

65  
240



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACION DE COMPLEJOS DE  
DIFENILBORANO CON DIFERENTES AMINOACIDOS  
EN SU ACTIVIDAD HERBICIDA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**JACQUELINA FERNANDEZ VARGAS**



**DIRECTOR DE TESIS: DR. BLAS LOTINA HENNSEN.**

**MEXICO, D. F.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Caracterización de complejos de difenilborano con diferentes aminoácidos en su actividad herbicida"

realizado por Fernández Vargas Jacqueline

con número de cuenta 8719552-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Blas Lotina Henríksen

Propietario

Dr. Norberto Farfán García

Propietario

B. María Raquel González Avalos

Suplente

Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco

Suplente

B. José Luis Busto Sánchez

Consejo Departamental de Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DE BIOLOGIA

*"La esperanza es la muerte de lo que fuera antiguo y ha sido eterno"*

*Pedro Mir.*

**DIRECTOR DE TESIS**  
**Dr. BLAS LOTINA HIENSEN.**

**ESTUDIO REALIZADO EN EL LABORATORIO 115 DEL**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA.**  
**CONJUNTO E,**  
**FACULTAD DE QUIMICA**  
**U N A M**

## DEDICATORIAS

### *AL CREADOR DEL UNIVERSO*

*A mi madre: Lucila Vargas Campos.*

*A mi padre: Ascención Fernández Torres.*

*Gracias por su amor y apoyo incondicional.*

*A ti querida tía Elenita.*

*Gracias por todo.*

*A mis hermanos: Lupe, Gabi, Raquel, César.*

*y mi prima Alicia.*

### *A MIS AMIGOS.*

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Blas Lotina Hensen, por su paciencia, conocimientos e interés para el desarrollo de este trabajo. Mi más sentido agradecimiento por permitirme colaborar en sus investigaciones.

Al Dr. Norberto Farfán García por proporcionar las boroxozalidonas, las cuales son las principales protagonistas de esta Tesis.

A la Q.F.B. Silvia Castillo Acosta, por su invaluable ayuda para comprender las técnicas de laboratorio para la realización de este trabajo.

A la B. Patricia Fierro por su trabajo en el invernadero para obtener las plantas de chicharo.

A la M. en C. Gabriela González Cerón, por su ayuda en los programas de computo.

Este trabajo fue parcialmente financiado por DGAPA registrado con el número IN204496.

Gracias a la beca que me otorgó el Programa Fundación UNAM de Iniciación Temprana a la Investigación y a la Docencia, durante el desarrollo de la Tesis.

## ÍNDICE

	página
ABREVIATURAS.	1
1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCION.	2
3. OBJETIVOS.	4
4. ANTECEDENTES.	5
4.1. Que son los herbicidas.	5
4.2. Clasificación de herbicidas.	6
4.3. Modo de acción.	6
4.4. Fotosíntesis.	7
4.4.1. Generalidades.	7
4.4.2. El cloroplasto.	7
4.4.3. Transferencia de electrones.	10
4.4.4. Circuito de protones.	11
4.5. Mecanismos de acción de los herbicidas en la fotosíntesis.	12
4.5.1. Inhibidores del transporte de electrones.	12
4.5.2. Desacoplantes.	13
4.5.3. Inhibidores de la transferencia de energía.	13
4.5.4. Inhibidores desacoplantes.	13
4.5.5. Aceptores de electrones.	13
4.6. Germinación.	14
4.6.1. Respiración de las semillas durante la inhibición y germinación	14
4.6.2. Desarrollo mitocondrial y fosforilación oxidativa.	15
4.6.3. Eventos durante la germinación.	17
4.7. Estructura y morfología de la germinación de semillas.	19
5. MATERIALES Y METODOS.	22
5.1. Aislamiento de cloroplastos.	22
5.1.1. Determinación de clorofila.	22



5.2. Evaluación del transporte de electrones ( $e^-$ ) en las diferentes actividades de la fotosíntesis.	22
5.3. Evaluación de la síntesis de ATP y captación de protones.	24
5.4. Síntesis de ATP indirecta.	25
5.5. Reacciones parciales de los Fotosistemas I y II.	25
5.5.1. Reacciones parciales del Fotosistema II.	25
5.5.1.1. De $H_2O$ a DCPIP.	25
5.5.1.2. Reacción parcial del transporte de electrones del donador DPC al aceptor DCPIP	26
5.5.1.3. Reacción parcial del flujo de electrones de $H_2O$ hacia el Silicomolibdato (SiMO).	26
5.5.2. Reacciones parciales del Fotosistema I.	26
5.5.2.1. Reacción parcial desde DCPIP reducidos al MV.	26
5.5.2.2. Reacción parcial de electrones desde N-metilfenazina metosulfato (PMS) reducido a metilviologeno (MV).	27
5.5.2.3. Reacción parcial de transporte de electrones desacoplado desde Tetrametil-p-Benzoquinona (TMQH <sub>2</sub> ) a metilviologeno (MV).	27
5.6. Actividad de ATPasa.	27
5.6.1. Aislamiento de cloroplastos intactos.	27
5.6.2. Activación de los factores $CF_0$ - $CF_1$ de la ATPasa dependiente de $Mg^{2+}$ .	28
5.6.3. Hidrólisis de ATP.	28
5.6.4. Determinación de la concentración de fosfatos.	28
5.7. Evaluación del efecto de los complejos de difenilborano en la germinación de semillas.	28
5.8. Evaluación del efecto de los complejos de difenilborano en la respiración de semillas.	29
6. RESULTADOS Y DISCUSION.	31
6.1. Estudio del efecto de los complejos de difenilborano en la fotosíntesis.	31
6.2. Localización del sitio de acción del difenil(lisinato-O,N)borano en la reacción de Hill.	38
6.3. Inhibidores de la transferencia de energía y de la $H^+$ -ATPasa.	39

6.4. Respiración de semillas de plantas agrícolas y malezas.	42
6.4.1. Efecto de los complejos de difenilborano en la respiración de <i>Physalis ixocarpa</i> durante la germinación.	42
6.4.2. Efecto de los complejos de difenilborano en la respiración de <i>Triticum vulgare</i> durante la germinación.	45
6.4.3. Efecto de los complejos de difenilborano en la respiración de <i>Sorghum halepense</i> durante la germinación.	48
6.5. Efecto de los complejos de difenilborano en la germinación de semillas de plantas agrícolas y malezas.	52
6.6. Selectividad de los complejos de difenilborano en su actividad herbicida de preemergencia.	55
7. CONCLUSIONES.	60
8. APENDICE	61
9. LITERATURA CONSULTADA.	62

## ABREVIATURAS:

$^1\text{O}_2$	Singulete de oxígeno
$^3\text{chl}$	Triplete de clorofila
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
$\text{CF}_0$	Factor hidrofóbico de la ATPasa.
$\text{CF}_1$	Factor de acoplamiento de la ATPasa
CR	Centro de Reacción
CTP	Citidina trifosfato
Cyt $b_6/f$	Citocromo $b_6/f$
Chl	Clorofila
$\Delta\psi$	Potencial de membrana. Diferencia de potencial eléctrico entre dos fases separadas por una membrana.
DAD	2,3,5,6-Tetrametil-1,4-fenilendiamina
DAD	Diaminodureno
DBMB	2,5- dibromo -3- metil -6- isopropil -p- benzoquinonal.
DCMU	3 - (3,4 - diclorofenil) - 1,1 - dimetilurea.
DCPIP	2,6-Diclorofenol-Indofenol
$\Delta\mu\text{H}^+$	Diferencia de potencial electroquímico de protones entre dos fases separadas por una membrana (dimensiones: mV). También suele denominarse fuerza protonmotriz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPC	1,5-Difenilcarbazida
$\Delta\text{pH}$	Gradiente de protones
EOC	Complejo que fotoliza la molécula del agua
FCCP	Carbonilcianuro de p-trifluorometoxifenil hidrazona (un translocador de protones)
Fd	Ferredoxina
$\text{FD}_1$	difenil(glutamato-O,N)borano
$\text{FD}_2$	di fenil(lisinato-O,N)borano
$\text{FD}_3$	di fenil(glicinato-O,N)borano
$\text{FD}_4$	di fenil(isoleucinato-O,N)borano
$\text{FD}_5$	di fenil(leucinato-O,N)borano
$\text{FD}_6$	di fenil(metionato-O,N)borano
$\text{FD}_7$	di fenil(treoninato-O,N)borano
$\text{FD}_8$	di fenil(aspartato-O,N)borano
$\text{FD}_9$	di fenil(fenilglicinato-O,N)borano
$\text{FD}_{10}$	di fenil(tirosinato-O,N)borano
$\text{FD}_{11}$	di fenil(serinato-O,N)borano
$\text{FD}_{12}$	di fenil(prolinato-O,N)borano
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	Ferriicianuro
Fe/S	Grupo prostético de un tipo de proteínas redox (proteínas ferrosulfuradas) con hierro no hemínico y azufre .

Fco	Feofitina
FS I	Fotosistema I
FS II	Fotosistema II
G6P-DH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GTP	Guanosina trifosfato
H <sup>+</sup> -ATPasa	H <sup>+</sup> -ATP sintasa
HK	Hexoquinasa
KCN	Cianuro de potasio
peq	μequivalentes
MES	Acido N-2-morfolinoctanosulfónico
MV	Metilviologeno
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenindinucleótido oxidado.
NADPH	Nicotinamida Adenindinucleótido reducido
OH	Radical hidroxilo.
P <sub>680</sub>	Centro de reacción del FS II
P <sub>700</sub>	Centro de reacción del FSI
PC	Plastocianina
Pi	Fosfato inorgánico
PMS	N-metilfenazina metosulfato
PQ	Plastoquinona
PQH <sub>2</sub>	Plastohidroquinona
SOD	Superoxido dismutasa
TMQH <sub>2</sub>	Tetrametil -p- benzoquinona
Tricina	N-Tris (hidroximetil) metilglicina
Tris	Tris(hidroximetilaminometano)
UTP	Uridina trifosfato

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se reporta el efecto herbicida de 12 boroxozalidonas con diferentes aminoácidos, estos compuestos fueron sintetizados en el Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Norberto Farfán García.

