



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA  
FOTOSINTESIS**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**Q U I M I C O**

**P r e s e n t a :**

**José Gilberto González Villanueva**

**México, D. F.**

**1981**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

	pagina
I. Introducción. ....	1
II. Antecedentes. ....	4
1. Fotosíntesis. ....	5
a) generalidades. ....	5
b) fotosíntesis y herbicidas. ....	14
c) características de los herbicidas que inhiben la fotosíntesis. ...	16
d) mecanismo de interacción herbicida con el fotosistema II. ....	19
2. Químicos. ....	21
a) de síntesis. ....	21
b) síntesis letal. ....	23
c) relación estructura-actividad. ....	26
III. Resultados y discusión. ....	30
1. Efecto sobre la bomba de protones. ....	31
2. Efecto sobre el transporte de electrones. ....	37
a) basal. ....	37
b) acoplado. ....	39
c) desacoplado. ....	43
3. Análisis de la actividad herbicida <u>in vitro</u> . ....	45
4. Actividad herbicida <u>in vivo</u> . ....	49
IV. Parte experimental. ....	51
1. Orgánica. ....	53
2. Bioquímica. ....	65
a) preparación de medios. ....	66
b) aislamiento de cloroplastos. ....	68
c) medición de la bomba de protones. ....	70
d) calculo de los protones aprovechados por la bomba de protones. ...	73

e) medición de la velocidad del transporte de electrones. ....	74
f) medición del transporte de electrones basal. ....	74
g) medición del transporte de electrones acoplado. ....	74
h) medición del transporte de electrones desacoplado. ....	75
i) calculo de la velocidad del transporte de electrones. ....	76
j) evaluación <u>in vivo</u> de la actividad herbicida. ....	78
k) oxímetro. ....	79
V. Conclusiones. ....	82
VI. Bibliografía. ....	84
VII. Abreviaturas. ....	89

**I.    I N T R O D U C C I O N .**

## I. INTRODUCCION .

En vista del crecimiento de la población mundial se hace imperiosa la necesidad de planear el crecimiento de ésta y su futura necesidad de alimentación. Para lo segundo hay que aumentar la eficiencia de la cadena alimenticia, la que se sustenta en la producción vegetal.

Al aumentar la eficiencia de la producción vegetal abstrayendo todos los otros factores que afectan la producción vegetal tales - como la tenencia de la tierra, el grado de desarrollo de las fuerzas de producción y la forma específica de producción o modo de producción, se aumentará la eficiencia de la cadena alimenticia.

Los factores que afectan la eficiencia de la producción vegetal forman un conjunto muy amplio de plagas pero dentro de éste las malas hierbas juegan un papel decisivo.

El hombre desde tiempos muy remotos ha desarrollado métodos muy diversos para combatir a las malas hierbas, concebidas éstas como - toda planta ajena al cultivo con el que compete por nutrientes, luz y espacio. Se han utilizado los siguientes métodos para combatirlas: mecánicos, biológicos, ambientales y químicos. Resultando más eficientes y prácticos los métodos de control químico pero teniendo sus riesgos de contaminación y desequilibrio ecológico; aunque hay que recordar que la toxicidad es función de la dosis y también, los métodos de control biológico pueden ocasionar desequilibrio ecológico. Para saber que método o métodos son más adecuados de usar se hace necesario "el análisis concreto de la situación concreta" y valorar todos los pros y contras de cada método y en muchos casos se requieren combinaciones de varios de éstos y la labor interdisciplinaria de varios especialistas.

El control químico suele cubrir la mayoría de los requisitos para poder usarlo; a saber: selectividad, especificidad, toxicidad controlable y economía. Por lo que se vuelve importante el diseño de herbicidas cada vez mejores.

Se ha encontrado que herbicidas que actúan en una función es pecífica de las plantas son selectivos (1); es decir, matan solo a algunas plantas. Tal es el caso de los herbicidas que inhiben la fotosíntesis. De aquí se desprende el objetivo de este trabajo:

Determinar la actividad herbicida de fenoles y piridinoles inh bidores de la fotosíntesis.

Se sintetizaron algunos compuestos de este tipo. Se determinó como influyen sobre la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinaca (Spinacea oleracea); es decir, in vitro; en particular sobre la cadena transportadora de electrones así como su efecto en la bon ba de protones. Se evaluó su actividad en las hojas de diferentes plantas (in vivo) sobre frijol (Phaseolus vulgaris), tomate (Lycoper sicum esculentum), y las malas hierbas diente de león (Taraxcum offi- cinale Weber) y una Papaverácea (Argemone ochroleuca) llamada chicalote.

**II. ANTECEDENTES .**

## II. ANTECEDENTES.

### 1. Fotosíntesis.

#### a) Generalidades.

La fotosíntesis es uno de los procesos bioquímicos más importantes pues permite aprovechar la energía solar con una eficiencia muy alta. Los seres vivos obtienen su energía del sol, unos directamente y otros indirectamente.

La energía solar capturada por el proceso de fotosíntesis está por encima del 90% de toda la energía usada por el hombre.

La fotosíntesis en las plantas verdes se efectúa en los cloroplastos que son organelos celulares especializados capaces de realizar por completo la fotosíntesis.

La contribución de muchos investigadores condujo a la ecuación general:



La fotosíntesis se efectúa en dos etapas: una luminosa (requiere de luz) y otra oscura (se puede efectuar sin luz) aunque requiere los productos formados en la fase luminosa. (fig. 1).

La fase luminosa se realiza en las membranas del cloroplasto, que está formado por un sistema membranar y una fase soluble denominada estroma. El sistema membranar está constituido por sacos membranosos aplanados llamados tilacoides, que se apilan formando granas; éstas se interconectan por medio de otras membranas denominadas lamelas (fig. 2).

La fase luminosa consiste en la captura de la energía de la luz por los pigmentos absorbentes (clorofilas, xantofilas y carotenos) y su conversión en energía química almacenada en forma de ATP y el agente reductor NADPH lo que se puede escribir en la siguiente ecuación:

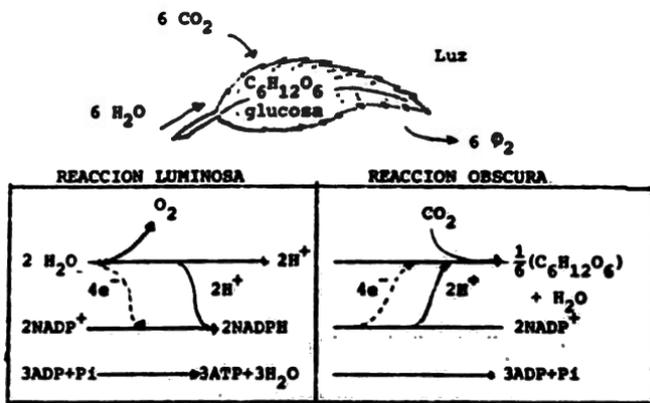


fig. 1 . Esquema de la fotosíntesis. Se muestran sus dos etapas y lo que sucede en cada una de ellas, en términos generales.

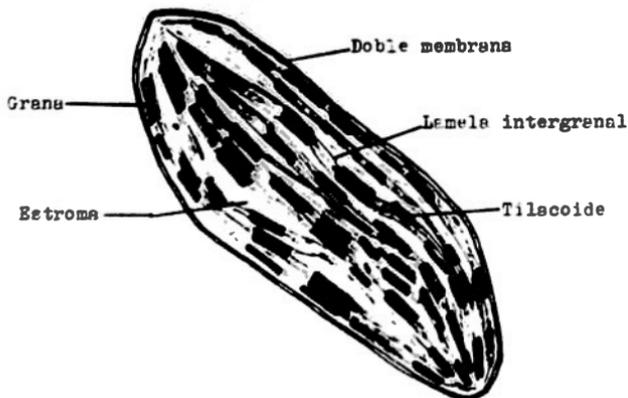
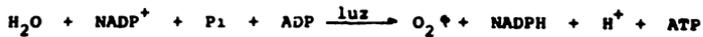
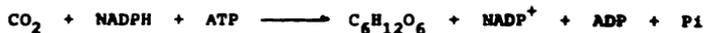


fig. 2 . Esquema de un cloroplasto. Tienen alrededor de 5  $\mu\text{m}$  de longitud. Los cloroplastos de clase II carecen de membrana externa, se les hizo roto mediante un choque osmótico.



En la fase oscura la energía producida en la primera etapa y almacenada en forma de ATP y de NADPH es usada para la producción de dióxido de carbono para formar glucosa, lo que se puede simbolizar así:



Ya que la acción herbicida en fotosíntesis de interés en este trabajo, se limita a la fase luminosa no se describirá la fase oscura.

Fase luminosa. La primera etapa de la fotosíntesis es la absorción de un fotón de luz por los pigmentos, inmersos en las membranas, los que transfieren su energía de excitación a una clorofila especial llamada centro de reacción (cuya energía de estado excitado es menor que el de las demás) ahí comienzan las reacciones químicas. En las plantas verdes existen dos centros de reacción que son pigmentos (P) que absorben a 700 y a 680 nm, se les denomina P700 y P680, están rodeados de otros pigmentos secundarios o accesorios que constituyen el complejo antena (son los que captan la energía y la transfieren a los centros de reacción). El conjunto de pigmentos que rodean a P700 y a P680 junto con los aceptores primarios de electrones formando los centros de reacción, constituyen el fotosistema I y II (PSI y PSII) respectivamente. (fig. 3 ).

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

La transferencia de un electrón desde una sustancia a otra (transporte de electrones fotoinducido), activada por la luz, es en contra de un potencial electroquímico; ésto lo demostró Robert Hill ( 2 ) en 1939 al separar las dos etapas de la fotosíntesis observando que puede haber desprendimiento de oxígeno sin la reducción del  $\text{CO}_2$ , empleando en su lugar aceptores artificiales de electrones tales como el ferricianuro de potasio; la reducción del ión ferrico a ferroso por la acción de la luz es una transformación de la energía luminosa en química. La ecuación general sería:



donde A es un aceptor de electrones y  $\text{AH}_2$  es su forma reducida; como aceptor final también se puede usar metil-violetógeno (MV). Esta reacción es conocida como reacción de Hill. En 1951 ( 2 ) se reportó que el  $\text{NADP}^+$ , un componente normal de los cloroplastos puede reemplazar a los reactivos de Hill como aceptor de electrones de acuerdo con la siguiente ecuación:



La luz induce el movimiento de electrones vía varios aceptores de electrones los que están "eslabonados" en la cadena transportadora de electrones fotosintética; no todos los eslabones de la cadena han sido plenamente caracterizados pero se está de acuerdo en la existencia de los siguientes; un sistema enzimático fotolizador de agua (Y); un donador primario de electrones del centro de reacción del fotosistema II (P680) (absorbe a 680 nm); un aceptor primario de electrones del fotosistema II llamado por algunos como Q ó citocromo 550 (cit 550) ó X320; un carrusel de moléculas de plastoquinonas (PQ); citocromo b559 (cit b<sub>3</sub>); citocromo f553 (cit f); plastocianina (PC); donador de electrones del centro de reacción del fotosistema I (P700);

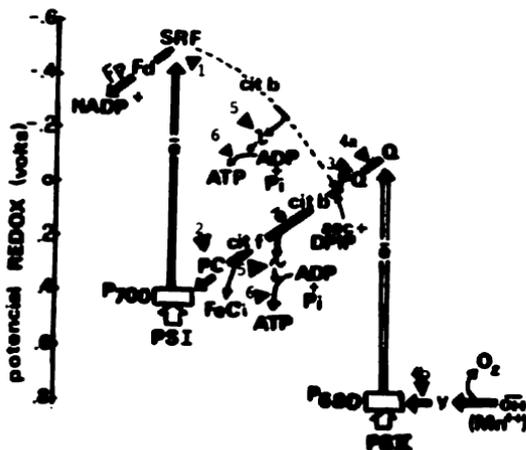


fig. 3 . Esquema del transporte de electrones fotoinducido y las reacciones de fosforilación acopladas ( 5 ). Las líneas blancas indican reacciones luminosas, las negras reacciones oscuras, y la línea punteada representa el camino cíclico. Abreviaturas usadas: PS I, fotosistema I; PS II fotosistema II; Y donador de electrones postulado para fotosistema II; Q aceptor primario de electrones para PS II; PQ, plastoquinonas; cit b, citocromo tipo b; cit f, citocromo f; PC, plastocianina; P700, centro de reacción de PS I; P680, centro de reacción de PS II; SRF, substancia reductora de ferredoxina; Fd, ferredoxina; Fp, ferredoxin-NADP- oxidoreductasa; FcI, ferricianuro; asc, ascorbato; y DPIP,2,6 diciorofenolintofenol. Los números indican los sitios de acción de los inhibidores ( ).

una substancia reductora de ferredoxina (FRS); ferredoxina (Fd) ; ferredoxin NADP oxidoreductasa (Fp); citocromo b564 (cit b<sub>6</sub>). Aunque actualmente se discute la secuencia precisa de algunas de las reacciones redox efectuadas y sus mecanismos de encadenamiento, un esquema general de la secuencia sería el que nos propone Moreland ( 3 ) (fig. 3 ).

Los componentes de la cadena transportadora de electrones están inmersos en la doble membrana formando complejos con componentes proteicos ( 4 ) y están dispuestos de una manera asimétrica como se muestra en la figura (fig. 4 ). Al funcionar la cadena transportadora se produce NADPH en el exterior del tilacoide y se genera también un gradiente de pH, se presume que el interior del tilacoide se acidifica ya que el exterior del mismo se alcaliniza (fig.5 ). Este gradiente de pH formado a través de la membrana es aprovechado por una enzima ATP sintetasa, que en realidad es un complejo enzimático al que se ha llamado CF<sub>1</sub> y que está constituido por cinco tipos de subunidades las que se unen a la membrana por otro componente proteico llamado CF<sub>0</sub>, para sintetizar ATP (fig. 4 ).

La enzima ATP sintetasa no puede utilizar más protones de los proporcionados al interior de la vesícula del tilacoide por la cadena transportadora de electrones; a su vez la cadena transportadora de electrones no puede producir más protones que los aprovechables por la enzima ATP sintetasa, por lo que se dice que ambos eventos están acoplados.

Hay varias formas de medir la actividad fotosintética "in vitro" de cloroplastos de clase II, es decir sin doble membrana externa o envoltura, es común medir el transporte de electrones basal (t.e.b.) (fig. 6 a), lo que significa la actividad únicamente de

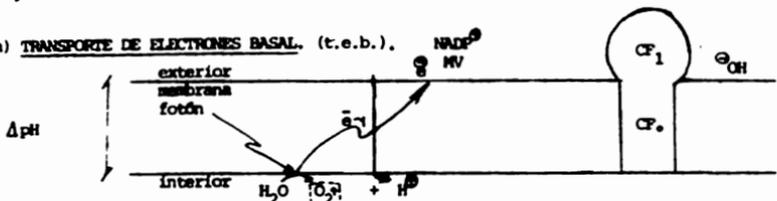


la cadena transportadora de electrones sin poner las condiciones necesarias para que se acople a la síntesis de ATP realizada por el  $CF_1$ . El acoplamiento entre el transporte de electrones y la formación de ATP requiere de ADP y fósforo inorgánico ( $KH_2PO_4$ ) abreviado Pi. Otra manera de evaluar la actividad fotosintética consiste en medir el transporte de electrones acoplado a la síntesis de ATP (t.e.a.) (fig.6b) al que se le suele llamar transporte de electrones fosforilante, ya que además del basal, se ponen las condiciones para la fosforilación del ADP en presencia de Pi de tal manera que el  $CF_1$  sintetiza ATP. También se suele medir el transporte de electrones acoplado pero en presencia de un reactivo desacoplante, el cual es capaz de separar, funcionalmente, la cadena transportadora de electrones de la síntesis de ATP, los reactivos de este tipo más comunes son las aminas alifáticas como la etilamina (EA); esta medición es conocida como transporte de electrones fosforilante con desacoplante pero se le puede llamar transporte de electrones desacoplado (t.e.d.) (fig. 6 c). Además se mide el gradiente de pH aprovechable por la enzima ATP sintetasa o bomba de protones ( $B.H^+$ ) (fig. 6 d) o sea el gradiente de pH que se forma cuando no se permite que la enzima  $CF_1$  sintetice ATP al no adicionar ADP + Pi. También se miden los cambios de pH en presencia de ADP + Pi, es decir en condiciones fosforilantes.

