden de potencia inhibitoria 3-Fluor < H < 4-Metil < 3,4-Metilendioxi = 2-Nitro < 3-Cloro < 3-Metoxi < 4-Bromo = 3-Nitro = 4-Cloro < 4-Metoxi < 3-Bromo < 4-Nitro. Este orden es diferente a las demas actividades descritas.

Finalmente en la (figura 10) se muestra el efecto inhibitorio de los diferentes derivados de N-Isobutilcinamamidas sobre el transporte de electrones desacoplado, siendo el siguiente orden 4-Cloro < 3-Fluor < 3-Nitro < 3-Bromo < 3-Cloro < 4-Nitro < 2-Nitro < H < 4-Metil < 3,4-Metilendioxi < 4-Bromo < 4-Metoxi < 3-Metoxi.

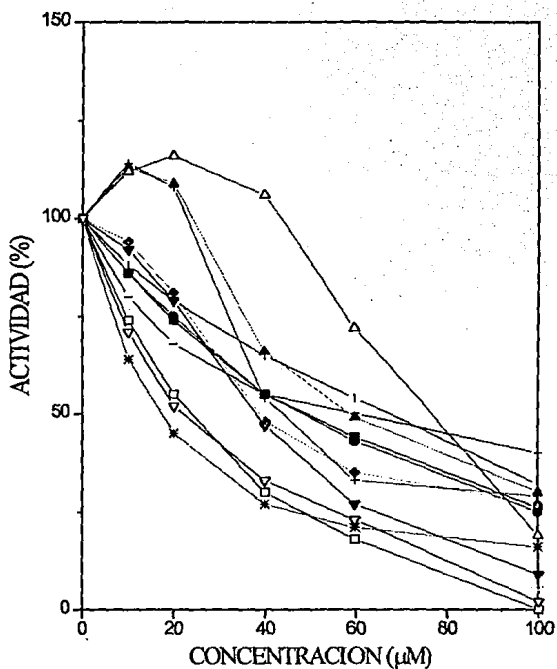


Figura 6. Efecto de los diferentes sustituyentes de N-isobutilcinamidas en la síntesis de ATP de H₂O a MV. 4-Metil (■), 3-Fluor (●), H (▲), 3-Bromo (▼), 3-Nitro (◆), 3,4-Metilendioxi (⊕), 3-Cloro (×), 4-Nitro (*), 3-Metoxi (-), 4-Metoxi (|), 4-Bromo (◻), 2-Nitro (Δ), 4-Cloro (∇). Los valores de los controles en μmoles de H⁺ /mg chl.hr son: 665, 665, 665, 665, 665, 665, 222, 222, 193, 193, 193, 193 y 193 respectivamente.

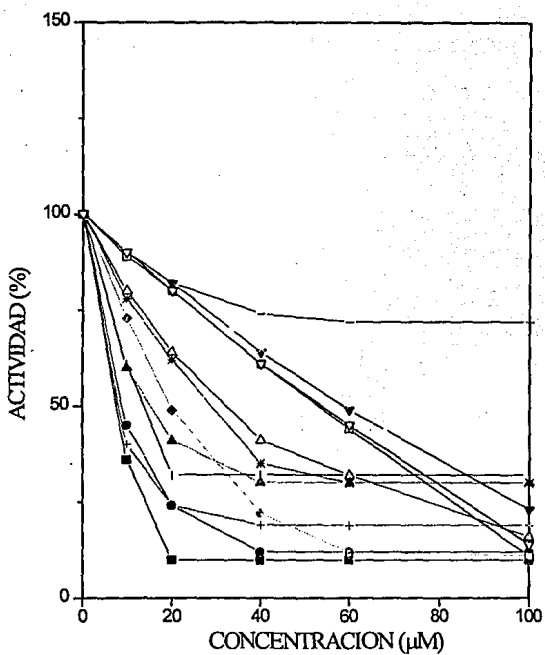


Figura 7. Efecto de los diferentes sustituyentes de N-Isobutylcinamamidas en la captación de protones de H₂O a MV. 4-Metil (■), 3-Fluor (●), H (▲), 3-Bromo (▼), 3-Nitro (◆), 3,4-Metilendioxi (⊕), 3-Cloro (×), 4-Nitro (*), 3-Metoxi (-), 4-Metoxi (|), 4-Bromo (◻), 2-Nitro (Δ), 4-Cloro (∇). Los valores de los controles en µeq de H⁺ /mg chl.hr. son: 61, 2.68, 2.68, 39, 2.68, 108, 108, 187, 61, 187, 108, 108 y 108 respectivamente

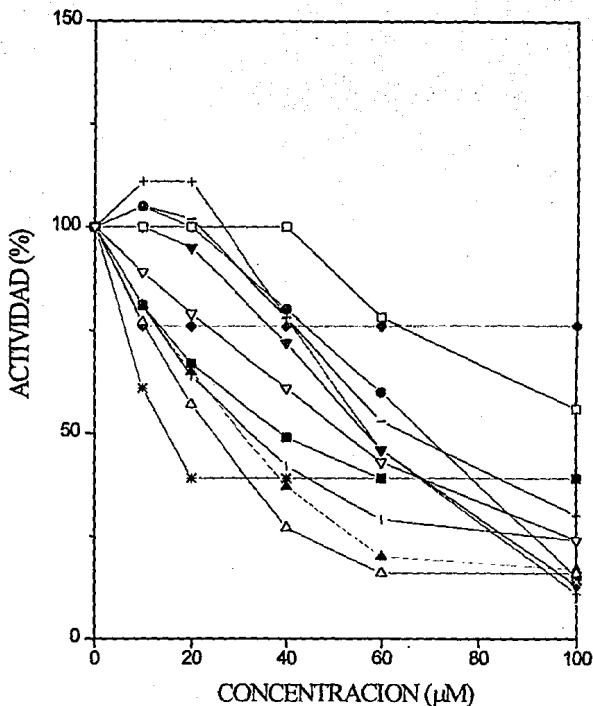


Figura 8. Efecto de los diferentes sustituyentes de N-isobutilcinamamidas en el transporte de electrones basal de H₂O a MV. 4-Metil (■), 3-Fluor (●), H (▲), 3-Bromo (▼), 3-Nitro (◆), 3,4-Metilendioxi (⊕), 3-Cloro (×), 4-Nitro (∗), 3-Metoxi (-), 4-Metoxi (|), 4-Bromo (◻), 2-Nitro (Δ), 4-Cloro (∇). Los valores de los controles en $\mu\text{eq}^-/\text{mg chl}\cdot\text{hr}$ son: 261, 144, 391, 261, 261, 144, 144, 261, 261, 112, 112, 533 y 112 respectivamente.