Se encontró que dependiendo del aminoácido que se presenta en su estructura tienen un efecto diverso en las actividades de la fotosíntesis: Transporte de electrones basal, fosforilado y desacoplado, fotosfosforilación, captación de protones. Ha juzgar por el efecto en estos transportes las boroxozalidonas presentan diferentes sitios de inhibición que se localiza en el Fotosistema II, [difeníl(lisinato-O,N)borano], específicamente el complejo que fotoliza el agua (EOC) y los que afectan a la  $H^+$  -ATPasa. [difeníl(glutamato-O,N)borano, difeníl(glicinato-O,N)borano, difeníl(treoninato-O,N)borano, difeníl(aspartato-O,N)borano]; o bien como desacoplante [difeníl(serinato-O,N)borano es un desacoplante débil]; los compuestos que no se mencionan en esta parte del trabajo no tienen efecto en la fotosíntesis en relación a los descritos anteriormente.

En los ensayos de actividad de herbicida preemergente, las boroxozalidonas mostraron un efecto tanto en la respiración y germinación de semillas de monocotiledoneas: Trigo (*Triticum vulgare*), Zacate Jhonson (*Sorghum halepense*) y dicotiledoneas: Tomate (*Physalis ixocarpa*). El difeníl(glutamato-O,N)borano, difeníl(lisinato-O,N)borano y difeníl(glicinato-O,N) afectan a monocotiledoneas, para el difeníl(isoleucinato-O,N)borano, difeníl(metionato-O,N)borano y difeníl(prolinato-O,N)borano afecto a la dicotiledonea. Mientras que el difeníl(leucinato-O,N)borano, difeníl(treoninato-O,N)borano, difeníl(aspartato-O,N)borano, difeníl(fenilglicinato-O,N)borano, difeníl(treoninato-O,N)borano y difeníl(serinato-O,N)borano afectan tanto monocotiledoneas y dicotiledoneas.

## 2. INTRODUCCIÓN.

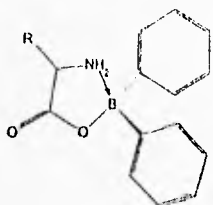
La necesidad global de un control de las malas hierbas ha encontrado respuesta en la industria química, con herbicidas eficaces para la agricultura. Pero algunos plantean graves problemas, en particular si se emplean mal, compuestos tóxicos y dañinos que amenazan la vida animal y la salud pública cuando se acumulan en las plantas comestibles, las aguas freáticas y el agua potable, sin olvidar el riesgo que pueda correr los propios trabajadores que los manipulan (Strobel, 1991).

Diversas investigaciones (Woods, 1994) indican que el boro (B) es un micronutriente para el funcionamiento cerebral y de plantas así como en el metabolismo del calcio. El mecanismo de acción en la planta es aún desconocido. En la última década, muchos investigadores han propuesto que el boro tiene una función membranal, como transportador de iones, además de translocación de azúcares y movimientos de auxinas, que podría explicarse como un efecto secundario del efecto primario del boro en la membrana (Schon, 1990). En la agricultura, los boratos son usados en fertilizantes (4% de  $B_2O_3$  en Estados Unidos) para tener un adecuado nivel de boro en los cultivos. Algunos cultivos son susceptibles a la deficiencia de boro, como manzanas, alfalfa, betabel. El boro es uno de los más importantes elementos esenciales para el crecimiento de la planta y puede ser aplicado en el suelo o bien en el follaje (Woods, 1994).

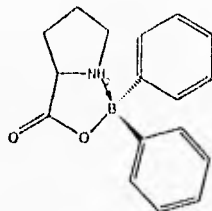
Boratos y combinaciones de boratos con herbicidas orgánicos son usados para el control de malezas. La toxicidad de boratos para el hombre y animales es baja cuando se maneja y se aplica normalmente (Klingman, 1984).

Entre los compuestos del boro se encuentran las boroxalidonas que son complejos neutros que se obtienen al reaccionar  $\alpha$ -aminoácidos con ácido difenil borónico, se caracterizan por tener una unión N→B coordinado y son estables debido a que se forma un anillo de 5 átomos (Farfán, 1993). Es bien conocido que los compuestos de boro derivados de amino alcoholes presentan mayor estabilidad cuando se forman anillos de cinco miembros en comparación con los de seis (tabla. 1).

De las boroxalidona sintetizadas y repartadas en la literatura se les encontró que tienen actividad insecticida, fungicida y herbicida. (Farfán, 1993), aunque se desconoce su modo de acción y tampoco se conoce la vía o vías metabólicas que afectan. Por otra parte se conoce que un poco más del 50% de los herbicidas comerciales inhiben de manera directa o indirecta en la fotosíntesis, por lo que las boroxalidonas podrían también tener un efecto sobre la actividad fotosintética.



Difenil borano



Difenil(prolinato -O,N) borano

NOMBRE	ABREVIATURA	SUSTITUYENTE R
DIFENIL(GLUTAMATO-O,N)BORANO	FD <sub>1</sub>	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
DIFENIL(LISINATO-O,N)BORANO	FD <sub>2</sub>	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
DIFENIL(GLICINATO-O,N)BORANO	FD <sub>3</sub>	- H
DIFENIL(ISOLEUCINATO-O,N)BORANO	FD <sub>4</sub>	- CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
DIFENIL(LEUCINATO-O,N)BORANO	FD <sub>5</sub>	- CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
DIFENIL(METIONATO-O,N)BORANO	FD <sub>6</sub>	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SC(=O)CH <sub>3</sub>
DIFENIL(TREONINATO-O,N)BORANO	FD <sub>7</sub>	- CH(OH)CH <sub>3</sub>
DIFENIL(ASPARTATO-O,N)BORANO	FD <sub>8</sub>	- CH <sub>2</sub> COOH
DIFENIL(FENILGLICINATO-O,N)BORANO	FD <sub>9</sub>	- C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
DIFENIL(TIROSINATO-O,N)BORANO	FD <sub>10</sub>	- CH <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )OH
DIFENIL(SERINATO-O,N)BORANO	FD <sub>11</sub>	- CH <sub>2</sub> OH
DIFENIL(PROLINATO-O,N)BORANO	FD <sub>12</sub>	- *

Tabla 1. Nombre, abreviatura y estructura, de los compuestos de difenilboranos con sus diferentes aminoácidos (boroxazolidonas).

### 3. OBJETIVOS.

- ♣ Caracterizar el efecto herbicida de las boroxalidonas en la fase luminosa de la fotosíntesis de *Pisum sativum*, así como en la respiración y germinación de semillas de malezas y plantas agrícolas.
- ♣ Relacionar estructura molecular y actividad biológica para proponer patrones de acción de los compuestos ensayados.
- ♣ Determinar la selectividad de los compuestos en monocotiledóneas y dicotiledóneas.



#### 4. ANTECEDENTES:

##### 4.1. QUE SON LOS HERBICIDAS.

El hombre ha luchado contra las malas hierbas desde los inicios de la agricultura. El libro del *Génesis* (3,18) remonta esa lucha al propio Adán, en una de las referencias más antiguas a las plantas nocivas, se le prometen espinas y abrojos en su perfecto Edén (Strobel, 1991).

Por otro lado el aumento en la población genera necesidades alimentarias proporcionales que plantea problemas básicos de aumento en la producción agrícola. Así, el hombre para satisfacer sus necesidades de alimento, cultiva frijol, maíz, verduras, frutas, etc. Sin embargo, por la acción de diferentes plagas tales como (malezas, insectos, hongos etc.), se pierde anualmente una tercera parte de la producción mundial de los cultivos, los cuales actúan durante el crecimiento, la recolección y el almacenamiento. Aunque en los países en vías de desarrollo como los de África, la India y América latina, las pérdidas son del 40%. En la agricultura mexicana la situación es similar al promedio mundial y se calcula entre un 25 y 30%. (Romero, 1995).

El uso actual de pesticidas a nivel mundial es para incrementar la producción agrícola, y la producción de pesticidas es de un 45% para los Estados Unidos, del 25% para Europa Occidental y el 12% para Japón, lo cual deja un 18% para el resto del mundo. Por lo tanto parece que no más del 10% del mercado se encuentra en los países subdesarrollados. No obstante es en estos ahí donde existe la mayor necesidad de productos químicos para incrementar su productividad agrícola, ya que en ellos se encuentra el 49% de la población mundial, así como, el 48% del total de la tierra cultivada en el mundo. Una de las plagas que afectan a los cultivos es la maleza, la cual entra en competencia con las plantas agrícolas por el agua, luz y nutrientes; lo que hace indispensable el uso de herbicidas y se explica el por qué del total de los pesticidas que se consumen a nivel mundial, el 43% corresponden a los herbicidas. (Lotina-Hemsen, 1989). Etimológicamente la palabra herbicida se compone de los vocablos *herbi*: hierba, vegetal; y *cida*: matar, muerte. En sentido amplio un herbicida es todo compuesto químico que inhibe total o parcialmente el crecimiento de malezas: una maleza es una planta que crece donde no se desea o una planta fuera de lugar. (García, 1991).

Investigaciones con compuestos químicos como una vía de control de malezas se dieron cerca de 1910 tanto en Europa como en América. Pero las bases reales para el control químico de malezas se dio con los estudios iniciales de auxinas y la fisiología de hormonas de plantas en los años 30's. La introducción de una auxina sintética reguladora del crecimiento de la planta ácido 2,4-diclorofenoxyacético como un herbicida en 1944 dio el inicio para el desarrollo de químicos para el control de malezas. (Hartmann, 1988). A los inicios de 1940 agricultores de muchos países desarrollaron costosas estrategias de control mecánico para malezas; y así intensivos esfuerzos de investigación para el control de malezas más efectivos (Hartmann, 1988). Cuatro métodos básicos de control de malezas se desarrollaron: (1) medidas preventivas, (2) rotación de cultivos, (3) control biológico y (4) control químico. (Hartmann, 1988). Este último método ha sido el más efectivo, hasta el momento, para el combate de la malezas, lo que hace necesario el uso de herbicidas con efectos mínimos en plantas útiles o en otras formas de vida. es decir, no deben ser tóxicos, se debe poder manejar adecuadamente y ser estable en muchas condiciones de suelo y clima. (Lotina-Hemsen, 1989). Estas investigaciones originaron un nuevo campo de estudio científico multidisciplinario, que involucran a químicos, fisiólogos, bioquímicos, agrónomos etc. y trabajos extensivos en varios colegios agrícolas, más el apoyo del personal de compañías químico-agrícolas, así como de universidades. (Lotina-Hemsen, 1989).