La combinación de estas medidas permite tener una idea más fiel del comportamiento de una sustancia capaz de interactuar con el sistema fotosintético. En vista de que la actividad herbicida se limita a la interacción con la cadena transportadora de electrones, la membrana del tilacoide o algún sitio cercano a la ATP sintetasa, pero no se ha reportado actividad herbicida de sustancias que interaccionen con las enzimas responsables de la fijación del  $CO_2$ , entonces se puede caracterizar un herbicida inhibidor de la fotosíntesis midiendo el transporte de electrones basal (t.e.b.), acoplado (t.e.a.), desacoplado (t.e.d.) y bomba de protones ( $B.H^+$ ).

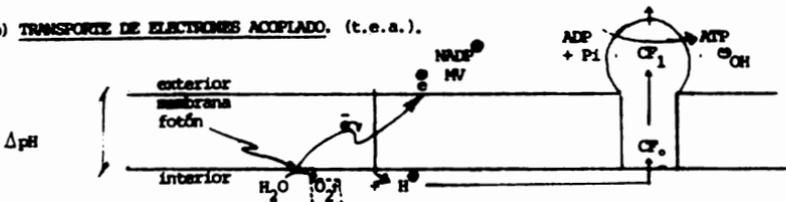
fig. 6 . Se muestra lo que sucede en cada una de las medidas efectuadas en fotosíntesis.

a) TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL. (t.e.b.).



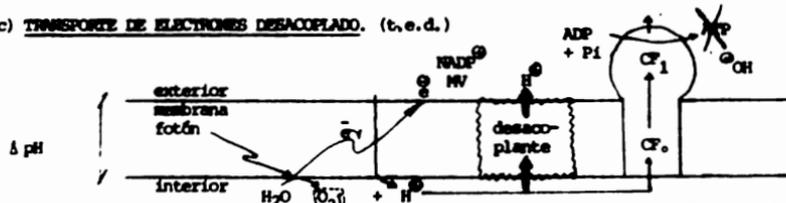
El  $\Delta pH$  no es utilizado por el  $CF_1$  ya que para funcionar requiere  $ADP + P_i$ , los que no se adicionan, por lo tanto no hay síntesis de ATP. Se mide el oxígeno desprendido.

b) TRANSPORTE DE ELECTRONES ACOPLADO. (t.e.a.).



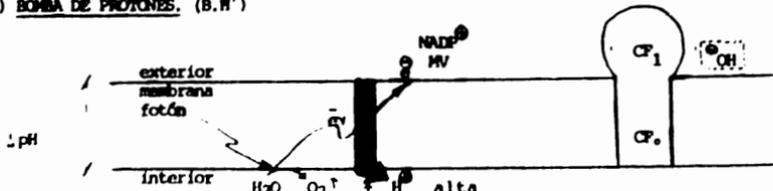
El  $\Delta pH$  es utilizado por el  $CF_1$  para sintetizar ATP en presencia de  $ADP + P_i$ . Se mide el oxígeno desprendido.

c) TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPLOADO. (t.e.d.).



El  $\Delta pH$  es disipado por un reactivo desacoplante y no utilizado por el  $CF_1$  para la síntesis de ATP en presencia de  $ADP + P_i$ . Se mide el oxígeno desprendido.

d) BOMBA DE PROTONES. ( $B.H^+$ )



El  $\Delta pH$  no es utilizado por el  $CF_1$ . Se mide el cambio de alcalinidad externo.

b) Fotosíntesis y herbicidas.

Actualmente el estudio de los mecanismos bioquímicos de la fotosíntesis se llevan a cabo en cloroplastos de clase II (sin doble membrana externa), libres de células. Empleando, como en otras rutas bioquímicas, inhibidores selectivos de determinadas reacciones enzimáticas, esto hacen los herbicidas inhibidores de la fotosíntesis, además al inhibir la fotosíntesis se corta el suministro de energía a la célula y ésta muere y poco a poco toda la planta, un ejemplo muy conocido es el del DCMU ó diurón.

Cerca del 50% de los herbicidas comerciales afectan la fotosíntesis (5), la mayoría de éstos actúan a nivel de la cadena transportadora de electrones entre Q y PQ (4), otros como las 1,2,3-tiadiazolil-fenilureas son inhibidores de la fosforilación ó síntesis de ATP (5), otros como las alquilaminas son desacoplantes (6), se sabe que algunos inhiben la biosíntesis de clorofila (7), pero hasta ahora no hay herbicidas inhibidores de la ruta que asimila el CO<sub>2</sub>.

Se han detectado diferentes sitios de ataque de inhibidores sobre los componentes de la cadena transportadora de electrones (3), (4) (fig. 3). De los cuales tres son sitios de acción de compuestos que son herbicidas. En el sitio 1 actúan sales de dipiridilio, tales como el Diquat y el Paraquat, sacan electrones de la cadena transportadora de electrones evitando que el NADP<sup>+</sup> se pueda reducir, lo que significa que estos compuestos son aceptores de electrones. El HgCl<sub>2</sub> y algunas carbodiimidias son inhibidores del sitio 2, perturban la función del cobre contenido en plastocianina (5). En el sitio 3 actúan compuestos antagónicos a plastoquinona, innibiendo la reoxidación de plastohidroquinona (5). En el sitio 4a actúan un gran número de herbicidas comerciales, el compuesto que los tipifica es el diurón ó DCMU. El sitio 4b es afectado por derivados de carbonil-cianuro-fenilhidrazona (5) aunque también Diurón inhibe en este sitio (5).

Otros compuestos como la perfluidona y las 1,2,3-tiadiazolil-fenilureas, que actúan en los sitios 5 y 6 respectivamente, interaccionan con la membrana del cloroplasto y con la enzima ATP sintetasa, modificando la permeabilidad de la membrana en el caso de la perfluidona, inactivando a la enzima en el caso de las 1,2,3-tiadiazolil-fenilureas ( 5 ).

Los sitios de inhibición son localizados mediante una gran variedad de técnicas bioquímicas y biofísicas, suelen emplearse sistemas artificiales de donador y aceptor de electrones (un donador proporciona electrones a la cadena en determinado paso y un aceptor los acepta en otro) ( 5 ). Esto significa ir probando en partes las reacciones de la cadena y "ver" en donde está afectada por una sustancia externa.

En 1977 Tischer ( 8 ) introdujo una técnica en la cual un inhibidor marcado radiativamente es reemplazado de la membrana por el mismo inhibidor pero sin marcar, cuando el sitio de inhibición es idéntico, lo que sugiere que la unión entre el inhibidor y el receptor en el sitio de acción no es muy fuerte. Muchos herbicidas y todos los que actúan en el sitio 4 interaccionan con una proteína, que afecta la función de un transportador de electrones; esta proteína tiene un área de unión con sitios específicos para diferentes herbicidas, lo que denota la estereoespecificidad de la reacción ( 9 ). Esto se ha demostrado con mutantes en las que la efectividad inhibitoria de un herbicida se pierde pero no la de otro, aunque ambos actúen al mismo nivel en la cadena; ejemplo de esto es la insensibilidad a triazina (un herbicida) pero sensibilidad a Diurón de *Amaranthus* y la adaptación de *Chlorella* a la inhibición de bromo-nitrofenol pero no a la inhibición por Diurón, explicable por la alteración de uno de los sitios de unión de la proteína (10 ).

c) Características de los herbicidas que inhiben la fotosíntesis.

Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis son conocidos como inhibidores de la reacción de Hill, es decir, inhiben el transporte de electrones y de acuerdo con la conducta que presentan en las diferentes mediciones de la reacción de Hill pueden ser; de acuerdo con Moreland (3 ) a) inhibidores del transporte de electrones (I.t.e.); b) desacoplantes (D); c) inhibidores de la transferencia de energía(I.T.E.); d) inhibidores desacoplantes (I.D.) y e) aceptores de electrones (A.ē).

Inhibidores del transporte electrónico. Inactivan o desplazan a uno o más de los transportadores de electrones, se considera que su sitio de acción (fig.3 ,sitio 3 y 4) está localizado cerca del fotosistema II (5 ) y por eso inhiben las reacciones acopladas al mismo, tales como el transporte de electrones basal (t.e.b.), acoplado (t.e.a.), desacoplado (t.e.d.) teniendo como donador de electrones al agua y como aceptor al ferricianuro de potasio ( $FeCl$ ), al  $NADP^+$  ó al metil-viológeno (MV); también inhiben la bomba de protones ( $B.H^+$ ) y la fosforilación acoplada, así como desacopla da. No inhiben ciertas reacciones parciales, como la fosforilación cíclica o fotoreducción de  $NADP^+$  con un donador de electrones que actúe en el fotosistema I (ascorbato + DPIP), estos herbicidas no inhiben la fosforilación oxidativa realizada por la mitocondria. Los herbicidas de este tipo son; fenilureas cloradas, biscarbamatos, s-triazinas cloradas, uracilos sustituidos, piridazinonas, difeniléteres, 1,2,4-triazinonas, azido s-triazinas, ciclopropan-carboxamidas, p-alquilanilidas, p-alquiltioanilidas, aminotriazinonas y urea carbamatos ( 3 ).

Desacoplantes. Son compuestos que separan el transporte de electrones de la fosforilación, los desacoplan. Disipan el gradiente electroquímico y por eso evitan tanto la fosforilación cíclica como la no-cíclica estimulando el transporte de electrones. Los desacoplantes revierten la inhibición del transporte de electrones producida por los inhibidores de

la transferencia de energía (fig.3, sitio 5). La perfluidona es un herbicida que actúa como un desacoplante puro a pH 8 (3). Los compuestos que desacoplan la fotofosforilación también desacoplan la fosforilación oxidativa realizada en la mitocondria.

Inhibidores de la transferencia de energía. Actúan directamente sobre el complejo enzimático de la fosforilación. Inhiben el transporte de electrones y la fosforilación en sistemas acoplados; sin embargo, en la presencia de un reactivo desacoplante que disipa el gradiente electroquímico y libera el flujo de electrones, se evita la fosforilación. Se han descrito como herbicidas de este tipo a las 1,2,3-tiadiazolil-fenilureas (11). En la figura se muestra el sitio que afectan (fig.3, sitio 6) sobre la formación cíclica y no-cíclica de ATP.

Inhibidores-desacoplantes. Son compuestos no específicos que presentan ambas propiedades la de inhibir el transporte de electrones y la de desacoplar; a concentraciones altas se comportan como inhibidores y a concentraciones bajas como desacoplantes. Sus sitios de acción se muestran en la figura No. 3, sitio 4 y 5. Herbicidas como éstos actuando como inhibidores del transporte de electrones inhiben el transporte de electrones basal (t.e.b.), acoplado (t.e.a.) y desacoplado (t.e.d.) con ferricianuro ( $\text{FeCl}$ ) 6 MV como aceptor y agua como donador de electrones; también evitan la bomba de protones y la fosforilación acoplada. No inhiben la fotoreducción del  $\text{NADP}^+$  cuando se usa ascorbato y DPIIP como sistema donador artificial es decir cuando se mide solo PS II. Cuando actúan como desacoplantes presentan sus propiedades, así evitan la fosforilación y estimulan el transporte de electrones. Ejemplos de este tipo de herbicidas son los dinitrofenoles, N-fenil carbamatos, acil-anilidas, benzonitrilos halogenados, imidazoles sustituidos, bromofenoximas, 2,4-dinitroanilinas sustituidas, piridínoles y 1,2,4-tiadiazoles sustituidos (3).



Aceptores de electrones. Estas sustancias tienen potenciales redox semejantes a algún componente de la cadena y pueden competir con alguno de los componentes de dicha cadena y de esta manera son susceptibles de reducirse. Hay compuestos como el ferricianuro, que trabajan de esta manera y sin embargo no son tóxicos. Existen herbicidas como las sales de bipyridilo, Paraquat y Diquat que teniendo potenciales redox entre -300 y -500 mv., pueden aceptar electrones compitiendo con el aceptor del fotosistema I desviando la cadena transportadora de electrones. Mantienen la fosforilación no-cíclica y cíclica, son fotoreducidos al iluminar los cloroplastos en condiciones anaeróbicas e inhiben la fotoreducción de  $\text{NADP}^+$ , esta inhibición no se impide por la adición de DPIP reducido (12).

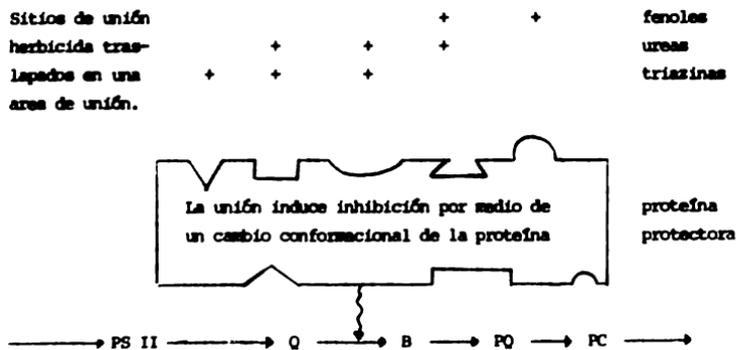


fig. 7 . Representación esquemática de los sitios de unión de herbicidas tales como fenoles, ureas y triazinas sobre una proteína protectora, catalizadora del flujo de electrones desde PS II a PQ.

d) Mecanismo de interacción herbicida con el fotosistema II.

Los componentes de la cadena transportadora de electrones, inmersos en la membrana del tilacoide, se encuentran vinculados a proteínas algunas de las cuales los protegen y mantienen dentro de dicha cadena. Se sabe que los herbicidas del tipo DCMU ó también conocido como diuron interrumpen el transporte de electrones en el sitio de reducción del fotosistema II entre el aceptor primario X-320 y el carrusel de plastoquinona o pool de plastoquinona (que son una serie de moléculas parecidas, quinonas todas que acarrear electrones como si fueran un carrusel) (4). Renger ha elaborado un modelo de la organización funcional y estructural de la transferencia electrónica entre X-320, B y el carrusel de plastoquinona (13), en donde establece que los componentes redox X-320 y B están embebidos en una proteína que regula el transporte electrónico. Experimentos con mutantes resistentes al herbicida atrazina (14), que actúa al mismo nivel que DCMU en la cadena han demostrado que en la proteína hay un área de unión herbicida en la que están varios receptores y subreceptores para todos los inhibidores del tipo DCMU y atrazina (fig.7) (4). Otros experimentos como la incubación de los cloroplastos en tripsina (enzima hidrolítica) evita la inhibición que hace el DCMU, en la presencia de un aceptor de electrones tal como  $K_3Fe(CN)_6$  (4). Estos resultados han permitido postular (13) que el ataque de tripsina cambia las propiedades del área de unión de la proteína con los inhibidores del tipo DCMU y atrazina. (fig. 8)

Actualmente se investiga el mecanismo molecular de la inhibición herbicida y se habla de dos diferentes modos de acción:

a) Uno de ellos es el llamado efecto cinético, en el que la modificación estructural de la proteína debida a la unión con los inhibidores del tipo DCMU puede cambiar la orientación relativa y la separación entre las moléculas involucradas ( X-320, B y plastoquinona) lo que modifica la barre

ra energética alterando la velocidad del transporte de electrones.

b) En segundo lugar el llamado efecto termodinámico, donde la transferencia electrónica entre X-320 y B se regula termodinámicamente a través de sus potenciales redox los que dependen del microambiente existente; al modificarse la proteína debido a la unión con el inhibidor se producen cambios en los potenciales redox del par  $B^-/B$  más bajo que el del par  $X-320^-/X-320$ , y de esta manera se evita el transporte de electrones de una manera termodinámica, el cambio debido al DCMU sobre la reacción  $X-320^- + B \rightleftharpoons X-320 + B^-$  se ha demostrado por medidas de luminiscencia y fluorescencia (15)(16).