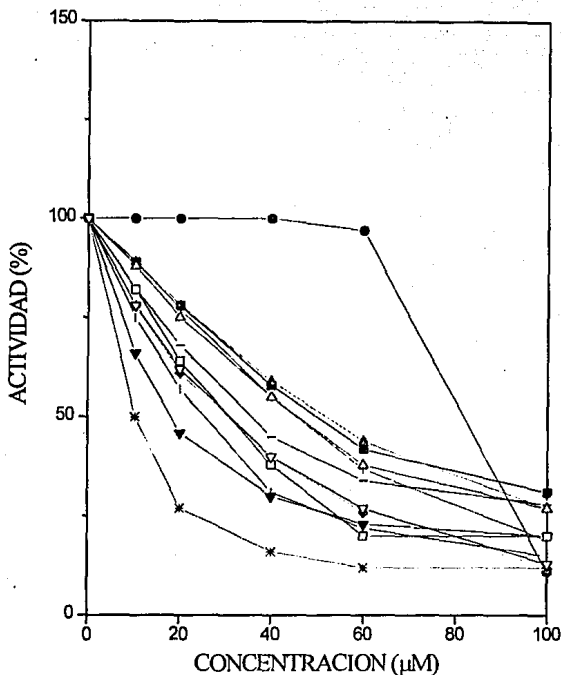


Figura 9. Efecto de los diferentes sustituyentes de N-Isobutiramidas en el transporte de electrones fosforiante de H₂O a MV. 4-Metil (■), 3-Fluor (●), H (▲), 3-Bromo (▼), 3-Nitro (◆), 3,4-Metilendioxi (⊕), 3-Chloro (x), 4-Nitro (*), 3-Metoxi (-), 4-Metoxi (l), 4-Bromo (◻), 2-Nitro (Δ), 4-Chloro (▽). Los valores de los controles en $\mu\text{eque}^-/\text{mg chl.hr. son:}$ 533,160, 533, 122, 122, 533, 122, 146, 282, 157, 146, 282 y 198 respectivamente.

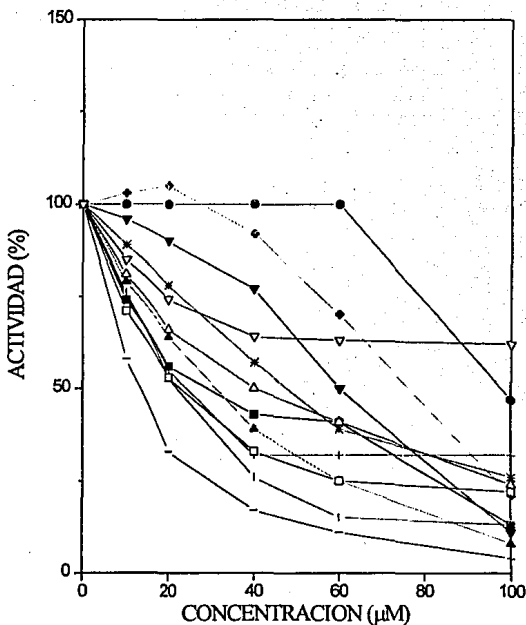


Figura 10. Efecto de los diferentes sustituyentes de N-Isobutylcinamamidas en el transporte de electrones desacoplado de H_2O a MV. 4-Metil (■), 3-Fluor (●), H (▲), 3-Bromo (▼), 3-Nitro (◆), 3,4-Metilendioxi (⊕), 3-Cloro (×), 4-Nitro (*), 3-Metoxi (-), 4-Metoxi (l), 4-Bromo (⊔), 2-Nitro (Δ), 4-Cloro (∇). Los valores de los controles en $\mu\text{eq}^-/\text{mg}$ chl.hr. son: 1308, 916, 1308, 889, 916, 1165, 823, 1882, 1165, 916, 916, 1388 y 1165 respectivamente.

Todos los derivados de N-Isobutilcinamamidas inhiben las diferentes actividades fotosintéticas determinadas (figura 6 a la 10), estos resultados indican que estos compuestos son inhibidores de la reacción de Hill. Para observar mejor estos efectos en los que se inhiben todas las actividades como transporte de electrones basal, desacoplante, fosforilante, síntesis de ATP y captación de protones ver (figura 11) donde se trazó una recta de la velocidad contra concentración de cada uno de los compuestos.

Con objeto de localizar que enzima redox inhiben las N-Isobutilcinamamidas se seleccionó al derivado 3-Metoxi, para estudiar su efecto en el fotosistema I (FSI) y fotosistema II (FSII). En la (figura 12) se visualiza una inhibición parcial de ambos fotosistemas, siendo mayor la inhibición del fotosistema I (20%) y para el FSII (15%). Para localizar los sitios de inhibición FSI y FSII se efectuaron las siguientes reacciones parciales de H_2O a SiMo se inhibió hasta un 10% , DPC a DPIC 32% estas 2 últimas determinaciones indican que el 3-Metoxi inhibe a nivel de fotólisis del H_2O y entre P_{680} y Q_A , la suma de ambas es la responsable de la inhibición que se encontro en el FSII en la misma figura se nota que la inhibición de FSI, y de $TMPQH_2$ a MV es similar en cada inhibición, lo que indica que el compuesto no inhibe a nivel de PQ de la cadena redox en FSI. El flujo de electrones de PMS reducido a MV es inhibido un 7% a $300\mu M$, estos datos indican que el FSI inhibe a 2 niveles enzimáticos uno en el complejo b_6/f o PC y el otro entre P_{700} , al lado aceptor del FSI, el conjunto de datos que se presenta en la (figura 6) indican que el compuesto inhibe en 4 sitios diferentes y la suma de estas inhibiciones parciales contribuye a la inhibición total en el flujo de electrones de H_2O a M.V.