#### 4.2. CLASIFICACION DE HERBICIDAS.

Los herbicidas se clasifican como selectivos o no selectivos (Hartmann, 1988). Por ejemplo el 2,4-D es un herbicida selectivo para plantas de hoja ancha. Rociado en un campo de trigo, por ejemplo puede matar las malezas de hoja ancha tales como el diente de león o la mostaza silvestre, pero no mata pastos o plantas de trigos. Los herbicidas no selectivos, tales como compuestos aromáticos matan toda la vegetación sobre la que son aplicados.

Los herbicidas pueden clasificarse además de acuerdo al tiempo de su aplicación en relación al ciclo de crecimiento de las malezas o del cultivo (Hartmann, 1988).

**Tratamientos de preplantación.** El herbicida se incorpora en el suelo antes de plantar la cosecha. Las plantas de cultivo deben ser tolerantes al herbicida. La acción del herbicida en las malezas puede ser absorbido por la planta, interfiriendo con varios procesos metabólicos de la planta incluyendo la supresión de la división celular (Hartmann, 1988).

**Tratamientos de preemergencia.** Los herbicidas se aplican en la superficie del suelo después de plantar las semillas pero antes de la emergencia de las plantulas de la maleza, del cultivo o ambas. Como la germinación de semillas y el estado de plantulas es una etapa débil en el ciclo de vida anual de la planta, los tratamientos de preplantación y preemergencia son frecuentemente los más usados ya que son muy específicos y se requiere muy poca cantidad de herbicida por área cultivada.

**Tratamiento de post-emergencia.** El tratamiento con el herbicida se sigue después de la emergencia de las plantulas del cultivo, de malezas o ambas. La aplicación es post-emergente para las plantas de cultivo pero de preemergencia para las malezas.

#### 4.3. MODO DE ACCION.

La industria química, por su lado investiga herbicidas de rendimiento máximo, compuestos que bloqueen determinados procesos químicos de las malas hierbas seleccionadas.

Se debe tener en cuenta que no todos los herbicidas tienen un efecto similar en las plantas y que no todos las plantas tienen una respuesta similar a algún herbicida específico.

La inhibición de la fotosíntesis es uno de los efectos primarios más importantes de las triazinas, piradizinas, fenilureas, uracilos etc. El paraquat actúa como aceptor de electrones en la cadena redox del cloroplasto y el paraquat reducido reacciona con el oxígeno produciendo radicales libres de superóxido y este se convierte en radical hidroxilo que es la especie tóxica.

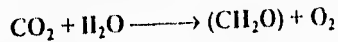
Los clorofenoxialcanos, fenilacéticos, ácido benzoico, dinitroanilinas, nitritos y piridinas afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos entre otros procesos de la planta. Otros como el dinoseb son agentes desacoplantes en la fosforilación oxidativa. Las sales cuaternarias generan radicales libres que forman peróxidos tóxicos. Algunos herbicidas como los tiocarbamatos y dinitroanilinas inhiben la división celular. Otros herbicidas afectan la síntesis de pigmentos (carotenos y clorofila *a* y *b*).

Para ser efectivo, un herbicida debe ser absorbido y movilizado a sitios particulares de actividad dentro de la planta. Algunos penetran más eficazmente por las raíces otros por el follaje. Los herbicidas se aplican en el suelo o rociándolos en el follaje dependiendo de cual tratamiento es más efectivo para matar malezas o en obtener la selectividad deseada entre los cultivos. La persistencia de los herbicidas en el suelo es un factor de eficiencia y selectividad para un herbicida. Generalmente es deseable desde el punto de vista agrícola y ambiental, que los herbicidas persistan solo lo bastante para completar su actividad herbicida. Después de un tiempo ideal los herbicidas deben ser degradados a compuestos inofensivos por microorganismos o actividad química, fotodescomposición o ser removidos del biosistema (Linscott, 1988).

## 4.4. FOTOSÍNTESIS.

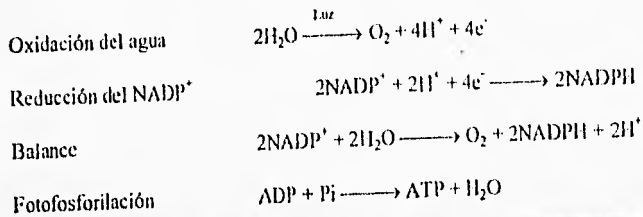
### 4.4.1. GENERALIDADES.

Cuando se ilumina con luz visible a los cloroplastos estos reducen el anhídrido carbónico a compuestos orgánicos principalmente glúcidos; esta reducción viene acompañada por una liberación de  $O_2$  en un volumen igual al del anhídrido carbónico que se ha reducido (Berkaloff, 1983). La ecuación global de esta reacción que constituye la fotosíntesis se puede escribir:



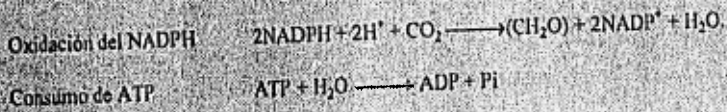
#### Fase luminosa de la fotosíntesis.

##### Membrana del tilacoide



#### Fase oscura de la fotosíntesis.

##### Estroma



### 4.4.2. EL CLOROPLASTO.

Los cloroplastos (figura 1, a.) son plastidios, orgánulos vesiculares membranosos característicos de las algas verdes y plantas superiores. En una célula puede haber de uno a un centenar de cloroplastos. Son considerablemente más grandes que las mitocondrias: tienen de 4 a 10  $\mu m$  de diámetro y 1-2  $\mu m$  de espesor.

Poseen una envoltura formada por una doble membrana que encierra una matriz interior, el estroma. Dentro del estroma se encuentran unas vesículas aplanadas que son los tilacoides. Las membranas del cloroplasto delimitan tres compartimientos: en primer lugar uno que está comprendido entre las dos membranas de la envoltura y que es el espacio intermembranal, seguidamente otro que

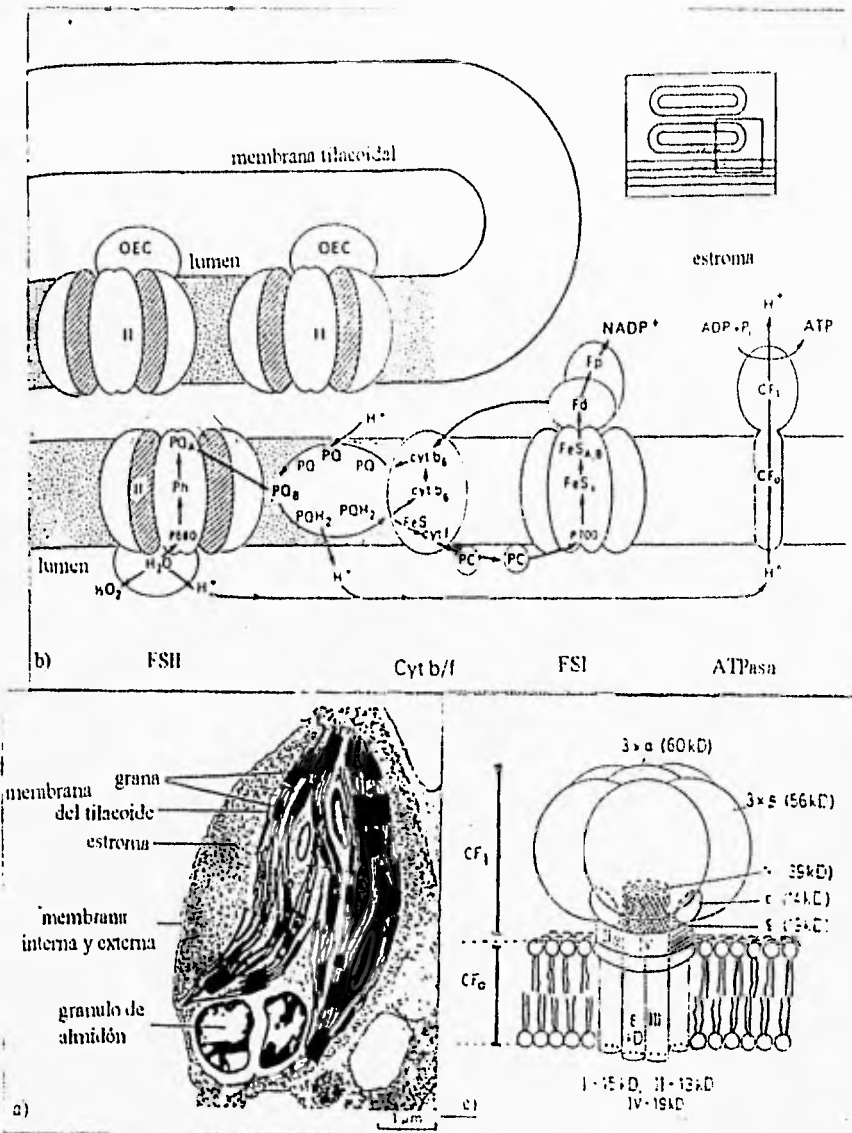


Figura 1. a) Estructura del cloroplasto; b) Organización de la membrana tilacoide; c) Modelo esquemático de la ATPasa. (Tomado de Darnell. 1990. Molecular cell biology. (a); Fuerst. 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. Weed Science. (b y C)).

está limitado por la membrana interna de la envoltura y que es el estroma y finalmente el tercer compartimento que corresponde a las cavidades limitadas por las membranas de los tilacoides: es el espacio intratilacoide (llamado también espacio intralamelar o lóculus) (Berkaloff, 1983). Las membranas de los tilacoides están constituidas por un 38% de lípidos, un 12% de pigmentos y un 50% de proteínas. Los lípidos presentan las mismas características que los de las membranas de la envoltura: los más importantes son los galactolípidos, que constituyen por sí solos la mitad de los lípidos totales, después vienen los fosfolípidos y los sulfolípidos (Berkaloff, 1983). Varios tilacoides pueden estar apilados en una región específica, formando lo que se denomina grana (Nicholls, 1992).