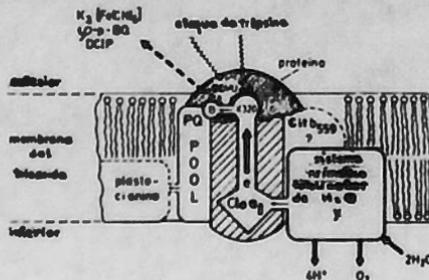


fig. 8 . Esquema simplificado de la organización funcional y estructural del fotosistema II del cloroplasto. Se muestra el sitio de acción del DCMU, Tripsina,  $K_3Fe(CN)_6$ , fenil para benzoquinona p-BQ, y DCIP.

## II. ANTECEDENTES.

### 2. Químicos.

Antecedentes químicos a este trabajo los hay de diferente índole: puramente de síntesis de los compuestos, de transformaciones metabólicas de compuestos adicionados exógenamente en plantas o síntesis letal, y de relación entre estructura y actividad de los compuestos inhibidores de la fotosíntesis que presentan actividad herbicida siendo estructuralmente similares a los aquí probados.

#### a) de síntesis.

1) Precursores del grupo aldehído. (solo los que interesan a este trabajo).

.) protección del grupo aldehído en forma de ditiocetal.

Se pueden preparar ditiocetales por reacción entre el compuesto carbonílico y un alquil tiol o un ditjol catalizando la reacción con ácido (17). Son estables en condiciones básicas y neutras; su hidrólisis ácida conduce al aldehído correspondiente.

..) protección del grupo aldehído en forma de oxima y semicarbazona.

Las oximas y las semicarbazonas se usan más como derivados que como grupos protectores debido a su difícil transformación en el aldehído, no obstante se conocen reactivos que lo pueden hacer. (19,20,21,22,24,25).

Oxima. Se puede preparar adicionando clorhidrato de hidroxilamina disuelto en agua al aldehído en medio básico (18). Se puede quitar en condiciones ácidas (19), aunque también se han reportado métodos oxidativos (20) y otros más que incluyen tratamientos con cloruro de titanio (21) ó con  $Tl(NO_3)$  (22).

Semicarbazona. Se puede preparar colocando el aldehído con el clorhidrato de semicarbazona en presencia de acetato de sodio (23). Por lo general son resistentes al medio básico y sufren hidrólisis bajo condiciones fuertemente ácidas (24); se ha reportado su ruptura en condiciones

suaves ( 25 ).

...) otros precursores del grupo aldehído. Se ha reportado ( 26 ) que se puede llegar químicamente al grupo aldehído desde  $\alpha, \alpha'$ -dibromotolueno por medio de una hidrólisis a  $100^{\circ}\text{C}$  . El  $\alpha, \alpha'$ - dibromotolueno se obtiene por bromación de tolueno en presencia de luz.

ii) Precursores del grupo ácido. (sólo los que interesan a este trabajo).

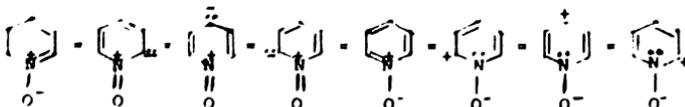
El grupo  $-\text{CH}_2-\text{OH}$  puede oxidarse ( 27a ) al grupo aldehído y este a su vez al grupo  $-\text{CO}_2\text{H}$  ( 27b ). También el grupo  $-\text{CH}=\text{O}$  puede transformarse con  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  y  $\text{HCl}$  concentrado en nitrilo ( 27c ) y el nitrilo a la amida o al ácido correspondiente ( 27d ).

iii) Bromación de anillos aromáticos (sólo los que interesan a este trabajo).

Es bastante común la halogenación de fenoles en posición orto cuando se tiene un grupo orientador orto-para y la posición "para" se encuentra ocupada ( 28 ). También es común que las piridinas con un sustituyente orto director en la posición 4 sean fáciles de bromar en las posiciones 3 y 5 ( 29 ).

iv) N-óxidos de piridina y su nitración.

Los N-óxidos de piridina son usados como intermediarios de síntesis pues activan el anillo de piridina. Por lo que han sido objeto de numerosos estudios ( 30 ). Se conoce su nitración preferentemente en posición para ( 30 ). Los N-óxidos de piridina son interesantes porque poseen un único sistema resonante que contribuye en dos direcciones opuestas, favoreciendo la sustitución electrofílica y nucleofílica.

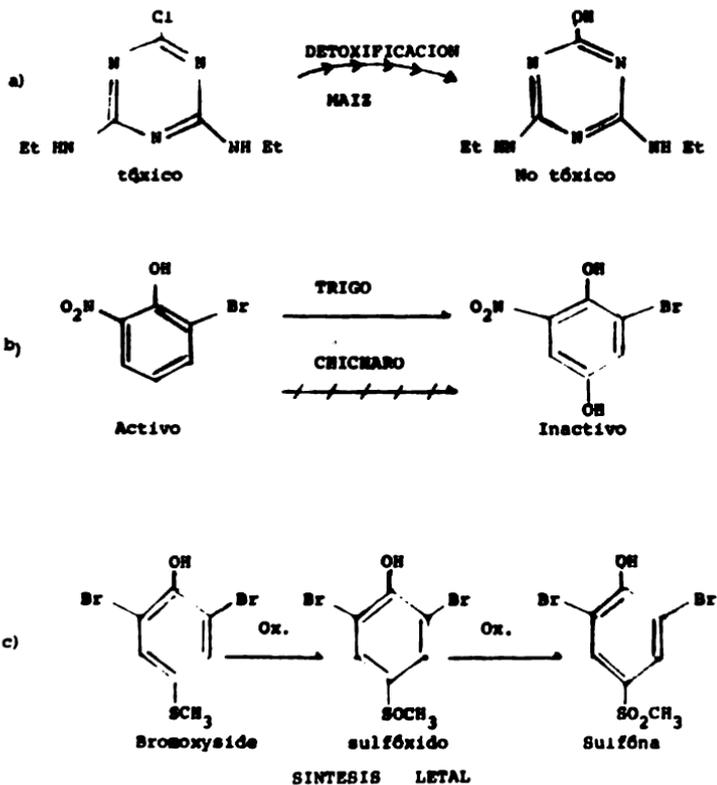


b) síntesis letal.

Se conoce que el metabolismo vegetal es capaz de interactuar con sustancias colocadas exógenamente; ésto, permite a algunas plantas eliminar sustancias tóxicas, este proceso se conoce como detoxificación y es bastante conocido el caso de las triazinas, siendo sab sustancias que afectan a las malas hierbas, no dañan al maíz ya que éste puede metabolizarlas transformándolas en un compuesto no tóxico cambiando un substituyente cloruro por un hidroxilo mediante reacciones enzimáticas (31) (fig. 9a). Por otro lado han encontrado hongos capaces de degradar herbicidas que contienen un grupo hidroxilo (32) como el Fusarium solani que transforma benzonitrilo en ácido benzoico empleando una enzima nitrilasa, ésto se ha considerado como una importante vía de degradación de herbicidas de este tipo. También se sabe que 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído (II), ensayado en este trabajo, forma parte de una ruta metabólica de degradación de tirosina en una Rhodophyceae la Odontalia floccosa (33). Estudios realizados en trigo han revelado detoxificación de compuestos como el 2-bromo-6-nitrofenol al transformarlo en 2-bromo-6-nitro-1,4-hidroquinóna (34), en cambio en chicharo no se puede realizar esta detoxificación. Con estos resultados podemos concluir que el metabolismo de los herbicidas en las plantas varían de especie a especie. (fig. 9b).

En el metabolismo vegetal no solo es posible transformar sustancias tóxicas en no-tóxicas; sino lo contrario es decir, transformar sustancias no-toxicas en tóxicas, este proceso se conoce con el nombre de síntesis letal (fig. 9c). Este tipo de metabolismo es una alternativa que se ha utilizado al diseñar nuevos herbicidas selectivos tal es el caso del bromoxyside que por oxidación se transforma en el

fig. 9 . Se muestran algunos ejemplos de transformaciones químicas realizadas por el metabolismo vegetal.



sulfóxido correspondiente el cuál por otra oxidación, se llega a la sulfona (35) (fig. 9c).

Se han observado diferentes tipos de reacciones en el metabolismo de los herbicidas en las plantas superiores como son: oxidación, descarboxilación, deshalogenación, dealquilación, hidrólisis e hidroxilación (36).

Por ejemplo en el metabolismo de 2,4-diclorofenoxietilamina, ésta es primero oxidada enzimáticamente al aldehído correspondiente, el que a su vez es oxidado al ácido 2,4-D, que tiene actividad reguladora del crecimiento (39). También se conoce (38) que en la ruta metabólica del orntonil (2-cloro-3-(3-cloro-2-metilfenil)propionitrilo) hay una oxidación del aldehído correspondiente al ácido 2-cloro-3-(3-cloro-2-metilfenil)propiónico. Por otro lado hay plantas que transforman 4-hidroxi-3-nitro-benzaldehído en su alcohol y su ácido correspondiente, postulándose que esto ocurre de una manera similar a una reacción de Cannizzero demostrada para el metabolismo de 2,4-diclorofenoxietilamina (39). Una transformación similar es la que sufre el p-hidroxibenzaldehído para formar el ácido p-hidroxibenzoico (40). Además se ha demostrado para compuestos similares al ácido fenoxiacético que grupos como  $\text{CH=O}$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{CONH}_2$ ,  $\text{COOCH}_3$ ,  $\text{CH-OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ,  $\text{CHClCN}$ ,  $\text{CHCl}_2$ , pueden ser hidrolizados por el metabolismo vegetal para dar el aldehído (41) y oxidarlos al ácido correspondiente (42).

En particular se ha demostrado que el ioxinil en las hojas, in vivo, desprende iodo (43) y se transforma en ácido que es altamente tóxico, en cambio cuando el ioxinil se aplica en las raíces de frijol y chícharo (44) no produce toxicidad.

c) relación estructura-actividad de herbicidas inhibidores de la fotosíntesis.

Es posible hacer estudios en la reacción de Hill para entender la potencia de un herbicida en cloroplastos aislados, variando los substituyentes en una posición fija en la estructura del herbicida y observar su efecto en la fotosíntesis para identificar su fitotoxicidad potencial, los compuestos más fitotóxicos son potentes inhibidores de la reacción de Hill. Aunque hay muchos herbicidas comerciales que no inhiben la reacción de Hill, e inhibidores de la reacción de Hill que no son fitotóxicos ( 5 ). La correlación entre estructura química de los herbicidas y su reactividad no garantiza la actividad sobre plantas de una substancia, pero permite diseñar substancias mejores. Es bastante probable que una substancia activa in vitro lo sea también in vivo.

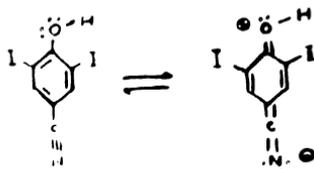
Por otro lado la actividad de una substancia en la fotosíntesis no garantiza su especificidad en ella (hasta ahora). Solamente el conocimiento de todas las contradicciones esenciales o factores que intervienen en el modo de acción de un herbicida harían más predecible su actividad; no obstante el camino planteado hasta hoy ha llevado a consideraciones de gran validez tanto en el mejor conocimiento del proceso fotosintético como en el diseño de nuevos herbicidas.

Hansch ( 45 ) ha relacionado la actividad biológica con la estructura química tomando en consideración parametrizaciones de la estructura química como la desarrollada por Hammett ( 46 ) y revisada por Jaffé ( 47 ) para evaluar los efectos electrónicos, estéricos, y polares ( 48 ) que afectan la reactividad química.

De los estudios que correlacionaron la estructura de los herbicidas con su actividad en fotosíntesis ( 49 ) los autores han obte-

nido los parámetros estructurales requeridos para la actividad de diferentes familias químicas de herbicidas. De acuerdo con el modelo de Hansh sobre los inhibidores de la fotosíntesis (50) (Fig. 10) los requerimientos encontrados son: una cierta lipofilicidad y una función polar, teniendo un grupo N-H unido a un carbono  $sp^2$  deficiente en electrones. Esto permite la formación de un complejo de transferencia de carga, entre el herbicida y una proteína de la membrana del tilacoide reforzado por puente de hidrógeno (al que llamaré Complejo  $\Psi$ ), este modelo presume que la fuerza impulsora primaria de la unión es producto de la formación de este complejo de transferencia de carga  $\Psi$ . Un átomo de nitrógeno soportando una carga positiva puede jugar el mismo papel que un C  $sp^2$  deficiente en electrones (como en las triazinas fig. 10). Factores estéricos pueden dificultar la formación del complejo de transferencia de carga  $\Psi$ . Al formarse el complejo de transferencia de carga  $\Psi$ , se inducen cambios conformacionales en la proteína de la membrana donde interacciona el herbicida. (4).

Por otro lado los 4-hidróxi benzonitrilos halogenados (1) y el ácido 3,5-dibromo-4-hidroxi benzoico (51) se sabe que son activos para inhibir la reacción de Hill aumentando su actividad de acuerdo a la serie:  $I > Br > Cl$  (49). Otros investigadores han encontrado que el ioxinil (3,5-diiodo-4-benzonitrilo) actúa al mismo nivel del DCMU en la cadena transportadora de electrones pero no en el mismo sitio (52). Hansh ha propuesto (50) que el ioxinil está en forma de un equilibrio:



y el complejo de transferencia de carga  $\Psi$  puede formarse; la longitud del enlace  $C=N$  es demasiado corta para la formación ideal de dicho complejo de transferencia de carga  $\Psi$  pero el grupo hidroxilo en posición 'para' aumenta el carácter de doble enlace facilitando la formación del complejo de transferencia de carga  $\Psi$ . Hay evidencia sugiriendo que la actividad de fenoles requiere un grupo atractor de electrones en posición para respecto al hidroxilo (53) (54), no sólo en fotosíntesis sino también en fosforilación oxidativa de mitocondrias (54). También se conoce que compuestos similares tales como la oxima (5-5) aún siendo menos activos que los nitrilos cambian su sitio de acción desde el DCMU hasta el de DBMIB (o cercano a él) en función de la concentración. El aldehído y ácido similares a ioxinil se encontró que también son menos activos sobre la fotosíntesis (49).

Se ha postulado que la actividad de fenoles en la fotosíntesis cuando actúan como desacoplantes es dependiente de su acidez. (50).

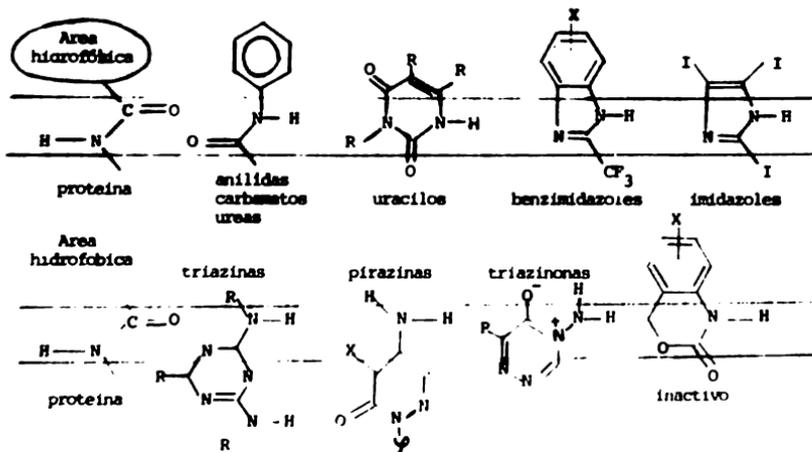


fig. 10. Representación de diferentes familias herbicidas y la posible formación de un complejo de transferencia de carga reforzado por puentes de hidrógeno.

En el presente trabajo se diseñaron nuevos herbicidas inhibidores de la fotosíntesis, de acuerdo con los antecedentes descritos con anterioridad, estos compuestos herbicidas pueden ser activos por sí mismos, ya que cumplen con los requisitos para ello (fenoles orto dihalosustituidos con un grupo atractor en la posición "para" respecto al hidroxilo) (50), también se ensayaron dos piridínoles y un N-óxido de piridina (TABLA 1). Los compuestos probados, a excepción de los derivados de piridina, pueden ser hidrolizados por el metabolismo de la planta mediante un proceso de síntesis letal (p. 24) al 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído cuyo análogo yodado inhibe la fotosíntesis al mismo nivel que el DCMU (p. 19) (49) este aldehído puede ser oxidado al ácido 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzoico cuyo análogo yodado también es activo como inhibidor de la fotosíntesis (49).