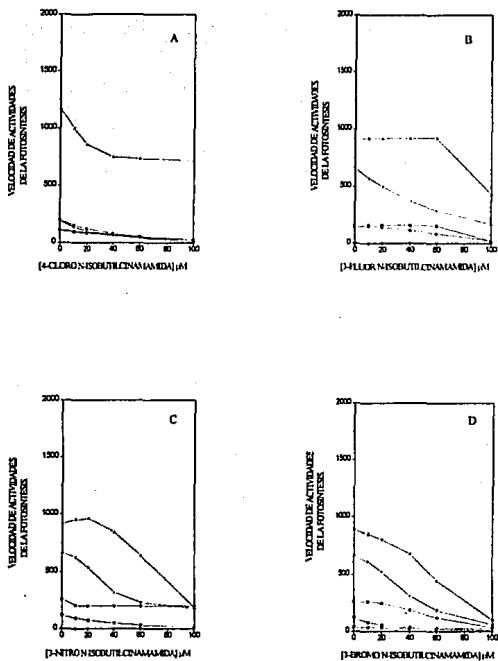


Figura 11. Efecto de N-Isobutilcinamamidas en las reacciones de la fotosíntesis de H_2O a MV. T.E.F. (■), T.E.B. (●), T.E.D. (▲), C.P. (▼), Síntesis de ATP. (◆). T.E. $\mu\text{eq}^- / \text{mg chl.hr.}$ A.T.P. $\mu\text{moles de } H^+ / \text{mg chl.hr.}$ C.P. $\mu\text{eq } H^+ / \text{mg chl.hr.}$

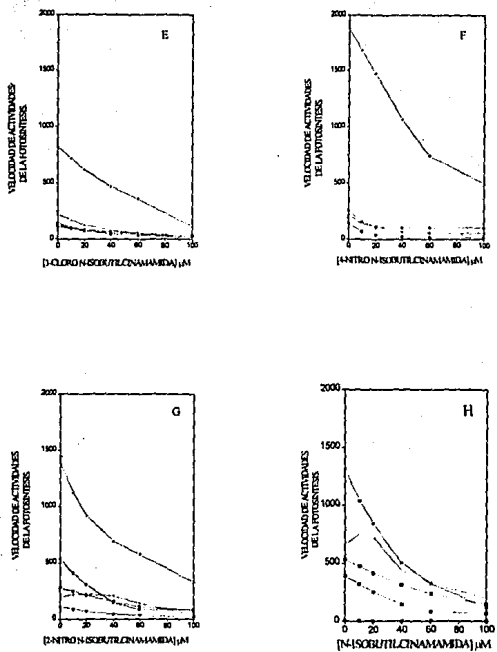


Figura 11. Efecto de N-Isobutilcinamamidas en las reacciones de la fotosíntesis de H₂O a MV. T.E.F.(■), T.E.B.(●), T.E.D.(▲), C.P. (▼), Síntesis de ATP. (◆). T.E. $\mu\text{eq}^- / \text{mg chl.hr}$. A.T.P. $\mu\text{moles de H}^+ / \text{mg chl.hr}$. C.P. $\mu\text{eq H}^+ / \text{mg chl.hr}$.

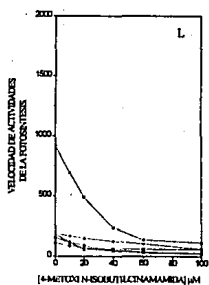
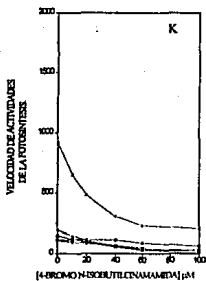
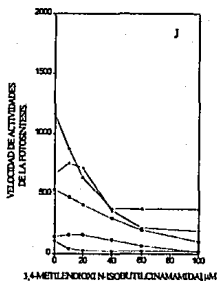
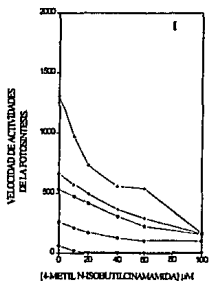


Figura 11. Efecto de N-Isobutilcinamidas en las reacciones de la fotosíntesis de H_2O a MV. T.E.F.(■), T.E.B.(●), T.E.D.(▲), C.P. (▼), Síntesis de ATP. (◆). T.E. $\mu\text{eq}^r/\text{mg chl.hr.}$ A.T.P. $\mu\text{moles de } H^+/\text{mg chl.hr.}$ C.P. $\mu\text{eq } H^+/\text{mg chl.hr.}$

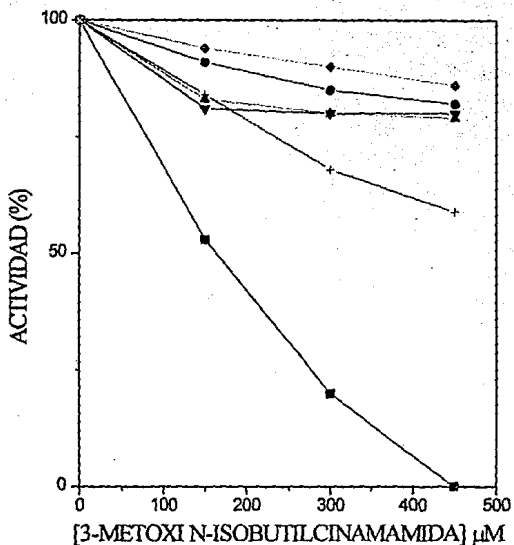


Figura 12. Efecto del [3-Metoxi N-Isobutilcinamamida] en el transporte de electrones del FSI y FSII. H₂O a MV (■), DCIP a MV (▲), TMPQH₂ a MV (▼), PMS a MV (×), H₂O a DCIP (●), H₂O a SiMo (◆), DCP a DCIP (+). Los valores de los controles en $\mu\text{eqe}^-/\text{mg chl. hr.}$ son: 1760, 2150, 7466, 1500, 325, 1133 y 44 respectivamente.