El estroma es un gel muy rico en proteínas (0.4 g por  $\text{cm}^3$ ) de las cuales la mayoría son enzimas; contiene también diversos iones y moléculas orgánicas:  $\text{Mg}^{2+}$ , fosfato, nucleótidos, azúcares, ácidos orgánicos, etc., finalmente el estroma posee ADN, ARN y plastroribosomas. Además existen a menudo en el estroma inclusiones insolubles: granos de almidón que permiten el almacenamiento de las hexosas en forma polimerizada e inclusiones lipídicas ricas en plastoquinona que son los plastoglobulos (Berkaloff, 1983). La membrana tilacooidal contiene diversas proteínas que están involucradas en la captación de los cuantos de luz, transporte de electrones, captación de protones y otras reacciones enzimáticas. Cada una de estas proteínas y complejos están orientados asimétricamente en la membrana tilacooidal. Aunque a primera vista la estructura de los cloroplastos parece muy diferente a la de las mitocondrias, la única diferencia topológica es que los tilacoides, a diferencia de las crestas mitocondriales, están separados de la membrana interna de modo que el espacio intratilacoide es un compartimento aislado, mientras que el espacio "intracrestal" es una continuación del espacio intermembranal de la mitocondria.

La producción de ATP por las membranas fotosintéticas transductoras de energía implica el establecimiento de un circuito de protones que presenta una gran analogía con el de las mitocondrias. Se genera un potencial electroquímico de  $\text{H}^+$  de 200 mV a través de una membrana impermeable a los protones. Este gradiente dirige una  $\text{H}^+$ -ATPasa translocadora de protones en la dirección de síntesis de ATP. Las dos características exclusivas de los sistemas fotosintéticos son: los fotorreceptores responsables de la captura de fotones y los centros de reacción (CR) a donde se dirige la energía luminosa. Los CR poseen un potencial redox positivo excitándose cuando absorben un fotón y liberando un electrón a un potencial que es casi 1 voltio más negativo. De esta forma la energía luminosa se transforma directamente en energía potencial redox. En los cloroplastos donde los electrones son extraídos del  $\text{H}_2\text{O}$  que después se transmiten a favor de un gradiente, circulando a través del CR, para ser aceptados por el NADP<sup>+</sup> a un potencial que es 1.1 voltios más negativo que el del par  $1/2 \text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ . Los cloroplastos no sólo llevan a cabo esta transferencia "endergónica" de electrones sino que al mismo tiempo generan un gradiente de protones  $\text{H}^+$  que se utiliza para la síntesis de ATP (figura 1,b) El ATP y el NADPH productos de la fase luminosa se utilizarán luego en las reacciones oscuras de la fotosíntesis que fijan el  $\text{CO}_2$  (Ciclo de Calvin cuyas enzimas se encuentran localizadas en el estroma del cloroplasto). Las membranas de los organismos fotosintéticos contienen gran cantidad de pigmentos fotorreceptores que absorben luz y transfieren esta energía a unos centros de reacción específicos (CR). La interacción de un fotón con el centro de reacción provoca en uno de los componentes un gran cambio en su potencial estándar, que se hace más negativo. Resulta así que puede donarse un electrón a un aceptor cuyo potencial es hasta 1 voltio más negativo que el potencial del componente en el CR no excitado. Por cada CR hay entre 30 a 3000 clorofilas fotorreceptoras lo que impide detectar cambios espectrales debidos al CR ya que hay una gran absorción de fondo por estos pigmentos receptores (Nicholls, 1992)

#### 4.4.3. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES.

La transferencia de electrones fotosintéticos en los cloroplastos se diferencia de la que tiene lugar en las bacterias en dos aspectos: (1) existe un flujo de electrones no cíclica, produciéndose una oxidación del  $H_2O$  que dona  $e^-$  en el CR del FSI y una reducción estequiométrica del  $NADP^+$  al aceptar  $2e^-$  y  $H^+$ ; (2) hay dos reacciones luminosas o fotoeventos independientes que actúan en serie abarcando la amplitud de potencial redox existente entre el par  $H_2O/1/2O_2$  y el  $NADP^+/NADPH$ .

El fotosistema II posee una notable capacidad para extraer electrones del  $H_2O$  al oxidarlo ( $H_2O/1/2 O_2 E_{m,7} = +820$  mV) catalizada por la enzima que fotoliza el agua y con 4 fotoeventos se lo transfiere al acarreador  $Y_D$  que es una tirosina de la proteína  $D_1$  del centro de reacción y  $Y_D$  se lo dona CRII. El donador primario de los electrones en el fotosistema II (FSII) se denomina  $P_{680}$  y es un dímero de clorofila *a* unido a  $D_2$  en donde  $D_1$  y  $D_2$  están interaccionando para formar el complejo del CRII: Al igual que con el FSI, se genera un campo eléctrico en menos de 20 ns. El donador que cede sus electrones al FSI es el  $H_2O$ . Esta reacción es catalizada por la enzima que fotoliza el agua con cuatro estados "S" de oxidación que cede 4 electrones al  $P_{680}$  antes de oxidar 2 moléculas de  $H_2O$  a  $O_2 + 4H^+ + 4e^-$ . El electrón es transportado vía feofitina que es de estructura de clorofila *a* sin la coordinación del ión metálico magnesio y este electrón es transferido al aceptor secundario una quinona,  $Q_A$ , y a un átomo de Fe para el siguiente aceptor de electrones  $Q_B$ . El electrón del aceptor secundario  $Q_B$  es rápidamente transferido a la plastoquinona, PQ; cuando  $Q_B$  acepta  $2e^-$ , también toma 2 protones del estroma y tanto electrones y protones pasan a lo largo de la cadena transportadora de electrones, cuando  $Q_B$  es subsecuentemente oxidada por la poza vecina de plastoquinonas. La plastoquinona se parece a la UQ de las bacterias en el hecho de que alterna entre el estado totalmente oxidado y la forma de semiquinona aniónica (PQ). Al igual que con el CR de las bacterias, una segunda PQ ligada podría actuar como transductor de  $2e^-$  y  $2H^+$  antes de que estos sean liberados a la poza de PQ de la membrana.

Cuando se oxida, PQ dona 2 electrones al aceptor del FSI y libera 2 protones para el lado interno del tilacoide dentro del espacio del lumen. Esto provoca un aumento de protones en el lumen que conduce a la formación de ATP, por medio de la unión de la velocidad de fotofosforilación y del transporte de electrones. Mediante el flujo de electrones entre la poza de PQ y la molécula de plastocianina, PC, que sirve como donador primario de electrones para el PSI, que es un complejo citocromo  $b_6$ /citocromo  $f$  (cyt  $b_6/f$ ). El sitio de oxidación para reducir la hidroquinona, PQH<sub>2</sub>, es un sitio Hierro-Azufre (Fe-S), donde los protones son liberados y los electrones pasan rápidamente al citocromo  $f$  dentro del complejo. El citocromo  $f$  reduce a la plastocianina, PC, que entonces reduce al  $P_{700}$ , la naturaleza del aceptor primario es una molécula de clorofila *a* unida a su proteína llamada  $A_0$  y después que se reduce transfiere sus electrones al acarreador de electrones  $A_1$  que tiene a una filoquinona como cofactor unido a su proteína y reducen al aceptor que contiene Hierro, X. ( $[4Fe-4S]_X$ ) que pasan los electrones a las dos centros Hierro-Azufre, A y B ( $[4Fe-4S]_A$  y  $[4Fe-4S]_B$ ). De aquí los electrones se transfieren a la ferredoxina, Fd. (cuyo  $E_m$  es de -530 mV) que a su vez reduce al  $NADP^+$  con la ayuda de la ferredoxina-NADP oxidoreductasa. El donador primario  $P_{700}^+$  vuelve al estado reducido (en menos de 200  $\mu s$ ) al aceptar 1 electrón del donador plastocianina (PC), que tiene un potencial de reducción de  $E_m$  de + 370 mV.

Al igual que ocurre con el complejo III mitocondrial y con la transferencia de electrones en las bacterias purpúreas, se ha propuesto una serie de papeles a las quinonas (Hauska y Trebst 1977) que incluyen ciclos análogos al ciclo-Q mitocondrial o ciclo *b* en los que están implicados UQ y citocromos de tipo *b*.

La respuesta de los carotenoides a la energización producida por la iluminación de los cloroplastos indica que los dos fotosistemas se encuentran orientados en la membrana. El hecho de que se puedan acumular aniones lipofílicos en el interior del espacio intratilacoidal cuando se iluminan los cloroplastos indica que los fotosistemas transportan los electrones hacia el exterior, generando un potencial eléctrico positivo en el espacio intratilacoidal. Otras evidencias sobre la orientación del FSII provienen de la observación de que los protones liberados al disociarse la molécula de agua sólo se detectan en el medio acuoso si se añade un colorante que efectúe reacciones ácido-base y lipofílico para que se pueda translocar del interior del tilacoide al del lumen tilacoidal y reaccionar con los protones; de aquí es fácil deducir que la oxidación del agua tiene lugar en la cara interna del tilacoide. Por otra parte, el acarreador de  $e^-$   $X_{323}$  o  $Q_A$  debe encontrarse próximo a la cara externa del tilacoide( el estroma) ya que es accesible a aceptores de electrones no permeables, como el ferricianuro, después de un tratamiento breve con tripsina se hace accesible al ferricianuro que es soluble en agua (Nicholls, 1992).