Las transformaciones mencionadas anteriormente para los compuestos ensayados necesariamente ocurren a velocidades diferentes para especies diferentes de plantas esto les puede dar selectividad.

**III. RESULTADOS Y  
DISCUSION .**

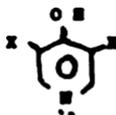
A los compuestos (TABLA No 1 ) se les ensayó su actividad "in vitro" en la fotosíntesis sobre cloroplastos clase II de espinaca (Spinacea oleracea) evaluándose su efecto sobre el transporte de electrones basal (t.e.b.), acoplado (t.e.a.), desacoplado y bomba de protones (p 70). También se les evaluó su actividad herbicida "in vivo" sobre plantas completas de frijol (Phaseolus vulgaris), tomate (Lycopersicum sculentum) y las malas hierbas diente de león (Taraxcum officinale Weber) y la papaverácea (Argemone ochroleuca) conocida como chicalote. (fig. 11).

De las pruebas "in vitro" realizadas con los piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos y además con el 4-nitro-1-óxido de piridina (TABLA No1) sobre cloroplastos (clase II) de espinaca (Spinacea oleracea) podemos decir :

Efecto de piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre la bomba de protones. (p.70)

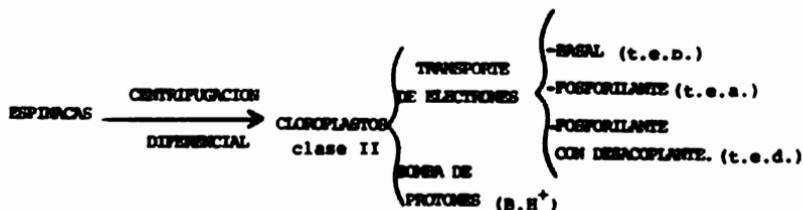
Se observó inhibición drástica de la bomba de protones ( $B.H^+$ ) (TABLA No 2 ) (Gráfica No 1 ) (evaluando la disminución de la actividad del control como % del control lo que significa que cuanto más pequeño es el valor de % del control mayor es la inhibición causada por el herbicida. La gráfica No 1 se obtuvo de la TABLA No 2 . Los compuestos que resultaron ser más activos fueron el conocido como bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxi-benzonitrilo) ( $X=Br; Y=CN$ ); siguiéndole en orden decreciente de actividad el 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído ( $X=Br; Y=CHO$ ), el 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-metil ditiocetal ( $X=Br; Y= \left( \begin{smallmatrix} S \\ \vdots \\ S \end{smallmatrix} \right)$ ) el 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-propan ditiocetal ( $X=Br; Y= \left( \begin{smallmatrix} S \\ \vdots \\ S \end{smallmatrix} \right)$ ) así como el  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-3,5- dibromo-4-hidroxi-tolueno con % del control de 50 a 10 % correspondientes a % de inhibición de 50 a 90 % los cuales son muy buenos valores pues reflejan una potencia alta de los compuestos mencionados a las concentraciones ensayadas. Los demás compuestos ensayados fueron prácticamente inactivos, ya que inhiben entre 5 y 70 % respecto al control.

TABLA No. 1 Compuestos piridinoles y fenoles 2,4,6 substituidos ensayados como herbicidas inhibidores de la fotosíntesis. También se reporta el 4-nitro-1-óxido-piridina.



No.	X	Y	PW	FORMULA	Pf. °C
I	H	CH=O	122	$C_7H_6O_2$	115
II	Br	CH=O	280	$C_7H_4Br_2O_2$	180
III	Br		358	$C_9H_{10}Br_2OS_2$	59
IV	Br		370	$C_{10}H_{10}Br_2OS_2$	133
V	Br	CH=NOH	295	$C_7H_5Br_2NO_2$	198
VI	Br		337	$C_8H_7Br_2N_3O_2$	2300
VII	Br	CH <sub>3</sub>	266	$C_7H_6Br_2O$	45
VIII	Br	—	253	$C_5H_3Br_2NO$	275
IX	Br		424	$C_7H_4Br_4O$	165
XI	H	—	95	$C_5H_5NO$	125
XII	H	CN	119	$C_7H_5NO$	96
XIII	Br	CN	277	$C_7H_3Br_2NO$	179
XIV			124	$C_5H_4N_2O_2$	160

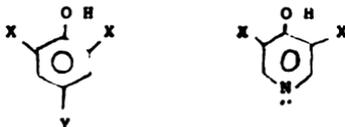
fig.11 . Pruebas realizadas con los derivados piridínoles y fenoles 2, 4,6 substituidos: a) "in vitro" en cloroplastos clase II de espinaca (*Spinacea oleracea*)



b) "in vivo" en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Lycopersicum esculentum*), diente de león (*Taraxacum officinale* Weber) y chicalote (*Argemone ochroleuca*).



TABLA No. 2 . Efecto de herbicidas piridinoles y fenoles 2,4,6 sustituidos sobre la bomba de protones (B.H<sup>+</sup>). En cloroplastos (clase II) de espinaca (*Spinacea oleracea*). La mezcla de reacción y demás condiciones se describen en el texto (p70).



COMPUESTO

<u>X</u>	<u>Y</u>	( $\mu$ M)	eqH <sup>+</sup> ( $\times 10^{-2}$ )	% CONTROL
		0	4.086	100*
H	CH=O	16	3.4	83
		40	4.0	98
		66	3.1	76
Br	CH=O	21	2.6	64
		53	1.6	39
		86	1.2	29
Br		17	3.1	76
		41	2.3	56
		68	1.9	47
Br		16	3.2	78
		40	2.2	54
		66	1.1	27
Br	CH=NOH	17	4.0	98
		41	3.1	76
		68	3.5	86
Br		17	3.1	76
		41	3.8	93
		68	3.4	83

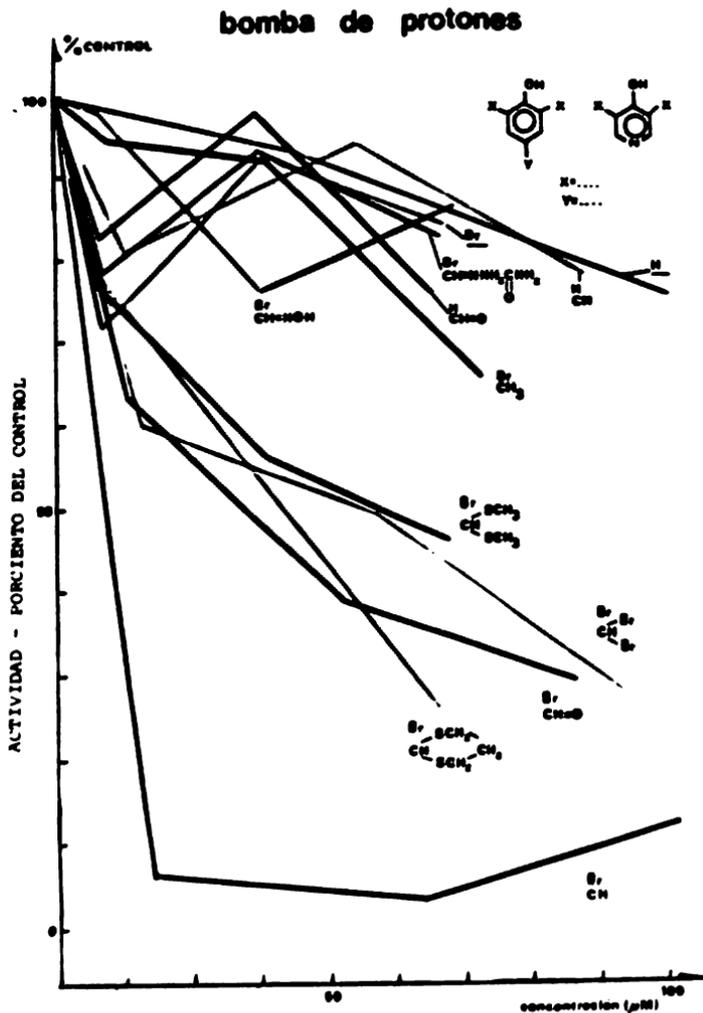
TABLA No. 2. (continúa).

## COMPUESTO

<u>X</u>	<u>Y</u>	( $\mu$ M)	eqR <sup>+</sup> ( $\times 10^{-2}$ )	% CONTROL
		0	3.8	100*
Br	CH <sub>3</sub>	10	3.7	98
		44	3.5	92
		73	2.5	66
Br	—	17	2.7	98
		42	3.5	92
		67	2.5	66
Br		23	2.3	60
		57	1.9	50
		95	1.1	29
<hr/>				
		0	3.2	100*
H	—	45	3.0	94
		118	2.2	69
		190	2.5	78
H	CN	21	2.6	81
		55	3.0	94
		89	2.5	78
Br	CN	24	0.2	6.3
		64	0.1	3.1
		103	0.4	12.5

\* corresponden a los controles de las medidas abajo de ellas.

Gráfica No. 1. Inhibición de la bomba de protones (B.H<sup>+</sup>) por herbicidas piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre cloroplastos (clase II) de espinaca (*Spinacea oleracea*). La mezcla de reacción y demás condiciones se describen en el texto (p70). Se graficó el control vs. concentración del compuesto de la TABLA No. 2 .



Efecto de piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre el transporte de electrones

La inhibición del transporte de electrones no-cíclico desde  $H_2O$  hasta metil-viológeno (MV) se evaluó como la disminución de la actividad del control o  $\frac{v_{t.e. \text{ con herbicida}} \times 100}{v_{t.e. \text{ control}}}$  donde  $v_{t.e. \text{ control}}$  es

la velocidad del transporte de electrones en ausencia de herbicida y  $v_{t.e. \text{ con herbicida}}$  es la velocidad del transporte de electrones con herbicida. Este experimento se realizó de la manera señalada en p 74. Los resultados de estos experimentos se discuten separadamente como transporte de electrones basal (t.e.b.), acoplado (t.e.a.) y desacoplado (t.e.d.) en seguida :

Efecto de piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre el transporte de electrones en condiciones basales (t.e.b.) (p74)

En la gráfica No. 2 . se observa el efecto de los piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre el transporte de electrones basal (p74) (t.e.b.) encontrándose que los herbicidas más activos son el bromoxinil ( $X=Br; Y=CN$ ) y en orden decreciente de actividad le sigue el 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído ( $X=Br; Y=CHO$ ), la semicarbazona del 3,5-dibromo-4-hidroxi benzaldehído ( $X=Br; Y=CHNNHCONH_2$ ) con valores de inhibición de 90, 90 y 60 % respectivamente, los demás compuestos probados (TABLA No 1) presentan poca o nula actividad inhibitoria del t.e.b. a las concentraciones ensayadas. Además en la gráfica No 2 . puede apreciarse la extraordinaria capacidad estimulante que tiene el 4-nitro-1-óxido de piridina observándose que estimula éste transporte de electrones cerca del 300 por ciento en una concentración de 400  $\mu M$  . Al comparar la gráfica No 2. con la gráfica No 1. observamos que el bromoxinil ( $X=Br; Y=CN$ ) y el 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído son inhibidores muy potentes tanto de la bomba de protones como del t.e.b. en cambio los tiscetales 3,5-dibromo-

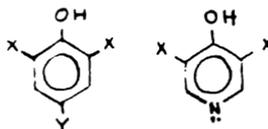


4-hidroxi-gem-metil ditiocetal ( $X=Br; Y= \begin{matrix} S^- \\ S^- \end{matrix}$ ) y 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-propan ditiocetal ( $X=Br; Y= \begin{matrix} S \\ S \end{matrix}$ ) además del 4,4'-dibromo-3,5-dibromo-4-hidroxi-tolueno ( $X=Br; Y= \begin{matrix} Br \\ Br \end{matrix}$ ) son muy buenos para inhibir la bomba de protones en cambio la semicarbazona del 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído ( $X=Br; Y=CHNNHCONH_2$ ) inhibe el t.e.b. pero no a la bomba de protones. Los demás compuestos ensayados (TABLA No 1) fueron muy poco activos.

Efecto de piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre el transporte de electrones en condiciones fosforilantes o acoplado (t.e.a.)

Se evaluó la actividad de los piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre cloroplastos (clase II) de espinaca (*Spinacea oleracea*) midiendo el transporte de electrones no-cíclico en condiciones fosforilantes con  $ADP+P_i$ , es decir acoplado (t.e.a.) desde agua hasta metilviológeno tal como se describe en la p. 74. Los resultados encontrados se observan en la TABLA No. 3, columna de t.e.a.; los datos indican que todos los compuestos ensayados inhiben el t.e.a. unos más que otros, y en la gráfica se observa mejor el efecto, resultando ser más activos el bromoxinil ( $X=Br; Y=CN$ ), después el 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído ( $X=Br; Y=CHO$ ) enseguida el 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-metil ditiocetal ( $X=Br; Y= \begin{matrix} S^- \\ S^- \end{matrix}$ ) y finalmente la 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldoxima ( $X=Br; Y=CHNOH$ ) con valores de inhibición de 80, 80, 50 y 45 % respectivamente. Al comparar el efecto de estos compuestos sobre el t.e.a. y t.e.d. se observa que el 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-metil-ditiocetal ( $X=Br; Y= \begin{matrix} S^- \\ S^- \end{matrix}$ ) inhibe el transporte de electrones acoplado hasta un 50 % en cambio no afecta al t.e.b. por lo que se deduce que es un inhibidor específico del t.e.a. ya que también inhibe la bomba de protones (Gráfica No 1). Además la 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldoxima ( $X=Br; Y=CHNOH$ ) solo afecta al t.e.b. y t.e.a. (Gráficas 2 y 3) pero no a la bomba de protones (gráfica No 1).

TABLA No.3 . Efecto inhibitorio de herbicidas piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre el transporte de electrones no-cíclico de  $H_2O$  a MV, acoplado (t.e.a.) y desacoplado (t.e.d.) con etilamina 70 mM. En cloroplastos (claseII) de espinaca (*Spinacia oleracea*). La mezcla de reacción y demás condiciones se describen en (P74). Se lo se tabulan los promedios de los experimentos hechos por triplicado.



COMPUESTO		( $\mu$ M)	(t.e.a.)		(t.e.d)	
X	Y		$\frac{\mu\text{mol e}^-}{\mu\text{r}-\text{mg Clorof.}}$	%Control	$\frac{\mu\text{mol e}^-}{\mu\text{r}-\text{mg Clorof.}}$	%Control
H	CB-O	0	460	100*		
		69	390	85	929	202
		112	296	64	869	189
		173	440	96	748	163
Br	CB-O	0	252	100*		
		37	49	19	-22	-8
		90	44	18	-22	-9
		146	63	25	-15	-17
Br		0	109	100*		
		29	105	97	84	77
		71	84	78	67	62
		115	101	93	105	96
Br		0	385	100*		
		28	258	67	591	154
		68	197	51	502	131
		111	178	46	478	124
Br	CB-NOH	0	213	100*		
		29	154	72	297	140
		0	323	100*		
		71	214	66	502	155
115	176	54	544	169		
Br		0	360	100*		
		29	312	87	248	69
		71	312	87	228	63
		115	244	68	160	44

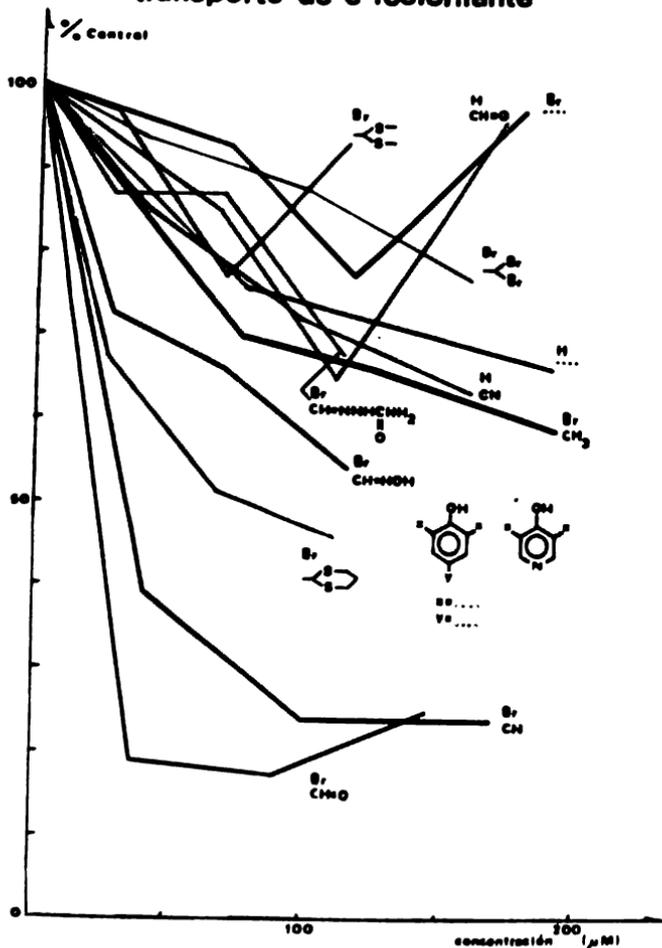
TABLA No. 3 . (continúa)

COMPUESTO		(µM)	(t.e.a.)		(t.e.d.)	
X	Y		$\frac{\text{Meq } \sigma}{\text{hr-mg Clorof.}}$	%Control	$\frac{\text{Meq } \sigma}{\text{hr-mg Clorof.}}$	%Control
Br	CH <sub>3</sub>	0	319	100*		
		77	223	70	525	165
		125	211	66	528	166
		193	188	59	446	140
Br	—	0	477	100*		
		72	440	92	616	129
		118	368	77	549	115
		182	465	98	489	103
Br	Br	0	305	100*		
		41	286	94	450	148
		99	267	88	270	88
		162	235	77	204	67
H	—	0	410	100*		
		78	311	76	815	199
		192	272	66	766	187
		313	157	38	507	124
H	CN	0	229	100*		
		41	251	87	423	146
		101	209	72	357	123
		164	184	64	345	119
Br	CN	0	425	100*		
		43	169	40	29	7
		104	103	24	0	0
		169	103	24	0	0

\* corresponde al control de las medidas inferiores.