Relación estructura-actividad.

Los estudios realizados a familias de herbicidas han encontrado que el grupo amida juega un papel muy importante en la actividad biológica, ya que la inhibición de la fotosíntesis se visualiza que ocurre entre el par de electrones libre del nitrógeno del herbicida y la deficiencia de electrones del grupo carbonilo de la amida.

La finalidad de sintetizar diferentes derivados de N-Isobutilcinamamidas fue observar como los diferentes sustituyentes afectaban la fotosíntesis, también se trató de correlacionar la estructura-actividad. Comparada con la N-Isobutilcinamamida que no tiene sustituyente, se realizaron experimentos para obtener los coeficientes de extinción de cada uno de los compuestos, se llevo a cabo por el método espectrofotométrico, los resultados obtenidos nos dieron una visión más amplia de como cada sustituyente en algunos potencia y en otros disminuye. Se procedió a determinar los coeficientes de extinción de los compuestos, realizando curvas estandar a concentraciones de 6 μ M, 12 μ M, 15 μ M, 18 μ M, 24 μ M, leyendo la absorción a la longitud de onda máxima de cada compuesto, con los datos obtenidos se trazo una gráfica de concentración contra absorbancia, después se realizo una regresión lineal, la pendiente de esa recta es el coeficiente de extinción (tabla 3), con la ley de Lambert-Beer ($A=\epsilon lc$) obtener la concentración que se obtuvo en la fase del octanol y por diferencia obtener la concentración en la fase acuosa. Se sabe que el coeficiente de extinción es dependiente de la polaridad del disolvente orgánico, de la longitud de onda. Los resultados de coeficiente de partición contribuyen a dar una explicación de como los diferentes sustituyentes potencian o disminuyen la actividad afectada en la fotosíntesis; los valores obtenidos del coeficiente de extinción ϵ molar, y coeficiente de partición π se encuentran en la (tabla 3), los valores positivos de π (coeficiente de partición) indican que el sustituyente es liposoluble (lipofílico, apolar). y valores negativos que son hidrosolubles o hidrofílicos. Los resultados de los coeficientes de partición π de los diferentes compuestos ordenados de menor a mayor son: 4-Metil < 4-Nitro < 3-Nitro < 4-Bromo < 2-Nitro < 3-Cloro < H < 4-Cloro < 4-Metoxi < 3-Fluor < 3-Metoxi < 3,4-Metilendioxi < 3-Bromo.

Los valores de π negativos de los sustituyentes son 4-Metil, 4-Nitro, 3-Nitro, 4-Bromo, 2-Nitro, 3-Cloro, indican que estos compuestos son hidrosolubles. Por otro lado, se obtuvieron valores de π positivos con los siguientes sustituyentes 4-Cloro, 4-Metoxi, 3-Fluor, 3-Metoxi, 3,4-Metilendioxi, y 3-Bromo, indican que estos compuestos son liposolubles. Posteriormente se utilizo al que no tiene sustituyente el hidrógeno dandole un valor de cero de π al obtener las diferencias logarítmicas de P entre el sustituyente y el estandar que no tiene derivado ya que

este se comparo con todos los compuestos. Los valores de los sustituyentes π positivos nos indican que estos son más afines a la fase del octanol (Lípoфильicos), y valores de π negativos estan disueltos en la fase acuosa (Hidroфильicos). Los valores positivos de π (tabla 3) son los compuestos que tienen mejor actividad biológica, comparando estos con los resultados que se obtuvieron en la inhibición de la reacción de Hill en la fotosíntesis se puede hacer una correlación; por ejemplo, los compuestos más activos como inhibidores de la reacción de Hill son 3-Metoxi, 3,4-Metilendioxi, 4-Metoxi, el átomo de oxígeno unido al anillo aromático es un factor determinante para el incremento de la actividad. Con relación al 3-Fluor, 3-Bromo, y 4-Cloro; no se encontro que fueran tan activos como el 3-Metoxi que es un compuesto muy activo en las diferentes actividades de la fotosíntesis.

El efecto resonante tiene poco efecto en el log P. Los sustituyentes como 4-Metil, 4-Nitro, 3-Nitro, 4-Bromo, 2-Nitro, 3-Cloro, no son inhibidores de la fotosíntesis tan activos como los anteriores; los valores de π calculados confirma lo anteriormente dicho. En las amidas nitradas, el grupo 2-Nitro contribuye en la inhibición de la actividad fotosintética debido al mayor efecto desactivante que se ejerce sobre el anillo aromático.

Otro de los parámetros importantes en la relación estructura-actividad son los parámetros estéricos que influyen en la actividad biológica, hay mayor impedimento estérico cuando la posición del sustituyente esta en posición orto que en meta o para por lo que en los diferentes sustituyentes utilizados la posición meta es la más favorable para aumentar el porcentaje de inhibición debido a que este sustituyente se encuentra separado de la amida no interaccionan entre si como lo es con la posición orto; con objeto de obtener una mayor potenciación de la inhibición de la actividad biológica con los derivados de la N-Isobutilcinamamida.

Tabla 3. Con los coeficientes de extinción y coeficientes de partición de los diferentes derivados de N-Isobutilcinamidas.