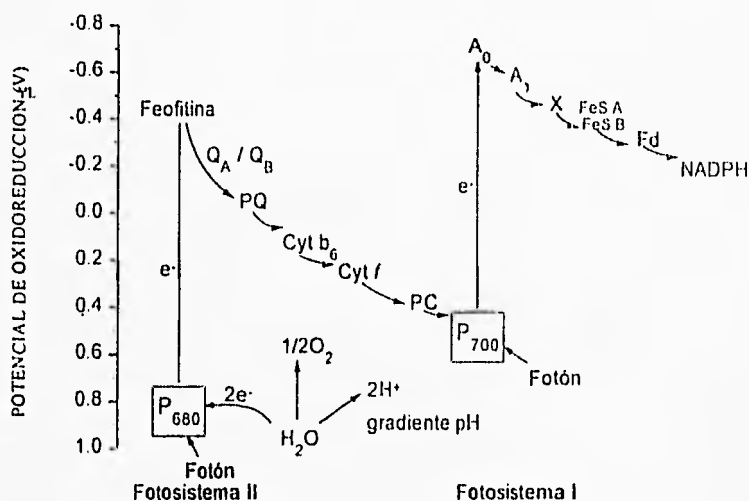


Figura 2. El esquema 2. Los componentes de la transferencia de electrones y sus potenciales redox en los sistemas fotosintéticos de las plantas. (modificado de Fuerst, 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. En *Weed Science*.)

#### 4.4.4. CIRCUITO DE PROTONES.

La orientación de la vía de transferencia de electrones y de la ATP sintetasa indican que el circuito de protones en los cloroplastos funciona en sentido contrario al de las mitocondrias intactas.

Por lo tanto, cuando se iluminan cloroplastos que tienen la envoltura rota, se produce una toma de protones y se alcaliniza el medio externo que se puede detectar con un microelectrodo combinado sensible. El  $\Delta$  inicial que se produce en las reacciones luminosas se convierte en  $\Delta pH$  en cuestión de segundos debido a la captación de protones con acidificación del lumen y alcalinización del estroma; y simultáneamente ocurre una redistribución del  $Mg^{2+}$  que se transporta en la membrana tilacoidal del lumen al estroma.

Las enzimas redox de la cadena transportadora de electrones ordenada por sus potenciales de reducción están representados en el esquema "Z" (figura 2) y esta predice que por cada 2 electrones transferidos aparecen 2 protones en el espacio intratilacoidal debido a la fotólisis del agua y otros dos desaparecen del medio debido a la formación de la  $PQH_2$ . La estequiometría asociada al FSI dependerá de la naturaleza del aceptor terminal. En el caso de que sea un aceptor ( $2H^+2e^-$ ) desaparecerán 2 protones del medio; la reducción estequiométrica del aceptor natural, el  $NADP^+$ , aceptor de ( $H^+ + 2e^-$ ), conduce a la toma de un protón, mientras que un aceptor exclusivo de electrones (como el ferricianuro) no conduce a la entrada de ningún protón. En cualquier caso aparecen 2 protones en el espacio del lumen tilacoidal debido a la reoxidación de la  $PQH_2$  y el agua. La ATP sintetasa (figura 1. c) de cloroplastos es muy similar a la de la mitocondria, por eso se observa una entrada de  $H^+$  dependiente de ATP cuando en la oscuridad se crea un  $\Delta pH$  artificial. Al igual que con otros sistemas hay desacuerdo sobre la estequiometría  $H^+/ATP$ , habiéndose sugerido los valores 2 y 3 (Hauska y Trebst 1977, en Nicholls, 1992).

#### 4.5. MECANISMO DE ACCION DE LOS HERBICIDAS EN LA FOTOSINTESIS.

##### 4.5.1. INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

El transporte de electrones es inhibido cuando uno o más intermediarios de la cadena transportadora de electrones son removidas o inactivadas. El sitio de acción de muchos herbicidas inhibidores del transporte de electrones estudiados se asocian marcadamente en el fotosistema II, reacciones acopladas al FSI son inhibidas, como el transporte de electrones no cíclico, desacoplado o fosforilado con el  $H_2O$  como donador de  $e^-$  y con varios aceptores de electrones (ferricianuro,  $NADP$ , PD, PMS, DPIP oxidado). La fosforilación del ADP por el  $P_i$  catalizada por la  $H^+$ -ATPasa está acoplada al flujo de electrones y como esta última vía es inhibida no se crea un gradiente electroquímico de  $pH$  y no habrá síntesis de ATP.

Reacciones parciales no dependientes del FSI, tales como la fosforilación cíclica ensayadas en la ausencia de oxígeno o la fotoreducción del  $NADP$  con un donador de electrones que evita al FSI (ascorbato + DCPIP ó DAD) no son inhibidos o débilmente afectados.

Un ejemplo de inhibidor del transporte de electrones es el: Diuron (Duysens y Ames, 1962 en Moreland 1980) con actividad en el FSI entre una enzima redox llamada R o B cuyo cofactor es PQ. El transporte de electrones mediado con la plastoquinona está dado por la transferencia de 2 electrones durante la reacción. El sitio de acción del Diuron está localizado entre  $Q_A$  y  $Q_B$ . Herbicidas que interfieren con el transporte de electrones son: alquilnitridos, p-alquitioanilidas, amino-triazinonas, azido-s-triazinas, bis-carbamatos, difenileteres, piridazinonas, triazinonas, urea-carbamatos, uracilos. Se ha encontrado que los herbicidas al inhibir la reacción de  $H_{II}$  interactúan con la proteína  $Q_A$  de 32 KD inducen un cambio conformacional. La unión a la proteína podría inducir que el flujo de electrones cambie los parámetros termodinamicamente o cambie las constantes cinéticas del flujo de  $e^-$ . Trebst y Draber y Pfister y Arntzen sugieren que varias familias de herbicidas tienen sitios de unión específicos



y de solapamiento; que protegen a la proteína. Ellos postulan que esta unión induce cambios conformacionales que podrían inhibir el flujo de electrones (Moreland, 1980).

#### 4.5.2. DESACOPLANTES.

Los desacoplantes disocian el transporte de electrones de la formación de ATP por la disipación de alguna vía del estado energizado de la membrana, que ahora se sabe es un gradiente electroquímico de pH y potencial de membrana que después es utilizado por la H<sup>+</sup>-ATPasa para la fosforilación del ADP y formar ATP. La perfliudona es uno de los herbicidas que ha sido reportado que funciona como desacoplante puro en la fotofosforilación a pH = 8 (Moreland, 1980).

#### 4.5.3. INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGIA.

Los inhibidores de la transferencia de energía actúan uniéndose directamente al complejo H<sup>+</sup>-ATPasa. Al inhibir la fosforilación del complejo H<sup>+</sup>-ATPasa, ellos inhiben los flujos de electrones acoplados para la síntesis de ATP. Sin embargo, la adición de un desacoplante, que proporciona una ruta alternativa para la disipación de un estado de alta energía elimina la inhibición del flujo de electrones, pero no la formación de ATP. Existen evidencias de que los inhibidores de la transferencia de energía interfieren en más de un paso de la fosforilación del factor hidrofóbico CF<sub>0</sub> o del factor de acoplamiento CF<sub>1</sub> de la ATPasa, uniéndose ya sea a CF<sub>0</sub> ó CF<sub>1</sub>, así como también en ambos complejos. (Moreland, 1980).

#### 4.5.4. INHIBIDORES DESACOPLANTES.

El termino "inhibidores desacoplantes" es usado para indicar a los herbicidas que simultáneamente tienen propiedades de inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes. Estos inhiben el transporte de electrones desacoplado y acoplado de la misma manera que los inhibidores de la reacción de Hill como el Diuron, pero el transporte de electrones basal y/o fosforilante es activado. La fotofosforilación no-cíclica es inhibida y la reacción de fosforilación es más sensible que la reducción del ferriicianuro. La fotofosforilación cíclica ensayada en la cual no ocurre desprendimiento de oxígeno también es inhibida y la reducción del NADP tampoco ocurre. El FSI cíclico utilizando DCPIP-ascorbato no es inhibido; sin embargo la fosforilación acoplada a este flujo de electrones sí es inhibida. Los inhibidores desacoplantes, también inhiben fuertemente la síntesis de ATP mediada por ditiotreitól y PMS. Algunos dinitrofenoles y dinitrofenoles alquilados son identificados frecuentemente como este tipo de herbicidas (Moreland, 1980).

#### 4.5.5. ACEPTORES DE ELECTRONES.

Los compuestos que se clasifican como aceptores de electrones son capaces de competir con algún componente enzimático de la cadena redox y subsecuentemente sufren una reducción. Como ejemplo tenemos: paraquat o metilviológeno, ferricianuro, DCPIP, DAD, PMS, FMN, etc., que son usados para estudios *in vitro* de reacciones parciales de los fotosistemas (Moreland, 1980).

#### 4.6. GERMINACION.

La germinación se inicia con la captación de agua por la semilla (imbibición) y finaliza con el inicio de la elongación del eje embrionario, generalmente la radícula. Esto incluye numerosos eventos, como hidratación de proteínas, cambios estructurales a nivel subcelular, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular (Bewley, 1994).

##### 4.6.1. RESPIRACION DE LAS SEMILLAS DURANTE LA IMBIBICION Y GERMINACION.

La respiración de semillas maduras "secas" (contenido usual de humedad: 10-15 %) es a niveles bajos de agua cuando se le compara en el desarrollo ó germinación de las semillas en el momento en que son imbibidas. Algunos cetoácidos (e.g.  $\alpha$ -cetoglutarato, piruvato que son importantes intermediarios en la vía respiratoria) son inestables químicamente y pueden estar ausentes de las semillas secas. En eventos tempranos de la imbibición se sintetizan metabolitos en los primeros minutos después de entrar agua a la célula, es su reformatión de aminoácidos y transaminaciones (e.g. de ácido glutámico y alanina). El consumo de  $O_2$  por el embrión de algunas semillas sigue el modelo básico que consiste en tres o cuatro fases (Bewley, 1994).

**Fase I.** Inicialmente ocurre un rápido incremento en el consumo de  $O_2$ , que puede atribuirse en parte a la activación y la hidratación de enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido cítrico y la cadena transportadora de electrones. La respiración en esta fase se incrementa linealmente de acuerdo con el grado de hidratación del tejido.