Gráfica No. 3 . Inhibición del transporte de electrones no-cíclico de H<sub>2</sub>O a MV en condiciones fosforilantes o acopiado (t.e.a) por herbicidas piridínoles y fenoles 2,4,6 substituidos sobre cloroplastos (clase II) de espinaca (Spinacea oleracea). La mezcla de reacción y demás condiciones se describen en (p 74). Se grafica %control vs. concentración del compuesto de la tabla No. 3 , columna (t.e.a.). Todos los experimentos se hicieron 3 veces.

### transporte de e fosforilante



Efecto de piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre el transporte de electrones desacoplado (t.e.d.).

En la evaluación de la actividad de los piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos en cloroplastos (clase II) de espinaca (Spinacea ole-racea) sobre el transporte de electrones no-cíclico de  $H_2O$  a MV desacoplado con etil amina 70 mM (t.e.d.) tal como se describe en la p75. Los resultados encontrados (TABLA No 3 , columna t.e.d.) (Gráfica No 4 ) se muestran claramente que la presencia del desacoplante etil amina en el medio de ensayo produce dos tipos de comportamiento de los compuestos a saber: los herbicidas que acentúan la inhibición del t.e.d. y que son el bromoxinil (X=Br;Y=CN), el 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehido (X=Br;Y=CHO) y en menor grado la semicarbazona de 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído (X=Br;Y=CHNNHCONH<sub>2</sub>) y el 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-metil ditiocetal (X=Br;Y=  $\begin{matrix} S \\ \diagdown \\ \diagup \\ S \end{matrix}$  ) estos resultados sugieren que estos compuestos actúan como inhibidores de la cadena transportadora de electrones, ya que no se revierte su acción inhibitoria del t.e.a. con el desacoplante etil amina; en cambio el otro grupo de herbicidas revierten su efecto inhibitorio del t.e.a. con el desacoplante etil amina estos compuestos son el 4-hidroxi piridina (X=H;Y=—), el 4-hidroxi-benzaldehído (X=H;Y=CHO), la 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldoxima (X=Br;Y=CHNOH) y en menor grado el 3,5-dibromo-4-hidroxi-tolueno (X=Br;Y=CH<sub>3</sub>), el 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-propan ditiocetal (X=Br;Y=  $\begin{matrix} S \\ \diagdown \\ \diagup \\ S \end{matrix}$  ) y el 4-hidroxi-benzonitrilo (X=H;Y=CN) estos resultados indican que la acción de últimos compuestos es la de inhibir la transferencia de energía puesto que aceleran el transporte de electrones en presencia del desacoplante etil amina (Grafica No 4 ) indicando que el herbicida no actúa a nivel de la cadena t.e. sino a nivel de la síntesis de ATP .



Tanto el experimento correspondiente al transporte de electrones acoplado (t.e.a.) como el desacoplado (t.e.d.) se realizaron por triplicado; en la TABLA No 3 se tabulan las velocidades del transporte de electrones acoplado y desacoplado en microequivalentes de electrones transportados por hora-miligramo de clorofila ( $\mu \text{ eq } \bar{e} / \text{hr-mg Clorof.}$ ), la disminución de la actividad del control en % del control definido como se mencionó anteriormente (p37) se tabulan unicamente los promedio de las tres medidas realizadas,

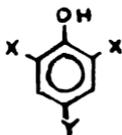
Análisis de la actividad herbicida in vitro de piridinoles y fenoles 2,4,6-substituidos.

En la TABLA No. 4 se observa la actividad inhibitoria de los herbicidas 2,4,6-substituidos más activos evaluada como  $pI_{50}$  que es el  $-\log I_{50}$  donde  $I_{50}$  es la concentración a la cual se logra el 50 % de inhibición, ésta se expresa en concentración molar. El significado de  $pI_{50}$  es el siguiente entre más activo es el compuesto menor es la concentración requerida para inhibir en un 50 % y mayor es el valor del  $pI_{50}$ , es decir  $pI_{50}$  y actividad son directamente proporcionales. Los compuestos que no tienen valor de  $pI_{50}$  en la TABLA No 4 es porque a las concentraciones usadas no alcanzan a inhibir en un 50 %. Cabe señalar que los valores correspondientes a bomba de protones es la primera vez que se reportan al igual que los correspondientes al transporte de electrones desacoplado. En el caso del transporte de electrones basal y acoplado solo estaba reportado el valor del bromixinil (X=Br;Y=CN) 4.75 y 5.7 respectivamente y el de la 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldoxima (X=Br;Y=CHNOH) para el caso del transporte de electrones acoplado 3.0 (49) (50). En el primero de los tres valores anteriores (4.75) la discrepancia con el aquí obtenido es mínima (de 0.01 unidades de  $pI$ ) sin embargo la discrepancia de los otros dos valores con

los aquí obtenidos es mayor lo cual se puede deber a la gran incertidumbre de los experimentos que se tienen que hacer para encontrar dichos valores. No obstante se presenta una alternativa muy nueva e interesante la no constancia de los valores de  $pI_{50}$  en las diferentes mediciones de la actividad fotosintética lo que sugiere que los compuestos ensayados actúan de diferente forma pues por ejemplo el bromoxinil ( $X=Br; Y=CN$ ) es más activo en t.e.b. y  $B.H^+$  en cambio el 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído es más activo en el t.e.d.. Para continuar con esta alternativa habría que afinar el método de determinación de los  $pI_{50}$  y asociarlo con diferentes mecanismos de acción cuantando por ejemplo la cantidad de sitios de acción de los diferentes herbicidas.

En la TABLA No. 4 también se observa la selectividad de algunos compuestos por determinadas formas de medición de la actividad fotosintética tal es el caso de la 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldoxima, ( $X=Br; Y=CHNOH$ ) que al igual que la semicarbazona del 3,5-dibromo-4-hidroxi-benzaldehído son más activas en t.e.d. y no afectan en un 50 % la bomba de protones  $B.H^+$  o el caso de 3,5-dibromo-4-hidroxigem-metil ditiocetal que es más específico para la bomba de protones; en el caso del 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-propan ditiocetal éste es muy activo en el t.e.d.. El 3,5-dibromo-3,5-dibromo-4-hidroxi-tolue no solo se ensayó su actividad en la bomba de protones. La alternativa es, pues, discernir diferentes modos de acción aún para herbicidas del mismo tipo que actúen al mismo nivel en la cadena transportadora de electrones usando diferentes formas de medir la actividad fotosintética .

TABLA No.4 . Actividad inhibitoria "in vitro" de herbicidas piridinoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre cloroplastos (clase II) de espinaca (Spinacea oleracea). La manera de medir la bomba de protones ( $B.H^+$ ), el transporte de electrones en condiciones basales (t.e.b.) , acoplado (t.e.a.) y desacoplado con etilamina 70 mM (t.e.d.) se describe en el texto (p70-77).  $I_{50}$  es la concentración (M.) a la cual se observa el 50% de inhibición y  $pI_{50} = -\log I_{50}$

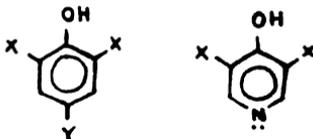


COMPUESTO		<u>(B.H<sup>+</sup>)</u>		<u>(t.e.b.)</u>		<u>(t.e.a.)</u>		<u>(t.e.d.)</u>	
<u>X</u>	<u>Y</u>	$pI_{50}$	$I_{50}$	$pI_{50}$	$I_{50}$	$pI_{50}$	$I_{50}$	$pI_{50}$	$I_{50}$
Br	CH	4.74	18	4.74	18	4.46	35	4.64	23
Br	CH=O	4.42	38	4.58	26	4.62	24	4.92	12
Br		4.36	44	—	—	4.10	80	—	—
Br		4.24	58	—	—	—	—	4.64	23
Br		4.24	58	—**	—	—**	—	—**	—
Br	CH=NOH	—	—	—	—	3.85	140	4.05	90
Br	CH=NNHC(=O)NH <sub>2</sub>	—	—	3.89	130	—	—	4.62	24

\*  $I_{50}$  esta expresado en  $\mu M$

\*\* no se ensayó en estas pruebas.

De acuerdo con la conducta de los compuestos piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos mostrada en las pruebas "in vitro" sobre cloroplastos aislados (según p. 68.) de clase II de espinaca (Spinacea oleracea) estos compuestos pueden agruparse de la siguiente manera:



a) Inhibidores del transporte de electrones. Los que inhiben el t.e.b., el t.e.a y el t.e.d. son :



b) Inhibidores de la transferencia de energía. Los que inhiben el t.e.a. pero no el t.e.d. son :



El Inhibidor  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-3,5-dibromo-4-hidroxi-tolueno tiene los dos comportamientos; además tal parece que el compuesto 4-nitro-1-óxido de piridina es un desacoplante bastante potente ya que acelera drásticamente el transporte de electrones a bajas concentraciones de compuesto comparado con las concentraciones requeridas por las alquilaminas.

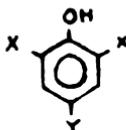
Actividad herbicida "in vivo" de piridínoles y fenoles 2,4,6-substituidos sobre plantas enteras.

Los resultados de las pruebas "in vivo" realizadas según se describe (p 78) en plantas enteras de frijol (Phaseolus vulgaris), diente de león (Taraxacum officinale W.), chicalote (Argemone ochroleuca) y tomate (Lycopersicum esculentum) (clasificadas de acuerdo con ref 58) se muestran en TABLA No. 5. En dicha tabla se observa la actividad relativa de los compuestos más activos su apreciable selectividad sobre determinadas especies cabe recalcar el caso de 3,5-dibromo-4-hidroxá-benzaldóxima el cual es el único de los compuestos que preferentemente actúa más enérgicamente sobre las malas hierbas utilizadas (diente de león y chicalote)

No obstante las incertidumbres bastante grandes de los experimentos "in vitro" (alrededor del 10% del control) reflejada en la obtención de algunos valores negativos, que en realidad deben ser prácticamente de cero, se encuentra una correlación entre las actividades de los compuestos probados "in vitro" con su actividad "in vivo" lo que es bastante interesante y útil para el diseño de nuevos herbicidas selectivos.

.

TABLA No.5 . Actividad herbicida "in vivo" de piridínoles y fenoles 2,4,6 sustituidos al aspergerlos a saturación sobre 9 plantas de dife-rentes especies en soluciones de 2000 ppm como se menciona en el texto (p78) (en el caso de tomate solo se utilizó una planta por cada compuesto y su control). La escala es arbitraria 10 significa que el compuesto es muy activo, 5 que el compuesto es medianamente activo y — significa que el compuesto es inactivo



Actividad herbicida sobre :

<u>X</u>	<u>Y</u>	Actividad herbicida sobre :			
		Frijol	Diente de León	Chicalote	Tomate
		<u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u>	<u>Taraxcum</u> <u>officinale W.</u>	<u>Argemone</u> <u>ochroleuca</u>	<u>Lycopersicum</u> <u>sculentum</u>
Br	CN	6	5	10	6
H	CN	1	-	4	5
Br	CH=NOH	1	3	6	5
Br		1	-	1	-
Br		1	-	-	-
Br	CH=O	3	-	2	4

**IV . P A R T E E X P E R I M E N T A L**

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer. Los espectros de absorción en el infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 337. Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en un espectrómetro analítico Varian A-60, utilizando dimetil sulfoxido deuterado y/o cloroformo deuterado, los protones ácidos se intercambiaron con agua - deuterada ( $D_2O$ ), se empleó como referencia interna el tetrametil silano; el desplazamiento químico está expresado en partes por millón (ppm), utilizando el parámetro  $\delta$ ,

Las lecturas de clorofila fueron hechas en un espectrofotómetro Carl Zeiss modelo PMQ II. Las cromatografías en capa fina se efectuaron usando como adsorbente sílice GF-254 de Merck, utilizando como reveladores luz ultravioleta y yodo. Las variaciones de pH fueron leídas en un medidor de pH marca Beckman.

**ORGANICA .**

#### IV. PARTE EXPERIMENTAL .

##### Síntesis de 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído ( II ) (fig.13e)

De acuerdo con Paal (28) , en un matraz de bola con agitación magnética se disolvió 1 g ( 0.0082 moles ) de 4-hidroxibenzaldehído (pf. 115-6°C) en 2.35 ml ( 0.04 moles ) de ácido acético glacial (en una proporción 1:5) , mientras ésto sucedía se preparó una solución de bromo , colocando en un vaso de precipitados 0.5 ml de ácido acético glacial ( 0.009 moles ) agregando 0.9 ml de bromo ( 0.0086 moles ) , la mezcla se agitó con precaución hasta que se disolvió el bromo y se colocó en un embudo de adición ; por medio del cual se adicionó lentamente al matraz de reacción . Terminada la adición se continuó la agitación 15 min. y la mezcla se vertió en agua precipitando el producto (desde café hasta blanco dependiendo de la pureza de los reactivos); a partir de este momento se trabajó rápidamente ya que el producto se oxida fácilmente en presencia de aire . Se filtró el precipitado y se recristalizó de etanol agua o de acetona hexano . Si el compuesto recristalizado no está suficientemente puro se recomienda sublimarlo . Se obtuvieron 1.63 g ( 0.0057 moles ) de 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído . Rendimiento 71% , pf. 180-1°C .

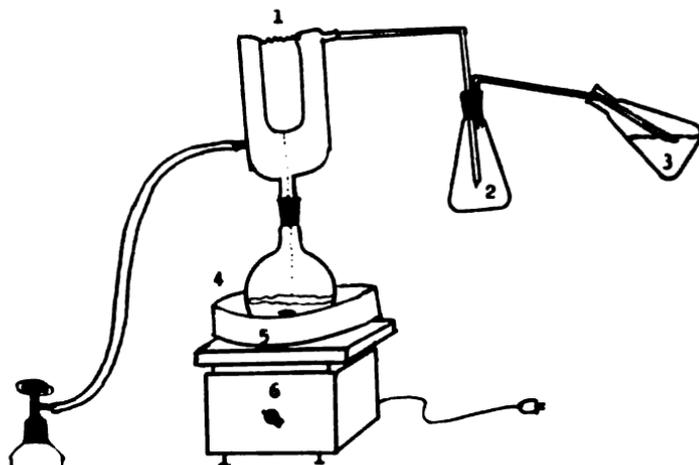
I.R.  $\bar{\nu}$  max. (cm<sup>-1</sup>) : ( en pastilla ) 3150 (O-H) m ; 2860 (C-H) aldehído d ; 1680 (C=O) f ; 600 (C-Br) m ; la zona de la huella digital fue diferente a la de la materia prima .