Compuesto	Coefficiente de extinción ϵ $\mu\text{moles/cm}^{-1}$	Coefficiente de partición π
4-Metil	0.02507	-0.52
4-Nitro	0.02355	-0.44
3-Nitro	0.3056	-0.39
4-Bromo	0.02901	-0.37
2-Nitro	0.02187	-0.29
3-Cloro	0.0241	-0.04
H	0.02376	0.00
4-Cloro	0.0271	0.06
4-Metoxi	0.02258	0.32
3-Fluor	0.02297	0.41
3-Metoxi	0.02153	0.94
3,4-Metilendioxi	0.01742	1.83
3-Bromo	0.02381	2.24

10. CONCLUSIONES

1. Se sintetizó N-Isobutilcinamamida y 12 derivados con diferente sustituyente: 3,4-Metilendioxi, 3-Fluor, 3-Metoxi, 4-Metoxi, 4-Bromo, 3-Bromo, 4-Metil, 4-Cloro, 3-Cloro, 4-Nitro, 3-Nitro y 2-Nitro, las cuales se caracterizaron analíticamente y espectroscópicamente (UV, RMN, IR).

2. Se evaluó el efecto de los compuestos sintetizados en las diferentes actividades de la fotosíntesis como son: transporte de electrones basal, fosforilante, desacoplado, síntesis de ATP y captación de protones, se encontró que todos los compuestos son inhibidores de la reacción de Hill ya que inhiben todas las actividades de la fotosíntesis.

3. Al inhibidor de la reacción de Hill más activo de acuerdo al transporte de electrones desacoplado, (3-Metoxi) se le ubicó el sitio de inhibición en las reacciones parciales de la cadena redox, el 3-Metoxi inhibe a nivel de fotólisis del H_2O y entre P_{680} y Q_A , la suma de ambas es la responsable de la inhibición en el FSII, y en el FSI se inhibe en 2 niveles enzimáticos uno en el complejo B_6/f o PC y el otro entre P_{700} , el compuesto inhibe en cuatro sitios diferentes y la suma de estas contribuye a la inhibición total en el flujo de electrones de H_2O a MV.

4. Los estudios realizados de estructura-actividad indican que el grupo amida le confiere un papel importante que interacciona con las enzimas redox que intervienen en la fotosíntesis y así inhibirlas, aunque el sitio de inhibición de las N-Isobutilcinamamidas cambia en comparación a los herbicidas comerciales sintéticos ya que estas inhiben en Q_B , al menos en el caso del derivado 3-Metoxi que inhibe en cuatro sitios diferentes.

5. Los coeficientes de partición de cada uno de los diferentes sustituyentes determinados nos dan la relación que existe entre la actividad biológica con los parámetros fisicoquímicos, los compuestos que favorecen más son: 3,4-Metilendioxi, 3-Metoxi, 4-Metoxi, la presencia de un átomo de oxígeno dentro del anillo aromático es un factor determinante para el incremento de la actividad y además estos coeficientes indican el tipo de interacción que se establece con las enzimas redox, en un ambiente apolar o hidrofóbico; indicando que los compuestos lipofílicos serán más activos.

6. Los compuestos nitrados favorecen poco la actividad, el 2-Nitro es el que presenta mayor efecto en comparación al 3-Nitro y 4-Nitro, esto puede ser debido al mayor efecto desactivante que ejerce sobre el anillo aromático.

7. Los compuestos halogenados favorecen la actividad pero no son tan activos como los metoxilados, la posición meta es importante.

8. El grupo metilo no favorece la actividad inhibitoria, ya que disminuye la potencia.

11. PROPUESTAS.

Se sugiere que se continúe sintetizando N-Isobutilcinamamidas con diferente sustituyente en posición meta y para, también que los compuestos que no contengan doble ligadura conjugada con la amida

Para poder dar una explicación más exacta de como influyen los diferentes sustituyentes en las N-Isobutilcinamamidas es necesario realizar estudios fisicoquímicos de los siguientes parámetros: momento dipolar, estéricos y electrónicos.

Se recomienda que se continúe el estudio de estos derivados de N-Isobutilcinamamidas para conocer que otros parámetros son importantes para incrementar la potencia herbicida y caracterizar bioquímicamente los otros compuestos en las reacciones parciales, para determinar si alguno de los derivados presenta otro sitio de inhibición. También que se continúe con los estudios de germinación in vivo y en vitro de los compuestos

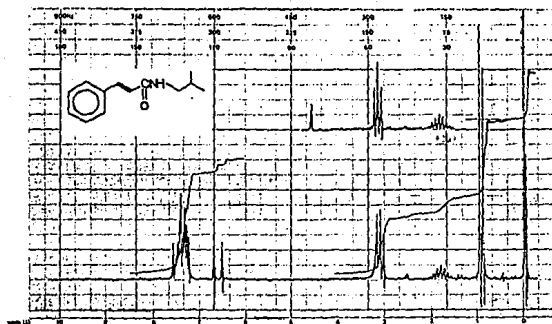
12. APENDICE

12.1. Abreviaciones

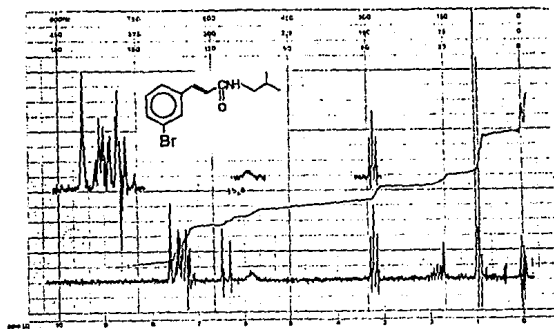
A	Absorbancia.
ADP	Adenosina difosfato.
ATP	Adenosina trifosfato.
Chl	Clorofila.
C	Concentración.
Cyt f	Citocromo f.
DBMIB	2,5-Dibromo-3-Metil-6-Isopropil-p-Benzoquinona.
DCMU	(3,4-Diclorofenil)-1,1-Dimetilurea.
DCIP	2,6-Diclorofenol-Indofenol.
ϵ	Coefficiente de extinción.
Fd	Ferredoxina
$K_3Fe(CN)_6$	Ferricianuro de potasio.
FeO	Feofitina.
FSI	Fotosistema I.
FSII	Fotosistema II.
HEPES	Ac. N-Hidroxietilpiperizina-N-2-Etanosulfónico.
HCl	Acido clorhídrico.
IR	Infrarrojo.
I ₅₀	50 % de Inhibición.
KCN	Cianuro de potasio.
l	Longitud.
M.V	Metilviologeno.
μeq	Microequivalentes.
$\mu eqe/mgchlhr$	Microequivalentes de electrones por miligramo de clorofila por hora.
π	Coefficiente de partición.
P ₆₈₀	Centro de reacción del FS II.
P ₇₀₀	Centro de reacción del FS I.
PC	Plastocianina.
PMS	N-metilfenazina metosulfato.
PQ	Plastoquinona.
QA	Aceptor electrónico primario del FS II.
QB	Aceptor electrónico primario del FS II.