**Fase II.** Se caracteriza por una estabilización o retraso de la respiración, en el cual hay incremento lento en el nivel de oxígeno. La hidratación de las diferentes partes de las semillas está completa y todas las enzimas preexistentes están activadas. Presumiblemente éste es un pequeño incremento en los niveles de enzimas respiratorias o en el número de mitocondrias durante esta fase. El retraso de la fase II en algunas semillas puede ser en parte porque las membranas de las células o estructuras circundantes limitan la difusión y nivel del  $O_2$  al embrión imbibido o tejido almacenado, primero temporalmente a condiciones parcialmente anaeróbicas. La eliminación de la testa de semillas imbibidas de chícharo por ejemplo, disminuye el retardo de la fase apreciablemente. Otra posible razón para el retardo de la activación de la vía de la glucólisis durante la germinación es debido por el lento desarrollo de las mitocondrias. Esto puede llevar a la acumulación de piruvato debido a la deficiencia en el ciclo del ácido cítrico o de la cadena de la fosforilación oxidativa (transporte de electrones), por lo tanto, algunos piruvatos pueden ser desviados temporalmente a la vía fermentativa que no requiere  $O_2$ . Entre la fase II y la III la radícula del embrión penetra en las estructuras circundantes (recubrimiento), y la germinación se ha completado.

**Fase III.** Se caracteriza por un segundo disparo de la respiración, esto se puede atribuir a un incremento en la actividad respiratoria de mitocondrias y enzimas recién sintetizadas por las células proliferativas del eje. El número de mitocondrias en el tejido también incrementa, muchas veces en asociación con la movilización de reservas. Otro factor que contribuye a este proceso en la respiración en ambas partes de la semilla puede ser un incremento en el suministro de  $O_2$  por la ahora perforada testa (u otras estructuras de recubrimiento).

**Fase IV.** Esto se presenta solo en el tejido de almacenamiento y coincide con su envejecimiento seguido de la reducción de las reservas acumuladas. La duración de las fases I-IV varía de especie a especie esta dado por diferentes factores como son: diferencias en la velocidad de imbibición, permeabilidad de la membrana de la semilla al oxígeno y velocidades metabólicas. Además la duración

de las fases puede variar considerablemente con las condiciones del ambiente, especialmente la temperatura. (Bewley, 1994).

#### 4.6.2. DESARROLLO MITOCONDRIAL Y FOSFORILACION OXIDATIVA.

Las mitocondrias en semillas jóvenes e imbibidas son funcional y estructuralmente deficientes. Ha sido cuestionado si pueden conducir eficientemente la fosforilación oxidativa durante las primeras horas después de la hidratación. Las mitocondrias en semillas secas están característicamente mal diferenciadas. Para entender los cambios que ocurren en la mitocondria durante la germinación nosotros debemos primero revisar las rutas por las que los sustratos oxidables entran a este orgánulo y cómo entonces se involucran en la fosforilación oxidativa. En la glicolisis y otras vías metabólicas reducen al NAD en NADH.

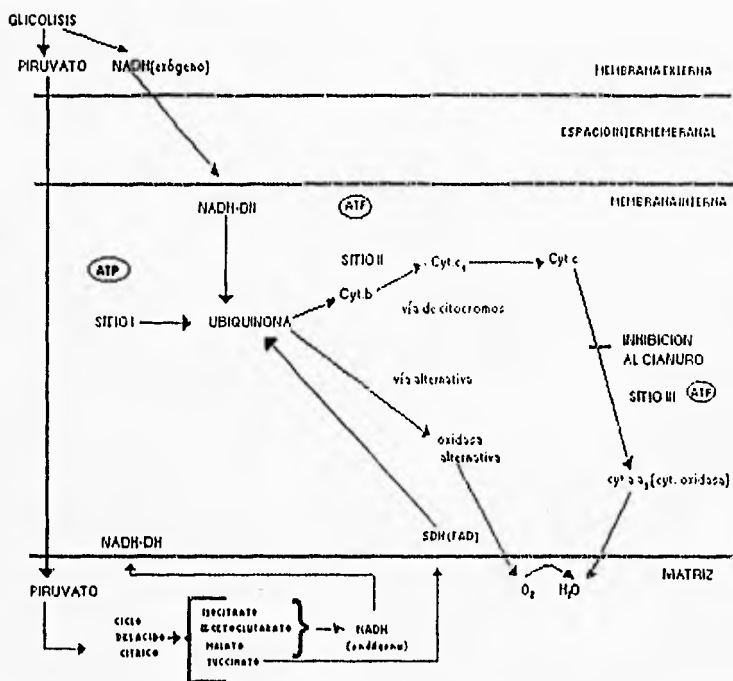


Figura 3. Vías de electrones y utilización del poder reductor en mitocondria de planta. NADH-DH, NADH deshidrogenasa; SDH(FAD), flavoproteína unida a succinato deshidrogenasa; cyt, citocromo; sitios I-III, sitios de extracción de protones, utilizados posteriormente en la producción de ATP (círculo). (tomado de Bewley, 1994. Seeds)

La membrana externa de la mitocondria es permeable al NADH (llamado NADH exógeno porque se produce del lado externo de la mitocondria) y este pasa al espacio intermembranal. El piruvato también penetra a la mitocondria, es transportado a través de la membrana interna mitocondrial al interior de la matriz, que contiene a las enzimas del ciclo del ácido cítrico. Este ciclo también produce NADH (llamado NADH endógeno porque se forma en el interior de la mitocondria) tanto el NADH endógeno como exógeno se dividen por su unión a membrana del complejo NADH deshidrogenasa, aunque la liberación de equivalentes reducidos (electrones) entran en la cadena de transporte de electrones en diferentes sitios. Los electrones originados del NADH endógeno son transferidos a la Ubiquinona acoplada al flujo de protones del Sitio I que permite la conservación de energía, impulsada por la fosforilación; para formar ATP. Los electrones producidos del NADH exógeno no son transferidos vía sitio I sino que pasan directamente a la poza de Ubiquinona, así elimina el primer paso de la fosforilación. La oxidación del succinato a malato en el ciclo del ácido cítrico no está ligada al NAD; la succinato deshidrogenasa (SDH) está insertada en el interior de la membrana del lado de la matriz, y los electrones producidos son transferidos a la Ubiquinona. Los electrones se transfieren de la Ubiquinona al citocromo *b*, *c*<sub>1</sub> y *c* y finalmente al O<sub>2</sub> vía citocromo oxidasa (*aa*<sub>3</sub>). Esta parte de la cadena es muy importante porque incluye dos sitios de extrusión de protones y consecuentemente, de conservación de energía. (figura 3)

La mitocondria del tejido de muchas plantas superiores posee una vía alternativa de la transferencia de electrones diferente de la cadena del citocromo, es insensible al cianuro (y de aquí que se le denomine vía insensible al cianuro). Esta vía alternativa está conectada entre la Ubiquinona y citocromo *b* de la vía sensible al cianuro y los electrones fluyen a un sistema "oxidativo alternativo" (no totalmente caracterizado) al O<sub>2</sub>. Ahí no hay sitios de conservación de energía para esta vía y por lo tanto cuando el NADH exógeno y el succinato son oxidados por esta ruta, no hay producción de ATP. Cuando un NAD unido a sustrato de la matriz mitocondrial, tal como malato y  $\alpha$ -cetoglutarato, es oxidado a través de una vía alternativa, solo un ATP es producido (Sitio I) comparado con los tres ATP de los Sitios I, II, III, cuando los electrones pasan a través de la vía del citocromo sensible a cianuro. Las mitocondrias de embriones imbibidos y de tejido de reserva no están totalmente diferenciadas internamente. Como es de esperarse, estas exhiben deficiencias en su capacidad para utilizar el poder de reducción del NADH y de la succinato deshidrogenasa (SDH) y para conducir la fosforilación oxidativa. La transferencia de electrones del succinato a la Ubiquinona así como la del NADH exógeno a la Ubiquinona, están presentes en las mitocondrias de semillas y son activados inmediatamente después de la hidratación. Aunque esta vía puede ser inicialmente baja en actividad, las mitocondrias comienzan a aumentar su velocidad de respiración considerablemente después de cierto tiempo de hidratación. Un rasgo general de la oxidación de sustratos en mitocondrias de semillas, es que esta se incrementa con el tiempo de imbibición, lo cual puede deberse a un aumento en la eficiencia de las mitocondrias existentes y/o a un incremento en el número de mitocondrias sintetizadas. Por ello hay dos modelos diferentes de desarrollo de mitocondrias en semillas imbibidas: (1) Reparación y activación de organelos ya existentes en la semilla madura y seca (2) biogénesis de nuevas mitocondrias. Después de la germinación, se puede considerar la biogénesis de mitocondrias en las nuevas células que se forman en el eje de crecimiento por divisiones mitóticas. La síntesis de ATP durante la germinación ha sido estudiada en pocas especies de semillas, pero tiene el mismo patrón general de emergencia. El nivel de ATP en semillas secas es extremadamente bajo comparado con otros adenin nucleótidos (ADP y AMP) pero se incrementa rápidamente cuando se hidrata la mitocondria. Durante la fase retardada de consumo de oxígeno los niveles de ATP están lejos de ser constantes mientras que el incremento en ATP ocurre antes de la germinación. El incremento de ATP en las semillas está acompañado por un incremento en la totalidad de adenin nucleótidos los cuales sugieren un requerimiento inicial para la síntesis de *ново* de estos nucleótidos. Los niveles de ATP retornan

rápidamente a su control de estos nucleótidos cuando ocurre una reintroducción de oxígeno atmosférico a las semillas. Durante esta fase sin embargo no hay un incremento neto en ATP. El intervalo de esta síntesis es balanceada exactamente por su intervalo de utilización.

El incremento en ATP está acompañado por un incremento en la actividad metabólica del embrión. Los nucleótidos de piridín reducidos (NADH, NADPH) son coenzimas esenciales para numerosas vías metabólicas y son requeridos para la germinación de la semilla, desarrollo de la plantula y para órganos de reserva. Estas moléculas participan en la respiración, reacciones de aminación, síntesis de desoxinucleótidos y catabolismo de ácidos grasos. Estas vías metabólicas pueden estar controladas por la disponibilidad de estas coenzimas o por su reoxidación dentro de la célula.