P.M.P. (δ) : 9.96 (s, 1H, ArC-H) ; 8.15 (s, 2H, Ar-H) ; 6.8-5.3 con máx. en 6.25 (señal ancha, 1H, ArO-H) D<sub>2</sub>O .

##### Síntesis de 3,5-dibromo-4-hidroxibenzal-gem-metil-ditiocetal ( III ) . (fig.13f)

Se sintetizó adaptando la técnica general para tiocetales (17) .

Fig. 12 . Aparato para la síntesis de  
3,5-dibromo-4-hidroxi-benzal-  
gen-metil-ditiocet:1 (III)



- 1 Hielo seco-acetona
- 2 Trampe de seguridad
- 3  $\text{KMnO}_4$  y  $\text{NaOH}$
- 4 matr az de reaccion
- 5 baño de hielo seco-acetona
- 6 base de agitación
- 7 tanque de  $\text{CH}_3\text{SH}$

Se disolvieron 5 g (0.01786 moles) del 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído en dicloro metano, dentro de un matraz de bola con agitación magnética y una trampa de hielo seco-acetona (ver fig.12 ). Al matraz se le adicionaron 5 gotas de éterato de trifluoruro de boro ( o una cantidad catalítica de ácido p-toluen sulfónico).El matraz de bola se mantuvo a una temperatura de -40°C con un baño de hielo seco-acetona .A la salida de la trampa de hielo seco-acetona se colocó un frasco lavador de seguridad y por último otra trampa que contenía una solución de  $\text{KMnO}_4$  en NaOH al 10% para oxidar el metantíol que no reacciona .El metantíol gaseoso se hace pasar a la trampa que contiene hielo seco-acetona en donde se condensa y cae gota a gota en la solución de reacción , se cuentan las gotas (1gota=0.02-0.05 ml) hasta completar el número de moles requerido (0.018 moles) .Al finalizar la adición se eliminó el disolvente y el precipitado obtenido se recristalizó de etanol-hexano .Se obtuvieron 5.2 g (0.015 moles) .Rendimiento 82% . Pf. 59-60°C .

I.R.  $\bar{\nu}$  max. pastilla ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3350 (O-H) m ; 3030 (C-H) aromático d ; 2900 (C-H) alifático m ; 1550 m , 1470 f (C=C) ; 570 (C-Br) m .  
 R.M.N.( $\delta$ ): 8.3-9.5 con máx. en 9 (señal ancha, 1H, ArO-H) i  $\text{D}_2\text{O}$  ; 7.5 (s, 2H , Ar-H) ; 4.7 (s, 1H , ArC-H) ; 2.1 (s, 6H ,  $\text{CH}_3$ -S) .

#### Síntesis de 3,5-dibromo-4-hidroxibenzal gem propan ditiocetal

( IV ) . ( fig. 13g )

Se adaptó una técnica general para tioracetales ( 17 ) . Se disolvieron 4 g (0.014 moles) de 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído en benceno seco (o dicloro metano ) , se le adicionaron 1.5 ml (0.0147

moles ) de propanditiol .La reacción se cataliza con 5 gotas de e terato de trifluoruro de Boro ( o una cantidad catalítica de ácido p-toluen sulfónico) .La reacción se efectuó en un matraz de bola con una trampa de Stark , llena de mañas moleculares (para despla zar el equilibrio de la reacción sacando el agua que se forma en la misma) y un refrigerante de agua ;la mezcla de reacción se pu so a reflujo durante 7 horas ,al final de las cuales se neutralizó con bicarbonato de sodio a pH=7 .Posteriormente se hicieron lavados con agua y se eliminó el disolvente por medio de vacío . Se obtuvieron 5.1 g ( 0.0137 moles) de producto .Rendimiento 60%. Pf. 133-4°C .

I.R.  $\bar{\nu}$  máx. pastilla : 3400 (O-H ) f ; 3030 (C-H) aromático d ; 2890 (C-H) alifático m ; 1360 f, 1480 f (C=C) ; 570 (C-Br)m . R.M.P. ( $\delta$ ): 7.5 ( s , 2H , Ar-H ) ; 5.7 ( s , 1H , ArO-H )  $D_2O$  ; 5.2 ( s , 1H , ArC-H ) ; 1.6-3.3 ( m , 6H , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ) .

Síntesis de la semicarbazona del 3,5-dibromo-4-hidroxibenzal-  
dehido (VI) . (fig. 13h)

Se disolvieron 0.5 g. (0.0018 moles) .Se adicionaron 0.199 g (0.001 moles ) de clorhidrato de semicarbazida disueltos en 4 ml de agua .La reacción fue inmediata , el precipitado formado se filtró y se secó en una estufa a 100°C obteniéndose 0.499 g (0.0017 moles) de producto .Rendimiento 82% ,el producto no funde a 300°C. I.P.  $\bar{\nu}$  máx .pastilla (cm<sup>-1</sup>) : 3480 (N-H) primaria f ; 3355 (N-H) secundaria f ; 3200 (O-H) f ; 1660 (C=O) f ; 700 (C-Br)d R.M.P. ( $\delta$ ): 11.2 ( s , 1H , -NH-CO )  $D_2O$  ; 7.9 ( s , 2H , Ar-H ) ; 7.7 ( s , 1H , Ar-CH=N- ) ; 6.4 ( s , 2H , O=CNH<sub>2</sub> )  $D_2O$  ; 3.7-3.1 con máx. en 3.4 ( señal ancha , 1H , ArO-H )  $D_2O$  .

Síntesis de 3, 5-dibromo-4hidroxibenzaldoxima. (V). (fig13c)

Se obtuvo modificando el método empleado por Wentworth y Brady (18), como sigue: se pesaron 0.28 g (0.001 moles) de 3,5 dibromo-4-hidroxibenzaldehído, se adicionó 1 ml de hidróxido de sodio al 10% (0.0025 moles) y 2 ml de agua junto con 0.28 g (0.001 moles) de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en agua.

La formación del precipitado fue inmediata. El producto se filtró y se secó en estufa a 10u°C obteniéndose 0.28 g (0.00095 moles) de 3,5-dibromo-4-hidroxybenzaldoxima. Rendimiento 94%. Pf. 198-9°C.

I.R.  $\bar{\nu}$  máx. (cm<sup>-1</sup>) pastilla: 3300 (O-H) f ; 3050 (C-H) aromático d ; 2920 (C-H) alifático d ; 950 (N-O) f 590 (C-Br) f .

R.M.P. ( $\delta$ ): 7.9 (s, 1H Ar-CH=N-); 7.65 (s, 2H Ar-H) ; 3.9-2.7 con máx. en 3.3 (señal ancha, 1H, ArO-H)  $\text{D}_2\text{O}$ ; 2.55 (s, 1H, =NO-H).

Síntesis de 3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo (Bromoxinil)(XIII) (fig13)

En un matraz de bola se disolvieron 2 g (0.0168 moles) de 4-hidroxibenzonitrilo (pf. 96-7 °C) en 9.5 ml de ácido acético glacial. Por otro lado en un vaso de precipitados se disolvieron 1.8 ml (0.035 moles) de bromo en 5 ml de ácido acético glacial el cual se adicionó al 4-hidroxibenzonitrilo mediante un embudo de adición, gota a gota. La reacción es exotérmica. Terminada la adición se continuó la agitación por 15 min., después de lo cual se vertió la mezcla en agua apareciendo un precipitado (el pH debe de ser ácido). El precipitado se filtró y se sublimó. Se obtuvieron 3.31 g (0.012 moles) de 3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo. Pf 179°C.

I.R.  $\bar{\nu}$  máx. (cm<sup>-1</sup>) pastilla: 3400 (O-H) f ; 3070 (C-H) aromático m ; 2230 (C≡N) f ; 1550 (C=C) aromático d , 1480 f . R.M.P. ( $\delta$ ): 8.3-5.9 con máx. en 6.8 (señal ancha, 1H, ArO-H)  $\text{D}_2\text{O}$ ; 8.1 (s, 2H, Ar-H).

Síntesis de 3,5-dibromo-4-hidroxipiridina (VIII) (fig.13a)

Bromación en medio ácido. Se adaptó el método descrito por Moshchitskii, S.D. et al ( 29 ), de la siguiente manera. Se disolvió 1 g (0.01 moles) de 4-hidroxipiridina en ácido bromhídrico al 48% (5 ml) en un matraz de dos bocas al que se le colocaron un refrigerante de agua y un embudo de adición, en el embudo se colocaron 1.25 ml. (0.024 moles) de bromo, que se adicionó lentamente por goteo; la mezcla anterior se mantuvo en agitación a reflujo durante 6 horas, después de las cuales precipitó el derivado bromado que se filtró, se disolvió en NaOH al 10% y se volvió a precipitar con HCl acuoso (1:1), se filtró y secó, purificándose por sublimación. Se obtuvieron 1.46 g (0.006 moles). Rendimiento 55%. P.f. 270-5°C.

I.R. : máx. (cm<sup>-1</sup>) pastilla: 3400 (N-H) d ; 3150 (O-H) d ; 3050 (C-H) aromático d ; 1610 (C=O) m ; 1530 (C=C) acoplada con (C=N) f ; 600 (C-Br) m (huella digital diferente a la de la materia prima).

Síntesis de 3,5-dibromo-4-hidroxipiridina (VIII) (fig.13)

Bromación en medio básico. Se disolvió 1 g (0.01 moles) de 4-hidroxipiridina en 4.2 ml. de hidróxido de sodio al 10%. La mezcla se colocó en el mismo aparato de la bromación en medio ácido y se le adicionaron gota a gota 1.25 ml (0.024 moles) de bromo; la mezcla se mantuvo con agitación a reflujo durante seis horas, después de las cuales se dejó enfriar la reacción, precipitando el producto que se filtró y se lavó con agua, se recristalizó de etanol purificándose posteriormente por sublimación. Se obtuvieron 0.931 g (0.0037 moles), 35 % de rendimiento de 3,5-dibromo-4-hidroxipiridina. P.f. 275-6°C.

Síntesis de  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-3,5-dibromo-4-hidroxítolueno (IX). (fig. 3c)

Se siguió la técnica de Dietrich H. et al (26). en un matraz de bola de dos bocas, para un refrigerante y un embudo de adición, se disolvieron 0.5 g (0.0046 moles) de 4-hidroxítolueno (Pf. 45-6°C) en o-diclorobenceno (también se puede usar clorobenceno, temperatura de reflujo de 130°C). Se llevó la mezcla de reacción a la temperatura de reflujo y se adicionaron 0.95 ml (0.018 moles) de bromo, a través de un embudo de adición, lentamente; al mismo tiempo se comenzó la iluminación con un foco de 100 watts a la mínima distancia del matraz de reacción. El reflujo se mantuvo durante 5 horas, posteriormente se permitió el escape de los vapores de bromo manteniendo el matraz dentro de una campana. El disolvente se eliminó mediante vacío. El producto se recristalizó de cloroformo-hexano y se obtuvieron 0.05 g (0.00012 moles) de producto. Rendimiento 2.6%, Pf. 165 °C.

I.R.  $\bar{\nu}$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ) pastilla: 3335 (O-H)  $\delta$  ; 3050 (C-H) aromático  $\delta$  ; 1630  $\delta$  (C=C) aromático  $\delta$  ; 590 (C-Br)  $\nu$  .

Síntesis de o-diclorobenceno.

Se obtuvo por la reacción de Sandmeyer, mediante una adaptación del método descrito por Vogel (56). Se disolvieron 50 g (0.39 moles) de o-cloro-anilina en 85 ml de ácido clorhídrico, la mezcla se enfrió en un matraz erlenmeyer a una temperatura inferior a los 5°C, mediante un baño de hielo-sal. A esta mezcla se le adicionaron 27 g (0.39 moles) de nitrito de sodio disueltos en 250 ml de agua destilada, formándose la sal de diazonio. Por otro lado, en un vaso de precipitado se preparó una solución de 38,6 g de cloruro cuproso en 290 ml de ácido clorhídrico (líquido pardo que se vuelve verde al contacto con el aire); esta solución se vertió sobre la sal de diazonio formándose el o-diclorobenceno que se separó de la mezcla por destilación. Reb 167°C.

### Síntesis de 1-óxido de piridina.

Se sintetizó de acuerdo con la técnica reportada por Ochiai (30) a una solución de 4.06 ml (0.0505 moles) de piridina en 30 ml (0.524 moles) de ácido acético glacial, se le adicionaron 5.8 ml (0.055 moles) de agua oxigenada al 30% y la mezcla se calentó en baño de agua a 70-80°C; después de 3 horas se adicionaron 4.08 ml (0.038 moles) de agua oxigenada al 30%, la mezcla se mantuvo 9 horas más a la misma temperatura. La mezcla se concentró a 10 cc en vacío y se diluyó con 10 cc de agua, entonces se concentró todo lo posible. El residuo se alcalinizó con carbonato de sodio anhidro, agitado con 25 cc de cloroformo y después se deja reposar. Se separan los cristales de acetato de sodio y de carbonato de sodio. El filtrado se seca con sulfato de sodio, el disolvente se saca por destilación, y el residuo se destila a presión reducida. El rendimiento de 1-Óxido de piridina P.eb. 138-140°C /15 mm fue de 2.57 g (0.027 moles) correspondientes al 54%.

I.R.  $\nu$  max. ( $\text{cm}^{-1}$ ) película: 3050 (C-H) aromático f; 1600f, 1480f (C=C); 1250 (N-O)f.

### Síntesis de 1-óxido-4-Nitro piridina. (XIV)

Se trabajó de acuerdo al método de Ochiai (30). Se disolvieron 2.57 g (0.027 moles) de 1-óxido de piridina en 7.8 ml de ácido sulfúrico ( $\rho = 1.84$ ) y 3.12 g de ácido nítrico ( $\rho = 1.48$ ) correspondientes a 2 ml y la solución se calentó 3.5 hrs. a 128-130°C. La mezcla se vertió sobre hielo y, con agitación neutralizando con porciones de carbonato de sodio. Justo cuando los cristales de sulfato de sodio comienzan a precipitar, la neutralización se interrumpe y los cristales precipitados son separados, lavados con agua fría y secados. El filtrado se extrae con cloroformo y los extractos concentrados hasta donde el precipitado cristaliza. Se recristaliza de acetona. Se obtuvieron 3.83 g de 1-óxido-4-nitro piridina (0.027 molen). La reacción fue cuantitativa. Pf. 160-1°C.

I.R.  $\nu$  max. ( $\text{cm}^{-1}$ ) película: 3050 (C-H) arom. d; 1280 (N-O) f; huella infrarroja diferente a la materia prima.

Materias primas utilizadas.4-hidroxipiridina.

I.R.  $\bar{\nu}$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ); (en pastilla) 3045 (O-H) d ; 3400 (N-H libre) d ; 3200 (N-H) d ; 1630 (C=O) f ; 1580 m , 1400 m (C=C);  
 Pf.: 125°C.

4-hidroxi-benzaldehído.

I.R.  $\bar{\nu}$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ); (en pastilla) 3200 (O-H) f ; 3040 (C-H) arom d ; 2730 (C-H) aldehído d ; 1680 (C=O) f ; 1600 f , 1470 f (C=C) arom.  
 Pf.: 115°C.

4-hidroxi-benzonitrilo.

I.R.  $\bar{\nu}$  máx ( $\text{cm}^{-1}$ ): (en pastilla) 3200 (O-H) f ; 3030 (C-H) arom d ; 2250 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ) f .  
 R.M.P. ( $\delta$ ) ; 10 (señal ancha, 1H, ArO-H)  $\text{D}_2\text{O}$  ; sistema AB: 7.6 ( d, 2H, orto NC-Ar-H), 6.9 ( d, 2H, orto HOAr-H).  
 Pf.: 96°C.

3,5-dibromo-4-hidroxitolueno.

I.R.  $\bar{\nu}$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): (en pastilla) 3380 (O-H) f ; 2900 (C-H) d ;  
 R.M.P. ( $\delta$ ) : 7.2 ( s, 2H, Ar-H) ; 5.65 ( s, 1H, ArO-H) ; 2.2 ( s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) .  
 Pf. : 45°C.

fig. 13 . Se esquematizan las síntesis realizadas.