QSAR	Análisis cuantitativo estructura-actividad.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
SiMo	Silicomolibdato de sodio.
SOCl ₂	Cloruro de tionilo.
SO ₂	Dioxido de azufre.
T.E.B	Transporte de electrones basal.
T.E.D	Transporte de electrones desacoplado.
T.E.F	Transporte de electrones fosforilante.
UV	Luz Ultravioleta.

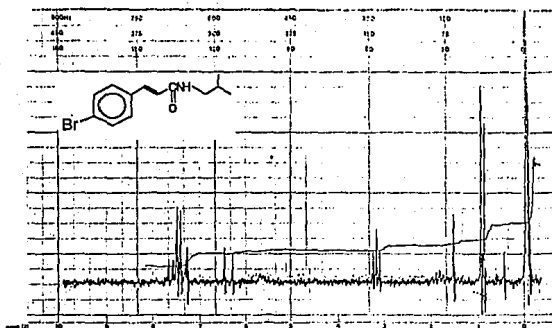
12.2. Espectros de RMN.



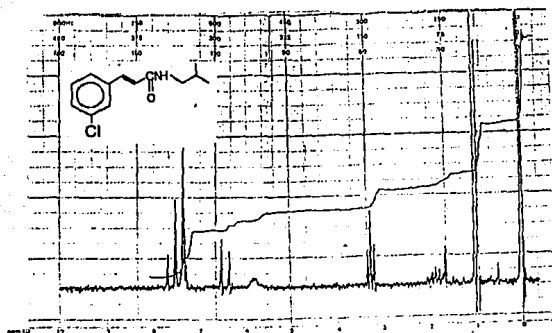
Espectro 1. N-Isobutil-3-fenil-2(E)propenamida.



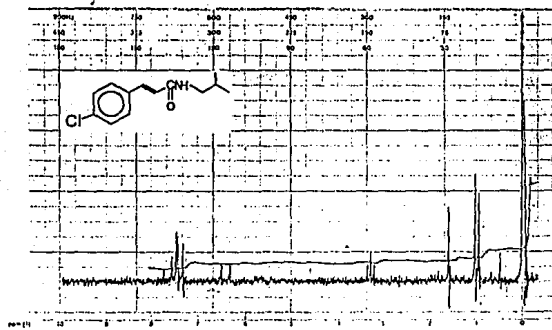
Espectro 2. N-Isobutil-3-(3-Bromofenil)-2(E)propenamida.



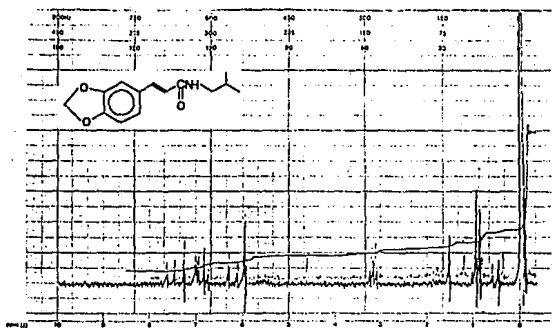
Espectro 3. N-Isobutil-3-(4-Bromofenil)-2(E)propenamida.



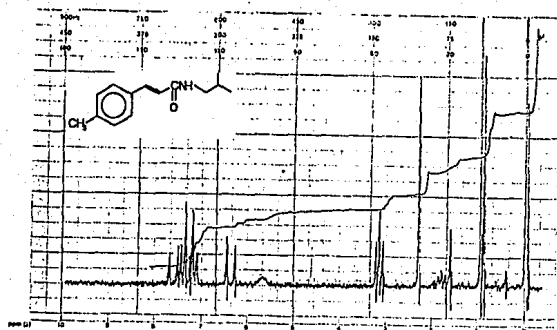
Espectro 4. N-Isobutil-3-(3-Chlorofenil)-2(E)propenamida.



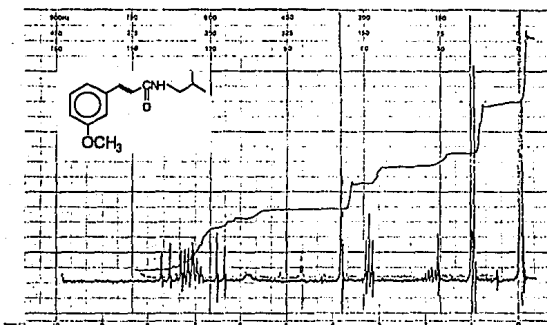
Espectro 5. N-Isobutil-3-(4-Clorofenil)-2(E)propenamida.



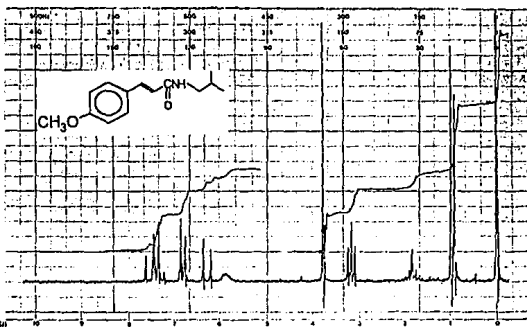
Espectro 6. N-Isobutil-3-(3,4-Metildioxifenil)-2(E)propenamida.