Desde las primeras horas de imbibición a varios días (varía de especie a especie) después de iniciada esta predominan las vías glicolíticas, favoreciendo la formación de piruvato y síntesis de ATP. El piruvato es convertido a etanol bajo condiciones parcialmente anaeróbicas y tienden a prevalecer las semillas intactas ante la emergencia de la radícula. Por canales respiratorios el sustrato penetra a la vía glicolítica y bajo estas condiciones las células pueden reducir la producción de ATP, ya que la disponibilidad de oxígeno es limitada para la mitocondria, esta muere en una anaerobiosis natural, o por deficiencias estructurales o enzimáticas. Después, predomina la vía de las pentosas y como la mitocondria empieza a ser más activa y el oxígeno más disponible, las células entran en un período de producción de energía para incrementar la actividad metabólica asociada con el crecimiento y la movilización de reservas; con la producción de NADPH, se provee e incrementa el poder de reducción. La aldolasa y fosfofructocinasa ambas enzimas de la vía glicolítica, declinan su actividad en radículas y así también para los cotiledones, durante los 1-3 días de sembrado. La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la vía de las pentosas incrementan su actividad después de la imbibición, particularmente en regiones del crecimiento (Bewley, 1994).

#### 4.6.3. EVENTOS DURANTE LA GERMINACION.

La síntesis de proteínas es esencial para completar la germinación y la emergencia de la radícula. Esta comienza después de la imbibición y la mayor parte es independiente de la síntesis de ARN *de novo*. Antes de terminar la germinación, no obstante, nuevamente se forma ARN necesario probablemente para la síntesis de proteínas. En otras palabras, la síntesis de ADN en muchas semillas ocurre después de la germinación y es una parte integral del crecimiento del eje. La síntesis de proteínas se inicia en el citoplasma de la célula hidratada cuando los ribosomas se asocian con el ARN mensajero.

Aunque la síntesis de proteínas puede presentarse en ausencia de síntesis de ARN durante el inicio de la imbibición, es eventualmente dependiente de esta después de que la germinación ha terminado. Es probable que dos clases de ARNm estén presentes en el embrión seco o eje: (1) residuos de ARNm, estos fueron producidos durante el desarrollo de la semilla y no se destruyeron durante la maduración y desecación. Estos no son esenciales para la germinación y pueden degradarse inicialmente después de la imbibición. (2) Reservas o ARNm conservados, estos son almacenados durante el desarrollo, así que están disponibles inmediatamente después de la hidratación y por lo tanto pueden ser traducidos rápidamente para síntesis de proteínas que son parte integral de la germinación. La iniciación y continuación de la síntesis de ARN es dependiente de la existencia de precursores de ribonucleosidos de trifosfato, ATP, CTP, GTP y UTP (Bewley, 1994).

La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por elongación celular y su subsecuente emergencia a través de la testa de la semilla puede o no ser acompañada de la división

celular. Por lo tanto, la síntesis de ADN y la división celular son fenómenos posteriores a la concurrencia con el crecimiento del eje y el establecimiento de la plántula (dependiendo de la semilla).

El incremento de evidencias sugiere (Callis, 1995) que la degradación de proteínas es un mecanismo regulatorio *in vivo*. La degradación de muchas proteínas intracelulares es dependiente del ATP, que no parece basarse necesariamente en la energética de la hidrólisis de enlaces peptídicos, pero que proporciona un mecanismo potencial para la regulación. Durante la germinación, la hidrólisis de proteínas de reserva provee aminoácidos para la síntesis de proteínas en el crecimiento de la plántula. Las proteínas de reserva de la semilla, son sintetizadas en parte de aminoácidos producidos por la proteólisis de proteínas vegetativas. Son sintetizadas durante la maduración de la semilla y degradadas durante la germinación, como pequeños péptidos o aminoácidos, para posteriormente ser transmitidos y utilizados en el crecimiento de la planta (Callis, 1995). Los nucleótidos juegan un papel importante en el metabolismo; participan, regulando las fases metabólicas de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además de atrapar, conservar y transferir energía en los sistemas vivos (Mangat, 1979).

Durante la germinación, el papel de la ATPasa vegetal es importante ya que su buen funcionamiento implica el que otras funciones tales como: la elongación celular, la apertura de los estomas y la carga de floema y xilema se realicen correctamente. Las funciones propuestas para la ATPasa de plantas se basan en la investigación de los efectos provocados por sustancias fitoregulatorias (fusicoquina, auxina) en la fisiología (elongación celular apertura de los estomas) y en la velocidad de salida de protones de tejidos. Pero el efecto de los fitoreguladores no demuestra de manera tajante que la salida de protones detectada sea mediada por la ATPasa de membrana plasmática. Aunque la enzima es capaz de bombear protones *in vitro*, no se ha podido probar, mediante análisis de mutaciones, donde se altera la actividad de la ATPasa, así como que la enzima sea directamente responsable de la salida de protones *in vivo* (Serrano, 1993).

La auxina constituye la principal hormona del crecimiento vegetal: se sintetiza en los meristemas de tallos y coleófilos y actúa en la parte submeristemática de células jóvenes, donde promueve la salida de protones e induce la elongación celular. En estos tejidos, se ha sugerido, que la auxina activaría la enzima ATPasa, si bien lo haría con menos eficacia que la fusicoquina (Serrano, 1993). La teoría del crecimiento ácido propuesta a finales de los años sesenta por Achim Hager, de la Universidad de Tubinga, para explicar la correlación entre salida de protones y elongación celular inducida por auxina, sostiene que la función primordial de la auxina consiste en activar la ATPasa y que los protones bombeados por ésta actúan sobre la pared de los polisacáridos que confinan a las células (Serrano, 1993). Al acidificarse esta región, se debilitarían los puentes de pectina y hemicelulosa. Este debilitamiento podría ocurrir por medios físicos o mediante polisacaridasas de la pared que requerirían un entorno con un pH ácido para trabajar adecuadamente. Al debilitarse la pared, la presión de turgencia de las células forzaría su crecimiento. Si bien la hipótesis tiene cierto respaldo, resulta evidente que la salida de protones no puede explicar todos los efectos de la auxina, ya que este fitoregulador induce la síntesis de muchas proteínas de función desconocida y activa la secreción de componentes de la membrana y de la pared para permitir el aumento de tamaño de las células. Pero aunque la activación de la ATPasa no sea el único componente de la respuesta fisiológica a la auxina, sí desempeña un papel crucial, porque, además de expulsar protones que reblandecerían la pared, aporta la energía para el transporte activo de potasio y azúcares necesarios para el crecimiento (Serrano, 1993).

#### 4.7. ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS.

El embrión maduro de plantas con flores consiste en un eje parecido a un pequeño tallo que porta ya sea uno o dos cotiledones. Los cotiledones se refieren a ellos como las hojas de las semillas, son las primeras hojas del esporofito joven. Como el nombre lo implica, los embriones de las monocotiledoneas comúnmente tienen solo un cotiledón y las dicotiledoneas dos. En sentidos opuestos del eje embrionario encontramos los meristemas apicales del tallo y de la raíz. El meristema apical se encuentra en la punta de todos los tallos y raíces. Los meristemas están compuestos de células meristemáticas -células capaces de sufrir muchas divisiones celulares. El tallo embrionario, es el primer brote, se llama plumula. El eje con dirección contraria a la del tallo, se denomina hipocotilo, la parte final o punta de esta estructura puede ser raíz embrionaria, o radícula. En muchas plantas, sin embargo, la parte final del eje consiste de un pequeño meristema apical cubierto por una capa. Si la radícula puede distinguirse en el embrión, el eje embrionario inferior de los cotiledones es llamado eje hipocotilo-raíz (Raven, 1992).

En las dicotiledoneas, que tienen sustancias de reserva en el endospermo y perispermo (si está presente) estas se absorben durante el desarrollo del embrión. Los cotiledones de muchas dicotiledoneas son carnosos y ocupan un gran volumen en la semilla. Ejemplos de semillas sin endospermo son el girasol, nogal y clícharo. En las dicotiledoneas con gran cantidad de endospermo, por ejemplo, el ricino, donde los cotiledones son delgados y membranosos, el endospermo proporciona las sustancias alimenticias (Raven, 1992).

En las monocotiledoneas, el simple cotiledón no solo funciona como órgano fotosintético, también tiene una función de absorción. Una vez imbibido el endospermo, el cotiledón moviliza las sustancias de reserva por diferentes actividades enzimáticas. Un ejemplo de monocotiledoneas altamente diferenciadas son los pastos. Cuando se forma completamente, el embrión de los pastos, posee un cotiledón masivo denominado escutelo, el cual está apesado en el endospermo. El escutelo, parecido al cotiledón en muchas monocotiledoneas, funciona en la absorción de sustancias de reserva del endospermo. El escutelo está unido de un lado al endospermo y por otro lado al eje embrionario, el cual tiene una radícula y una plumula. Tanto la radícula como la plumula están encerrados por una envoltura, es una estructura de protección llamada coleoriza y coleoptilo respectivamente. Todas las semillas además se encuentran encerradas por la cubierta de la semilla, que se desarrolla a partir del integumento(s) del óvulo y provee protección al embrión. Esta estructura puede ser impermeable al agua. El micropilo (la apertura en los integumentos) es a menudo visible en la cubierta de la semilla como un pequeño poro. Comúnmente, el micropilo se asocia con una cicatriz, llamada hilo (Raven, 1992).

A continuación se menciona la morfología que se presenta durante la germinación de una dicotiledonea, frijol (*Phaseolus vulgaris*) y una monocotiledonea, maíz (*Zea mays*). (figura 4)

*Phaseolus vulgaris*. En las primeras horas de imbibición de las semillas de frijol; la testa se arruga, el embrión comienza a crecer y la testa da señales de rompimiento. Entre las 48 y 72 h después de iniciada la imbibición, la radícula emerge y comienza a crecer hacia el interior del suelo, desarrollando raíces secundarias. Para el sexto día, el hipocotilo crece y presenta una forma de gancho que emerge del suelo al octavo día. El hipocotilo entonces porta los cotiledones hacia arriba de la superficie del suelo, este se elonga rápidamente y endereza. Los cotiledones presentan aún la cubierta de la semilla, la cual cae en este estado y los cotiledones son verdes. En este estado el epicotilo se hace obvio y porta las hojas primarias las cuales se desdoblán y se orientan a 90° de la incidencia de la luz. El brote apical está entre las bases de los pecíolos y es el guía en el desarrollo del tallo. Como los cotiledones son transportados hacia afuera del suelo, la germinación del frijol se describe como epigea (Bradbeer, 1992).