## SINTESIS

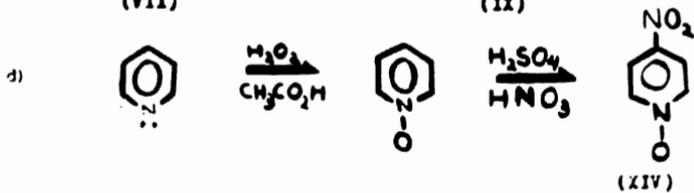
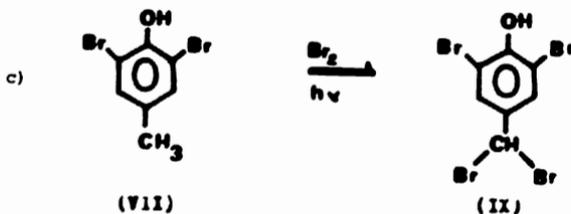
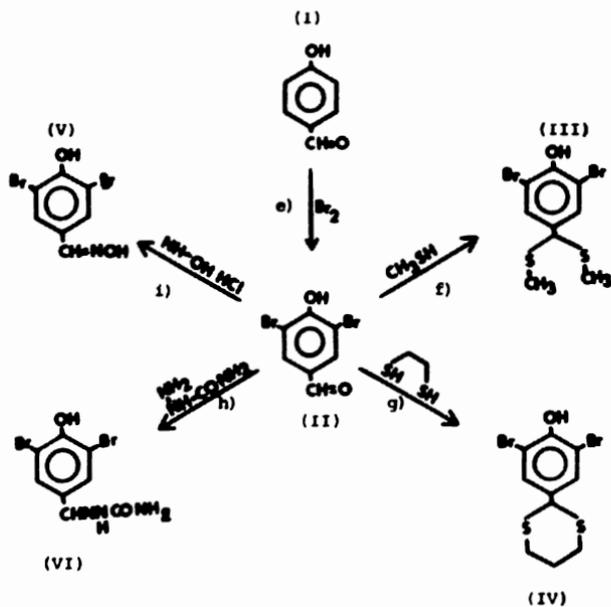


fig. 13 . (continúa)



BIOQUIMICA .

Preparación de medios.Medio de aislamiento.

Las proporciones de los reactivos son:

Reactivo	molar	PM g/g mol	g/l de agua
Sacarosa	200 mM	342.0	60.50
TAPS (ac. tris hidroximetil metilaminopropanosulfónico).			
metil metilaminopropanosulfónico).	20 mM	179.0	3.58
KCl	50 mM	74.5	3.73
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5 mM	203.3	1.02
Albumina sérica de bovino desgrasada.	0.1 %	-	1.00

Se mezclan los reactivos anteriormente especificados y se ajusta el pH a 8 con KOH y/o HCl.

Medio de resuspensión.

Las proporciones que se usan son las siguientes:

Reactivo	molar	PM g/g mol	g/l de agua
Sacarosa	100 mM	342.0	34.23
TAPS (ac. tris hidroximetil metilaminopropanosulfónico).			
til metilaminopropanosulfónico).	20 mM	179.0	3.58
KCl	50 mM	74.5	3.73
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5 mM	203.3	1.02
Albumina sérica de bovino desgrasada.	0.1 %	-	1.00

Se mezclan los reactivos en la proporción adecuada y se ajusta el pH a 8 con KOH y/o HCl.

Medio de transporte de electrones.

Se prepara como se indica a continuación:

Reactivo	molar	PM g/g mol	g/l de agua
Hepes (ac.N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfónico).	20 mM	238	4.76
Sacarosa	100 mM	342.0	34.23
KCl	50 mM	74.5	3.73
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 mM	203.3	1.02
Albúmina sérica de bovino desgrasada.	0.1 %	-	1.00

Se mezclan y se disuelven en el volumen adecuado de agua y se ajusta a pH=8 con KOH y/o HCl.

Medio de fotofosforilación.

Se mezclan en la siguiente proporción:

Reactivo	molar	PM g/g mol	g/l de agua
KCl	100 mM	74.5	7.46
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 mM	203.3	1.02
ADP	1 mM	440	0.44
Pi	3 mM	136	0.41

Aislamiento de cloroplastos de espinaca sin doble membrana externa (clase II).

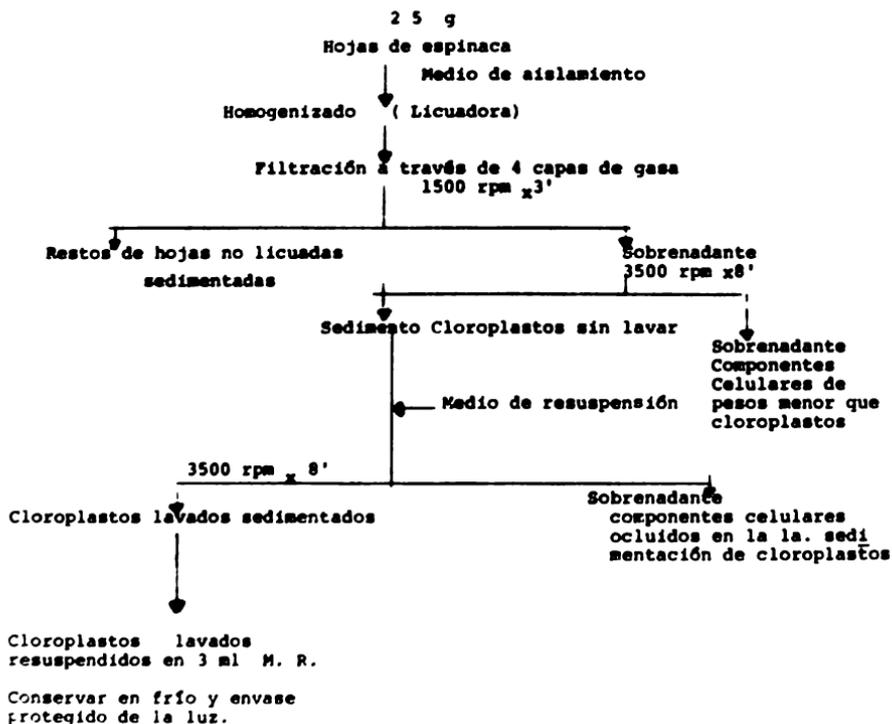
Modificación al método de Takaoki et al. (57).

Se consiguieron hojas de espinacas frescas (Spinacea oleracea) de color verde y turgentes, se desecharon las hojas rotas y el resto se lavaron escogiendo las mejores hojas hasta completar 25g de hojas sin nervadura central y sin ápice. Rápidamente se cortaron en trozos de aproximadamente  $1\text{cm}^2$ , se colocaron en un vaso de licuadora, previamente enfriado 30min a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , que contenía 200ml de medio de aislamiento (p66). A esta mezcla de medio y hojas se le agregó 1ml de ascorbato de sodio (500mM) por cada 100ml de medio dando una concentración final de 5mM.

Se licuó de 4 a 5seg consecutivos a velocidad máxima encendiendo y apagando la licuadora (Osterizer Custom Modelo L-11). El homogenizado se filtró a través de 4 capas de gasa colocadas en un emudo de filtración rápida. Se eliminaron las hojas que no se trituraron y que quedaron retenidas en la gasa.

El filtrado resultante se centrifugó a 1500rpm (151 g) durante 3 min. en una centrifuga MSE-LR-6. Se desechó el sedimento (que son núcleos, pared celular y células sin romper), el sobrenadante (cloroplastos y citoplasma de las células) se centrifugó a 3500rpm (822 g) durante 8min. El sobrenadante se desechó (componentes celulares de peso menor que los cloroplastos); el sedimento (cloroplastos) se lavó homogenizándolo con un tubo de ensaye conteniendo hielo picado y resuspendiéndolo con medio de resuspensión (p66). Se centrifugó nuevamente a 3500rpm (822 g) durante 8 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se volvió a homogenizar con el tubo de ensaye y se resuspendió en 3ml de medio de resuspensión colocándolo en un tubo cubierto con papel aluminio (protegiéndolo de la luz). Todos los pasos del aislamiento se efectúan a  $4^{\circ}\text{C}$  y a  $\text{pH}8$ .

fig.14 . ESQUEMA DEL AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA (59)



### Medición de la bomba de protones.

Se evita registrando los cambios de pH producidos por una mezcla de reacción conteniendo cloroplastos al ser iluminados. Esta dependencia sigue una función del tipo ilustrado en la fig. 15. Al encender la luz aumenta el pH hasta llegar a una posición estable; al apagarse la luz se restablecen las condiciones iniciales de una forma espontánea y en ese momento se adicionan 50  $\mu$ l. de HCl 0.001 N., lo que corresponde a 0.05  $\mu$ eq de protones ( $H^+$ ); siendo ésto la calibración. Se ha encontrado que uno de los valores de pH recomendables para evaluar esta actividad es el de 6; lo que se logra con ácido y/o base estandarizado, para lo que es conveniente preparar una serie de soluciones de ácido y otras de base de diferentes concentraciones (1, 0.5, - 0.3, 0.1, 0.01, 0.001 N) para lograrlo rápidamente.

La medición se hace de la siguiente manera: en la cubeta de reacción (fig.17 ) se colocan 3 ml de medio de fosforilación (p67.) 30  $\mu$ l de metilviológeno 0.05 M , X  $\mu$ l de cloroplastos (correspondientes a aproximadamente 100 microgramos de clorofila) y concentraciones variables del compuesto a ensayar (de 0 a 300 micromolar), enseguida se ajusta el pH y se enciende el medidor de pH (Beckman ) y luego se ilumina con el proyector (Pradorit RC, con una lámpara de 500 watts), se espera hasta que la gráfica alcance la meseta y se apaga el proyector. Se deja pasar un tiempo, mientras se restablece el pH original y entonces se adiciona la calibración, se apaga el aparato y se lava la cubeta con agua, por lo menos diez veces, vaciándola y llenándola con agua destilada. Se toman controles al inicio del experimento y al cambiar cada uno de los compuestos; regularmente cada 4 ó 5 medidas. Cada compuesto queda entre dos controles, los controles están constituidos por todos los reactivos a excepción del compuesto a ensayar.

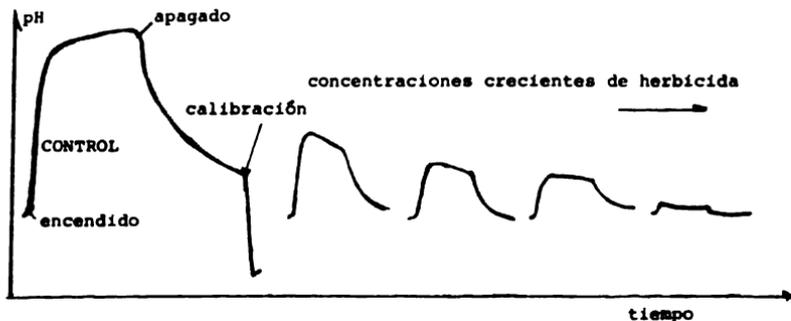


fig.15 . Efecto de herbicidas inhibiendo la bomba de protones. La calibración se hace con 50  $\mu$ l de HCl 0.001 N. (p. 77)

fig.16 . Calibración. Medición de la cantidad de oxígeno desprendido en  $\mu$ eq.  $\bar{e}$  transportados al consumirse 10  $\mu$ l (0.05M) de  $K_3 Fe (CN)_6$  de acuerdo a lo especificado en el texto (p75)

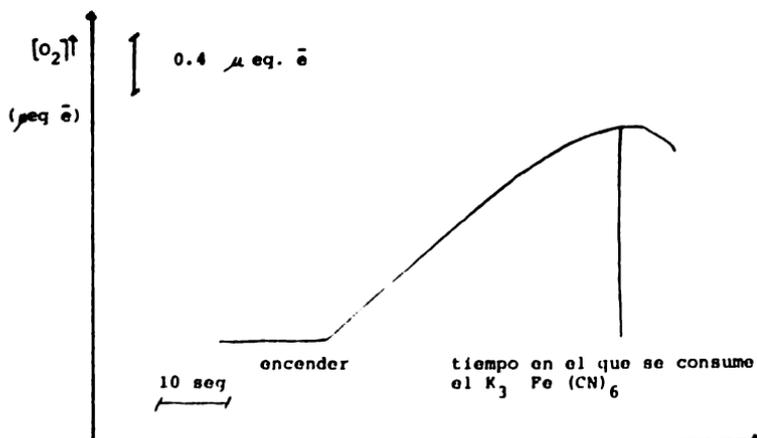
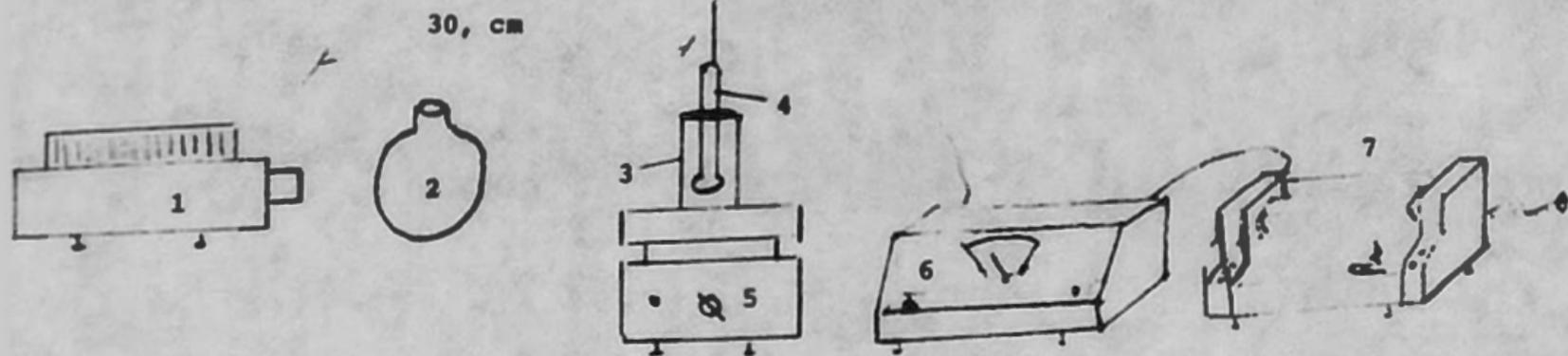


fig. 17. Esquema del aparato utilizado para la  
medición de la bomba de protones ( $B.H^+$ )



1 proyector

2 lente de Izawa

3 cubeta de reacción

4 electrodo de vidrio

5 base de agitación

6 medidor de pH

7 graficador

Cada medición se tarda de 3 a 5 minutos.

Cálculo de los protones aprovechados en la Bomba de Protones.

Sobre la gráfica del experimento se mide los microequivalentes de protones aprovechados en unidades de longitud  $X_L$ , desde el momento que empiezan a ser transportados los protones; cuando se enciende la luz hasta el momento en que se alcanza la meseta en la gráfica. Estas unidades de longitud son transformadas en los microequivalentes de protones transportados conociendo las unidades de longitud  $C_L$  desplazadas por la plumilla del graficador al adicionar  $50 \mu\text{l.}$  de  $\text{HCl}$   $0.001 \text{ N}$ , o sea, la calibración. Se sacan promedios de todas las calibraciones y de todos los controles, graficándose microequivalentes de protones transportados vs. concentración del reactivo o bien,  $t$  del control vs. concentración del reactivo de donde gráficamente se mide  $\text{pI}_{50}$  que corresponde a  $-\log I_{50}$ , siendo  $I_{50}$  la concentración a la cual se logra inhibir en un 50% la actividad de la bomba.

Medición de la velocidad del transporte de electrones (Reacción de Hill).

La velocidad del transporte de electrones (t.e.) se determina midiendo la producción de oxígeno de la fotólisis del agua mediante un oxímetro (p79), el cual a un voltaje fijo (0.8 v), relaciona proporcionalmente la corriente registrada con la concentración de oxígeno en el medio de reacción (59). Se midieron t.e. no-cíclico basal (t.e.b.), fosforilante o acoplado (t.e.a.) y desacoplado (t.e.d.), de la siguiente manera, desde agua hasta metilviológeno.