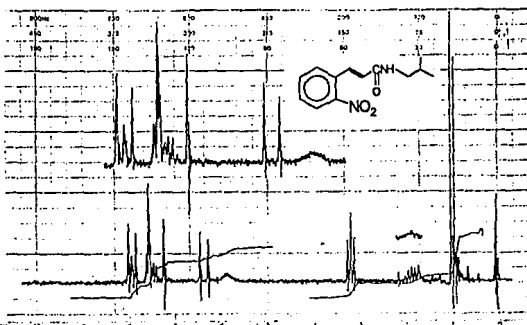
Espectro 7. N-Isobutil-3-(4-Metilfenil)-2(E)propenamida.



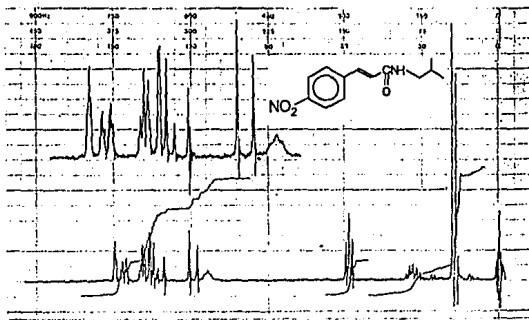
Espectro 8. N-Isobutil-3-(3-Metoxifenil)-2(E)propenamida.



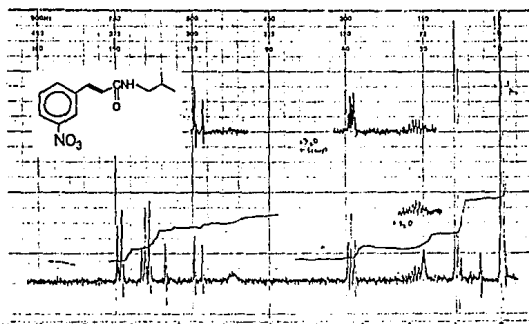
Espectro 9. N-Isobutil-3-(4-Metoxifenil)-2(E)propenamida.



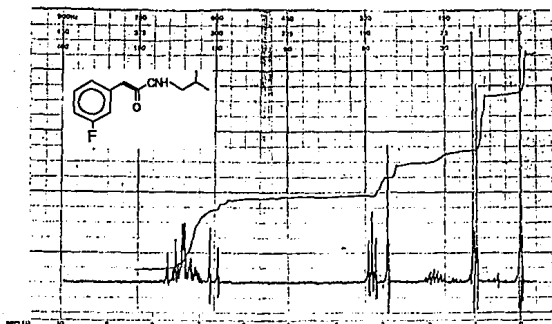
Espectro 10. N-Isobutil-3-(2-Nitrofenil)-2(E)propenamida.



Espectro 11. N-Isobutil-3-(3-Nitrofenil)-2(E)propenamida.



Espectro 12. N-Isobutil-3-(4-Nitrofenil)-2(E)propenamida.



Espectro 13. N-Isobutil-3-(3-Fluorfenil)-2(E)propenamida.

13. BIBLIOGRAFIA.

- Audus, L. J. (1979). "The Physiology and Biochemistry of Herbicides". 4^a Ed, Edit. Academic Press, Londres, Inglaterra. pp. 1-20, 394-395.
- Armstrong, F.B., "Biochemistry". 3^a edición, Edit. Oxford University Press, U.S.A. (1989) pp. 329-357.
- Arnon, D.I. (1949). "Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*". *Plant Physiol.* 24:1-15
- Achenbach, H., Fietz, W., Wörth, J., Waibel, R., and Portecop J. (1986). Constituents of tropical medicinal plants. IXX GC/MS-investigations of the constituents of *Piper amalago*-30 new amides of the Piperine-Type. 52, 12-18.
- Boycr, P. A., et al. (1977). "Oxidative phosphorylation and photophosphorylation". *Ann. Rev. Biochem.* 46:955-1026.
- Chemical Abstracts; 1975 83:109795c.
- Chemical Abstracts; 1983 98:16431a.
- Chemical Abstracts; 1984 101:224-225.
- Chemical Abstracts; 1986 105:218297K.
- Collander, R. (1951). "The partition of organic compounds between higher alcohols and water". *Acta. Chemica Scandinavica.* 5:774-780.
- Currie, J. D., and Holmes L. H., (1970). "Partition coefficients and ultraviolet absorption maxima for the cinnamoyl derivatives of some long-chain and large-ring amines". *Can. J. Chem.* 48:1340-1343.
- Currie, J. D., Lough, E. C., Silver, F.R., and Holmes. L. H. (1966). "Partition coefficients of some conjugated heterocyclic compounds and 1,4-Naphthoquinones". *Can. J. Chem.* 44:1035-1043.
- Delaney, D. A., Currie, J. D., and Holmes, L. H. (1969). "Partition coefficients of some N-alkyl-and N,N-dialkyl-derivatives of some cinnamamides and benzalcyanoacetamides in the system cyclohexane-water". *Can. J. Chem.* 47:3273-3277.
- Dilley, R. A., (1972). "Ion transport". *Methods in Enzymology.* XXIV:68-75.
- Elliott, M., Farnham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. (1987). "Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 1: introductory survey, and discovery of an active synthetic compound". *Pestic. Sci.* 18:191-201.
- Elliott, M., Farnham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. (1987).