Transporte de electrones no cíclico basal (t.e.b.).

En la cubeta (fig.19) de reacción se colocan 2 ml de medio de t.e. (p67); 20 microlitros de metilviológeno (MV) (0.05 M), X ml de cloroplastos (correspondientes a aproximadamente 40 microgramos de clorofila) y concentraciones variables del compuesto a ensayar (de 0 a 300 micromolar), después de lo cual se enciende la luz y se toma la lectura hasta que se obtiene una línea lo más recta posible de pendiente constante (ésto se logra generalmente en un tiempo de 3 a 4 minutos).

Transporte de electrones no-cíclico fosforilante.

a) Acoplado (t.e.a.). Se colocan en la cubeta 2 ml. de medio de t.e. ( p67 ), 20 microlitros de metil-viológeno (MV) (0.05 M), 20 microlitros de ADP (0.1 M), 20 microlitros de fosfato diácido de potasio ( $KH_2PO_4$  0.3 M), X microlitros de cloroplastos (aprox. 40 microgramos de clorofila) y concentraciones variables del compuesto a ensayar (de 0-300 micromolar). Se enciende la luz de la lámpara de 500 watts y se deja correr la reacción de 2 a 3 min.; la señal que genera la reacción en la cubeta se detecta al ser traducido en un registrador (Beckman) donde aparece una línea recta de pendiente constante.

b) Desacoplado (t.e.d.). Se colocan en la cubeta los mismos reactivos y en las mismas proporciones del t.e.a. y una vez transcurridos los 2 a 3 min. de iluminación se adiciona el reactivo desacoplante. Se usó etilamina en una concentración final de 3.7 mM (correspondiente a 100 microlitros de 70 mM; hubiera sido mejor usarlo 5 mM pues así el efecto desacoplante es máximo).

Controles. Los controles se efectúan desde el principio del experimento y posteriormente cada 3 ó 5 medidas (generalmente cada -- cambio de compuesto que se ensaya se toma un control; por consiguiente, cada compuesto queda por lo menos entre dos controles). Los controles corresponden a tener en la cubeta todos los reactivos a excepción del compuesto a ensayar; en el caso del t.e.d. se toma como control el del t.e.a.

Calibración. Se lleva a cabo de la siguiente manera: se ponen en la cubeta 2 ml de medio de t.e. (p67), 40 microgramos de cloroplastos (se recomienda usar la misma cantidad de cloroplastos durante todo el experimento), 10 microlitros de  $K_3 Fe(CN)_6$  (0.05 M) y se ilumina por el tiempo necesario para que el  $K_3 Fe(CN)_6$  sea totalmente consumido (fig 16).

Cálculo de la velocidad de t.e. ( $\bar{v}_{t.e.}$ )

La gráfica obtenida al medir la velocidad de t.e. en el oxímetro es de la forma:  $a \mu\text{eq } \bar{e} = \bar{v}_{t.e.} t$ , donde  $a \mu\text{eq } \bar{e}$  son los microequivalentes de electrones transportados a la velocidad ( $\bar{v}_{t.e.}$ ) en el tiempo  $t$ .

Para saber: la  $\bar{v}_{t.e.}$  hay que evaluar la pendiente:

$$\bar{v}_{t.e.} = \frac{a \mu\text{eq } \bar{e}}{t}$$

La cantidad "a" de  $\mu\text{eq}$  de electrones transportados se calcula a través del trazo de calibración que se hace con una cantidad conocida de  $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$  (10 microlitros 0.05 M), correspondientes a 0.5 microequivalentes de  $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$  que al "consumirse" (la recta cambia de pendiente en ese momento) han transportado 0.5  $\mu\text{eq}$  de electrones de acuerdo con la reacción:



Los controles del graficador determinan la velocidad del papel a 1 pulgada/mín.

Mediante un juego de escuadras se dibuja una recta paralela al trazo experimental del papel graficador y se determina la pendiente en los trazos problema, para medir en las ordenadas los  $\mu\text{eq } \bar{e}$  transportados por unidad de tiempo ( $X_2 = X$  unidades de longitud del papel en las ordenadas). Empleando las transformaciones de unidades convenientes y la equivalencia entre los  $\mu\text{eq}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6$  empleados en la calibración (que son iguales a los  $\mu\text{eq } \bar{e}$  transportados) y dividiendo entre los  $z$  mg de clorofila empleados en la medida se obtienen los "y"  $\mu\text{eq}$  de  $\bar{e}$  transportados por hora por mg de clorofila.

$$\frac{y \text{ } \mu\text{eq } \bar{e}}{\text{hr-mg clo}} = \frac{x_0}{\text{min.}} \times \frac{1}{\text{z mg. clorofila}} \times \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hr.}} \times \frac{0.5 \text{ } \mu\text{eq de } \bar{e}}{F_0}$$

donde  $x_0$  es el desplazamiento en las ordenadas en las unidades de longitud del papel efectuado durante la medida en la unidad de tiempo (1 min).  $F_0$  es el desplazamiento realizado en las ordenadas durante la calibración al "consumirse" 0.5 microequivalentes de  $\text{Fe}(\text{CN})_6$  correspondientes a 0.5 microequivalentes de electrones transportados.

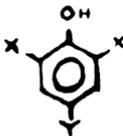
Se grafica  $\mu\text{eq } \bar{e} / \text{hr-mg de Clorof. vs. (compuesto)}$  o % del control vs. (compuesto). De aquí se mide gráficamente  $p_{50}^1$  que corresponde a  $-\log I_{50}$ ; siendo  $I_{50}$  la concentración a la cual se logra el 50% de inhibición del control.

Evaluación "IN VIVO" de la actividad herbicida de piridinoles y fenoles 2,4,6-sustituídos en plantas enteras.

Los experimentos se realizaron sobre plántulas de frijol (Phaseolus vulgaris), diente de león (Taraxcum officinale Weber), tomate (Lycopersicum esculentum) y sobre chicalote (Argemone ochroleuca) (58). Se trabajó con lotes de nueve plántulas por compuesto, usando dos lotes como controles (un blanco, solo con agua; y otro con agua y el emulsificante usado tween 80), en el caso de tomate solo se trabajó con una planta por compuesto y los controles, fueron 280 plantas totales. Se hicieron emulsiones acuosas (con 1% de acetona) en Tween 80 de 2000 ppm de los compuestos. Fueron aspergidas plantas hasta saturación empleando un aspersor de vidrio Pyrex (usado comúnmente para el revelado de placas cromatográficas), la asperción se hizo en una campana empleando además guantes y tapabocas. Una vez aspergidas las plantas se conservaron en el invernadero donde se les atendía y observaba periódicamente.

Las plantas usadas se obtuvieron sembrando las semillas como almácigo y una vez formada la plántula se transplantó a una macetita cada plántula y después que la plántula se recuperó del transplante entonces se le utilizó.

Las estructuras de los compuestos probados se muestran :



<u>X</u>	H	Br	Br	Br	Br	Br	Br	H
<u>Y</u>	CHO	CHO	$\begin{matrix} \text{S} \\ \text{---} \\ \text{S} \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{S} \\ \text{---} \\ \text{S} \end{matrix}$	CH=NOH	$\begin{matrix} \text{CH}=\text{NNHCNH}_2 \\ \text{O} \end{matrix}$	CN	CN

### Oxímetro.

Mide la evolución o desprendimiento de oxígeno mediante un electrodo tipo Clark. (fig. 18 ).

El electrodo consiste de un cátodo de platino y un ánodo anular de plata, ambos inmersos en una solución de prueba por una membrana de teflón (marca EGA-PAC) fabricada por industrias químicas Formex, S.A. de C.V.); la cual separa físicamente al electrodo de la cubeta de reacción pero permite el libre paso de oxígeno.

Al aplicar un voltaje constante los cambios en la corriente (que están relacionados con los cambios en la concentración de oxígeno) se traducen en un trazo en el graficador (Beckman) (fig. 18 )

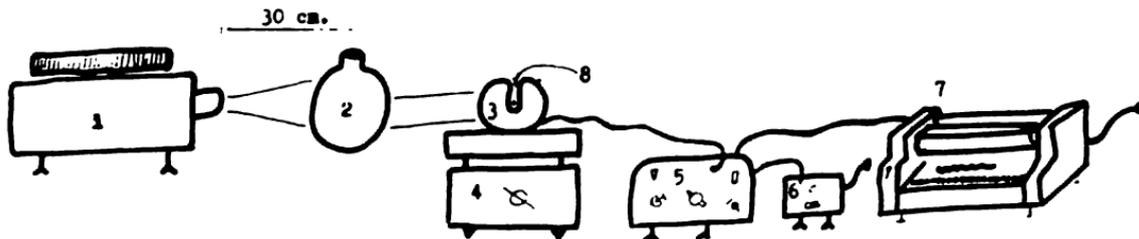
Seleccionando una entrada de 10 mv en el graficador se puede que correspondan a 1-2 microequivalentes de electrones en toda la escala.

Como fuente de iluminación se empleo un proyector (Pradorit RC, con una lámpara de 500 watts, colocada a 30 cm de la cubeta de reacción. El haz luminoso se hace pasar a través de una lente de Isawa, que consiste en un matraz de bola de 500 ml lleno de una solución de trazas de sulfato de cobre en agua, la cual elimina el calor. Sirve de filtro además de concentrar el haz sobre la cubeta de reacción.

En la cubeta de reacción de 2.5 ml de capacidad y con una camisa (refrigerante de agua corriente) se coloca el electrodo. En dicha cubeta se agrega la mezcla de reacción la cual se mantiene agitada vigorosamente con un pequeño magneto (0.5 cm de largo) y una base de agitación.

La reacción empieza al iluminarse la cubeta y termina al apagar la lámpara de iluminación.

Fig. 18 . Esquema del aparato utilizado para medir el transporte de electrones .(Oxímetro).



- 1 proyector    2 lente de Isawa    3 cubeta de reaccion  
 4 base de agitacion    5 oxímetro  
 6 bateria    7 galvanizador    8 electrodo de oxígeno

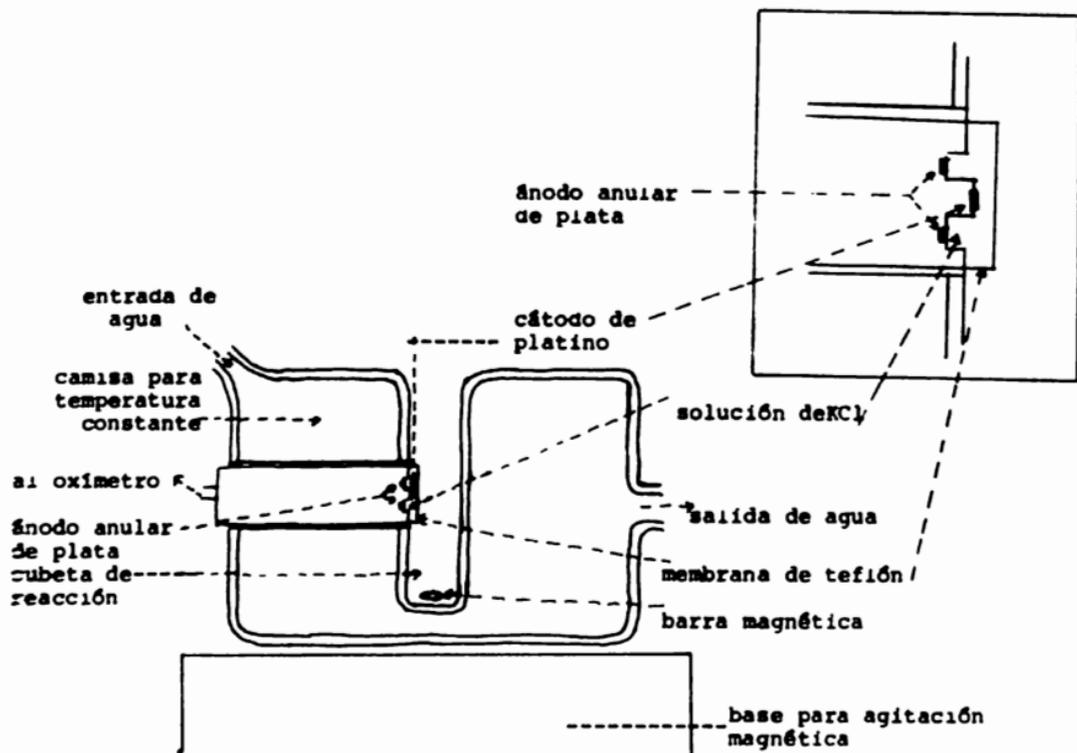


fig. 19. Diagrama del electrodo de oxígeno (tipo Clark) desmantelado

**V. CONCLUSIONES.**

1.- Se realizaron experimentos con compuestos piridínicos y fenoles 2,4,6-substituidos "in vitro" sobre cloroplastos aislados de clase II de espinaca (Spinacea oleracea) encontrándose que actúan a nivel de la fotosíntesis inhibiéndola algunos como inhibidores del transporte de electrones y otros como inhibidores de la transferencia de energía. De los compuestos ensayados se encontró que el 4-nitro-1-óxido de piridina presentó propiedades desacoplantes.

2.- Se efectuaron experimentos con los compuestos mencionados "in vivo" aspergiéndolos sobre plantas de frijol (Phaseolus vulgaris), tomate (Lycopersicum sculentum), diente de león (Taraxcum officinale Weber) y chicalote (Argemone ochroleuca) de donde se concluye que los compuestos son activos "in vivo" y presentan cierta selectividad.

3.- Los compuestos ensayados activos "in vivo" lo son también "in vitro".

4.- La mayor actividad tanto "in vivo" como "in vitro" la tiene el compuesto bromado respecto al no bromado siendo el más activo de ellos el bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxi benzonitrilo) (X=Br;Y=CN) pero no tan selectivo como 3,5-dibromo-4-hidroxi benzaldoxima.

5.- Los compuestos activos "in vivo" a saber bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxi benzonitrilo (X=Br;Y=CN), 4-hidroxi benzonitrilo (X=Br;Y=CN) 3,5-dibromo-4-hidroxi benzaldoxima (X=Br,Y=CHNOH), 3,5-dibromo-4-hidroxi -gem-metil ditiocetal (X=Br,Y=  $\begin{matrix} S \\ | \\ S \end{matrix}$  ), 3,5-dibromo-4-hidroxi-gem-propan ditiocetal (X=Br;Y=  $\begin{matrix} S \\ / \quad \backslash \\ S \end{matrix}$  ) y el 3,5-dibromo-4-hidroxi benzaldehído son herbicidas de post-emergencia de contacto inhibidores de la fotosíntesis.

**VI. BIBLIOGRAFIA.**

- 1 Kerr, M.W. and Wain, R.L. *Ann. appl. Biol.* 54, 447-450 (1964).
- 2 Hill, R. The biochemists' green mansions: The photosynthetic electron transport chain in plants, p.121 in P.N. Campbell and G.D. Greville (eds), *Essays in Biochemistry* 1, Academic, N.Y. (1965).
- 3 Morelad, D.E., Hilton, J.L. In "Physiology and Biochemistry of Herbicides", p.493, L.J. Audus (ed), Academic Press, London (1976).
- 4 Renger, G. *Z. Naturforsch.* 34c, 1010-1014, (1979).
- 5 Plimmer J.R. Pesticide Chemistry in The 20th Century. In *ACS Symposium Series 37*, Washington D.C. (1977).
- 6 Wright, B.J. et. al. *Phytochemistry*, 19, 61-65, (1980).
- 7 Kawakubo, K and Snindo, M., *Plant Physiol.*, 64, 774-9, (1979).
- 8 Fischer, W. and Strotmann, H., *Biochim. Biophys. Acta* 460, 143, (1977).
- 9 Izawa, S. and Good, N., *Biochim. Biophys. Acta* 112, 20-38, (1965).
- 10 Arntzen, Ch. J., et. al. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa*, 76, [1], 278-282, (1979).
- 11 Hauska, G. et. al. *Z. Naturforsch.* 30c, 505-510, (1975).
- 12 Zweig, G. et. al. *Biochim. Biophys. Acta* 109, 332-346, (1965).
- 13 Renger, G. *Biochim. Biophys. Acta* 440, 287-300, (1976).
- 14 Radosevich, S.R. et. al. *Weed Science*, 27, 2, 216-218, (1979).