- "Synthesis and insecticidal activity of amides". Part II. *Pestic. Sci.* **18**:203-209.
- Elliott, M., Farnham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. (1987). "Synthesis and insecticidal activity of amides". Part III. *Pestic. Sci.* **18**:211-221.
- Giaquinta, R.T. and Dilley, R. A., (1975). "A partial reaction in FS II: Reaction of silicomolibdate prior to the site of dicholophenyldimethylure inhibition". *Biochem. Biophys. Acta.* **387**:288.
- Govindjee and Govindjee R., (1974). "The absorption of light in photosynthesis". *Sci. Am.* **231**:68-82.
- Hansch, C. (1969). "Theoretical considerations of the structure activity relationship in photosynthesis inhibitors". In progress in photosynthesis research, Ed. H. Metzner. 1685-1692.
- Hansch, C., Deutsch, E. W. (1966). "The structure-activity relationship in amides inhibiting photosynthesis". *Biochim. Biophys. Acta.* **112**:381-391.
- Hansch, C., Deutsch, E. W., Smith, N. R. (1965). "The use of substituent constants and regression analysis in the study of enzymatic reaction mechanisms". *Journal of the American Chemical Society.* **87**:12 2738-2742.
- Hansch, C., Leo, A. (1979). "Electronic parameters, steric parameters, hydrophobic parameters, the fragment method of calculating partition coefficients substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology". John Wiley & Sons. New York. 1-43.
- Hauska, G., (1977). "Artificial acceptors and donors". *Enciclopedia of plant physiol.* New series. **5**:253-265.
- Hooper, J. K. "Chloroplasts". Edit. Pienum Press, N. Y. U.S.A., (1984) 47-61.
- Izawa, S., (1977). "Inhibitors of electron transport". *Enciclopedia of plant physiol.* New series. **5**:266-282.
- Izawa, S. and Good, N. E., (1972). "Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation". *Methods in enzymology.* **XXIV**:355-377.
- Izawa, S. and Pan. R. L. (1978). "Photosystem I electron transport and phosphorylation supported by electron donation to the plastoquinone region". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **83**:3 ; 1171-1177.
- Jacobson, M. (1971). "The unsaturated isobutylamides". *Naturally occurring insecticides.* cap IV. 137-177.
- Kubo, I., Klocke, J. A., Matsumoto and Kumikawa, T. (1984). "Molluscicidal and insecticidal activities of isobutylamides isolated from *Fagaria macrophylla*".

Experientia. 40:340-341.

- Leo, Albert., Hansch, C., and Elkins, O. (1971). "Partition coefficients and their uses". *Chemical Reviews*. 71(6) 525-554.
- Lotina, H. B., Albores V. M., y García C. L. (1989). "Herbicidas y productividad agrícola". *Rev. Soc. Quím. Méx.* 33(3), 109-117.
- McCarty, R. E. (1977). "Energy transfer inhibitors of photophosphorilation in chloroplastos". *Enciclopeia of plant physiol.* New. series. 5:436-447.
- Mills, J. D., Mitchell. P and Shürmann. P. (1980). "Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts". *Febs Letters*. 112(2) 173-177.
- Mitchell, P. (1977). "A comentary on alternative hipotesis of protonic coupling in the membranc system catalysis oxidative and photosynthetic phosphorylation": *Febs Letters*. 78:1-20.
- Moreland, D. E. (1980). "Mechanisms of action of herbicides". *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31:597-638.
- Mundy, P. E. (1985). "Name reactions and reagents in organic synthesis". A. Wiley-Interscience publication. 120-121, 158-159.
- Navarrete, C. A., Reyes, T. B., Aguirre, E., y Estrada, E. (1987). "Estudio químico de *Zanthoxylum Colopahtle*", XVI simposium internacional de química de productos naturales. Monterrey N. León, México. 3-7, 28-30.
- Pine, H. S., Hendrickson, B. J., Cram. J. D., Hammond S. G. (1984). *Química Orgánica*, 4ª edición. Edit. Mc Graw Hill. 366, 344-345, 324,328.
- Purcell, P. W., Bass, E., Clayton, M. J. (1971). "Strategy of drug design: A guide to biological activity". John Willey & Sons, New York. 108(5) 123-141.
- Putnam, R. A. (1985). "Allelopathic research in agriculture". *American Chemical Society*. Washington, D. C. 1-8.
- Putnam, R. A. (1983). "Allelopathic Chemicals". *Chem. Eng. News*. 34-45.
- Reyes, T. B., Navarrete, C. A., Sixtos A. C., Aguirre, E. E., Jimenez, H.S., Estrada, L.E. (1991). "Constituyentes químicos de *Zanthoxylum liebmannianum* (engl.) p. Wilson "Colopahtle", una planta medicinal Mexicana". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 21(5) 30-34.
- Salomons, T. W. G. (1981). *Química Orgánica*, 1ª reimpresión, Ed. Limusa, pp 803,850-851.
- Stryer, L. (1990). *Bioquímica*. 3ª edición, Ed. Reverte, S.A. Tomo I. Impreso en España, cap 22, 523-548.

- Trebs, A. and Draber W. (1978). "Structure activity correlations of recent herbicides in Photosynthetic reactions". *Advances in Pesticides Science*. part 2 Pergaman Press. 223-234.
- Trebst, A., (1972). "Measurement of Hill reactions and photoreduction". *Methods in Enzymology*. XXIV:146-165.
- Trebst, A. and Reimer, S., (1976). "Properties of photoreductions by photosystem II". *Plant Science Letter*. 5:266-282.
- Vogel's. (1989). *Textbook of Practical Organic Chemistry*. Fifth Edition, Longman Scientific & Technical. 1036-1041.
- Whittaker, H. R. and Feeny, P. P. (1971). "Allelochemics. Chemical interactions between species". *Science*. 171(3973) 757-770.
- Yamishito. T. and Warren, L. B. (1968). "Photoreduction and photophosphorylation with tris-washed chloroplasts". *Plant Physiol*. 43:1978-1986.
- Yasuda, I., Takeya, K., and Itokawa H. (1982). "Distribution of unsaturated aliphatic acid amides in Japanese *Zanthoxylum* species". *Phytochemistry*. 21(6) 1295-1298.
- Zabicky, J. *The chemistry of functional groups, the chemistry of amides*. 9, 74-84.