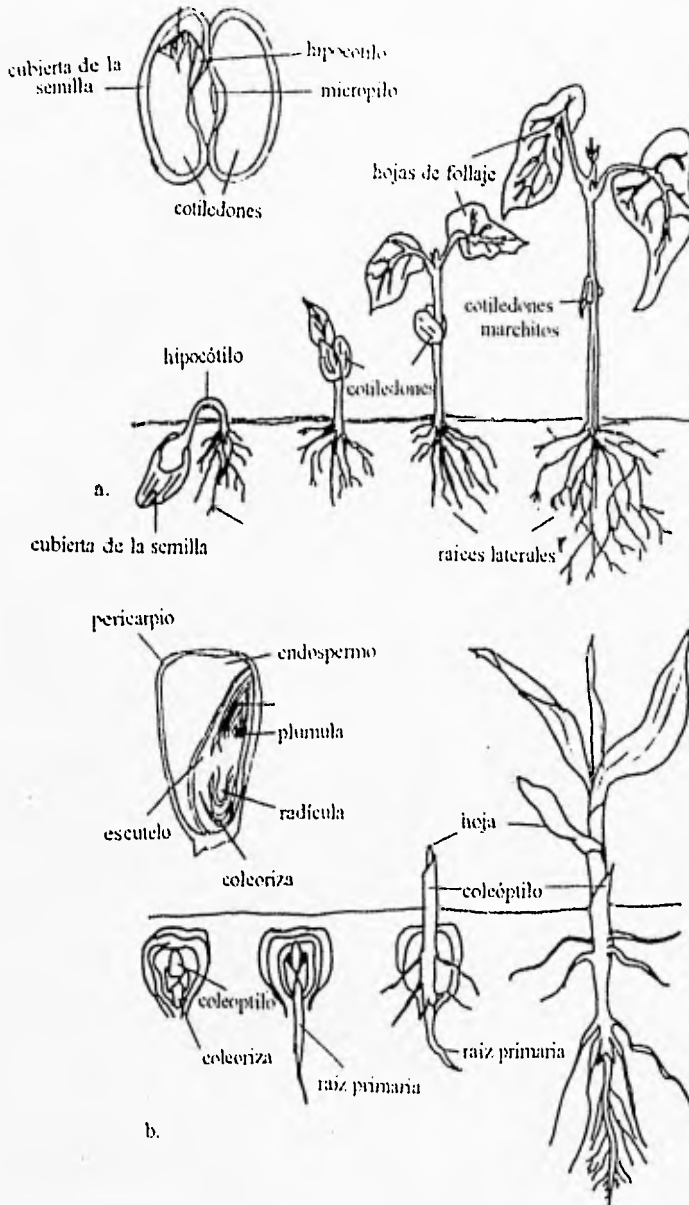


Figura 4. Esquema de la germinación y estructura de una semilla a. Dicotiledonea (*Phaseolus vulgaris*) y b. Monocotiledonea (*Zea mays*) (modificado de Raven, 1992. Biology of plants.)



*Zea mays*. La imbibición de las semillas de maíz resulta en la expansión tanto del embrión y endospermo. la testa es penetrada por la radícula (raíz embrionaria) al cuarto día. La raíz primaria acelera la emergencia, seguido por el coleóptilo y las raíces secundarias. El coleóptilo emerge del suelo y crece rápidamente; antes que cese este crecimiento empiezan a crecer las hojas primarias y secundarias de la plántula; las hojas están enrolladas y en respuesta a la iluminación se desenrollan debido a la acción de un fitocromo. Como los cotiledones permanecen por debajo del suelo, la germinación del maíz se describe como hipógea. (Bradbeer, 1992).

## 5. MATERIALES Y METODOS.

### 5.1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS.

Se realizaron experimentos *in-vitro* en cloroplastos aislados de hojas de plantas de chicharo (*Pisum sativum*) de 20 días. los cuales crecieron en tierra en un invernadero. 200 gramos de hojas se cortaron en pedacitos y se homogeneizaron en una licuadora (Osterizer Custom modelo L-21) (el vaso de la licuadora previamente congelado) por 5 segundos en 100 ml del siguiente medio de aislamiento: 400 mM sacarosa 5mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 30 mM Tricina a pH 8.00, para compensar la ruptura de vacuolas ácidas (Nicholls, 1987); el homogenado se filtró a través de 8 capas de gasa y se centrifugó por 4 minutos a 1900 g en centrifuga (Sorvall super T 21). y el precipitado se resuspendía en 1 ml del medio de aislamiento.

#### 5.1.1. DETERMINACION DE CLOROFILA.

Se cuantificó a la suspensión la concentración de clorofila con cloroplastos por el método de Arnon (1949). En un matraz aforado de 5 ml se colocó acetona al 80% y 30 µl de la suspensión de cloroplastos, se aforó y seagitó suavemente dejándolo 5 minutos en la obscuridad. Posteriormente se centrifuga en una centrifuga clinica durante 5 minutos a 950 g posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotometro (Beckman modelo DU-650) a las siguientes longitudes de onda: 645 nm y 663 nm, la lectura se efectuó por duplicado y se utilizó como blanco acetona al 80%. Los cálculos de cuantificación de clorofila se efectuaron aplicando la siguiente formula.

$$[Chl] = [8.05 (A_{663}) + 20.29(A_{645})] 5$$

Donde:

A = Lectura de Absorbancia de las muestras.

Chl= µg de Clorofila/ml.

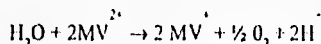
8.05 y 20.29 = Coeficientes de extinción.

5= Factor de dilución.

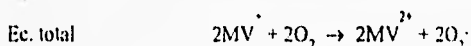
### 5.2. EVALUACION DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES (T. e<sup>-</sup>) EN LAS DIFERENTES ACTIVIDADES DE LA FOTOSINTESIS\*.

Para evaluar las diferentes actividades de transporte de electrones se utilizó un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro. en el electrodo de Platino (Pt) el O<sub>2</sub> es reducido a H<sub>2</sub>O. Si el electrodo de Pt se mantiene a 0.7 V negativo respecto al de referencia Ag/AgCl. circulará una corriente proporcional a la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> por el electrodo. En condiciones apropiadas la corriente es proporcional a la concentración de O<sub>2</sub> en la disolución. Una fina membrana permeable al O<sub>2</sub> protege al electrodo contra el envenenamiento. Debido al consumo de O<sub>2</sub> se precisa una continua agitación del medio para impedir el agotamiento del oxígeno en la vecindad de la membrana del electrodo. La célula o cámara está totalmente cerrada (Nicholls, 1992). La captación de oxígeno, es un parámetro para medir

el transporte de electrones. total en la cadena redox. se utiliza una reacción de autooxidación de un aceptor terminal de electrones. como el de la reacción de Mehler, que consiste en utilizar el metilviologeno (MV<sup>2+</sup>); la reducción del metilviologeno por la cadena redox consiste:



en el cual ocurre desprendimiento de oxígeno con una estequiometría  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  por MVH<sub>2</sub> de la reacción de Hill ( $\text{O}_2/2e^- = \frac{1}{2}$ ), y en la reacción de autooxidación del MVH<sub>2</sub> reacciona con una mol de O<sub>2</sub> por MVH<sub>2</sub>, por lo que se observa un consumo neto de oxígeno en la determinación representada en la siguiente reacción, conocida como reacción de Mehler (Hipkins, 1986):



Se emplearon 3 ml de un medio de transporte de electrones (T e<sup>-</sup>), con las modificaciones que se indican en las diferentes actividades fotosintéticas, que contiene 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15 mM tricina (solución amortiguadora) a pH 8.0 se agregó 60 µg de clorofila; se mantiene bajo agitación (agitador COLE-PALMER, Modelo 4803-00) e iluminación por un minuto con un haz luminoso, producido por un proyector (Reflecta AF 1800. Lamp 240/150 W), que pasa a través de una lente de Izawa y que consiste de una botella con solución al 5% de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, sirviendo como filtro de luz visible. El Transporte de electrones se midió indirectamente al monitorear el cambio de concentración de oxígeno durante la fotosíntesis con un oxímetro 5300, acoplado a un registrador Beckman.

Las boroxaziladonas que se caracterizaron se disolvieron en DMSO y se ensayaron a concentraciones crecientes hasta encontrar las concentraciones óptimas de acción, tal como se muestra en resultados.

#### LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS EVALUADAS FUERON:

Flujo de electrones basal. Trebst, 1972.

3 ml de medio de T e<sup>-</sup> + 50 µM de MV.

Flujo de electrones fosforilante. Trebst, 1972.

3 ml de medio de T e<sup>-</sup> con 300 mM Pi y 100 mM ADP + 50 µM de MV.

Flujo de electrones desacoplado. Mc Carty, 1977.

3 ml de medio de T e<sup>-</sup> y 5 mM NH<sub>4</sub>Cl + 50 µM de MV.

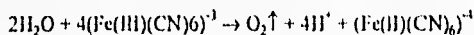
Calculo de la velocidad de T e<sup>-</sup>.

$$0.4 \mu \text{ eq de } \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / X_t \cdot X_p / 1 \text{ min.} \cdot 60 \text{ min./hr} \cdot 1/0.060 \text{ mg de clorofila.}$$

$$= \mu \text{ eq de } e^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Cl}^{-1}$$

Donde:

0.4  $\mu$  eq de  $K_3Fe(CN)_6 = 0.4$  microequivalentes de  $K_3Fe(CN)_6$  que al "consumirse" han transportado 0.4  $\mu$  eq de  $e^-$



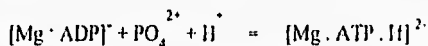
$X_p$  = pendiente obtenida de los trazos problemas, los cuales se determinan trazando una recta paralela al trazo experimental del papel graficador y se calcula la pendiente, ( $X_p = X$  unidades de longitud del papel en las ordenadas)

$X_1$  = es el desplazamiento realizado en las ordenadas durante la calibración al "consumirse" 0.4  $\mu$  eq de  $K_3Fe(CN)_6$  que corresponde 0.4  $\mu$  eq de electrones transportados.

Se multiplica por 60 min. ya que deseamos obtener la velocidad por hora (h), y se divide entre 0.060 mg de clorofila debido a que lo deseamos para 1 mg de ésta.

### 5.3. EVALUACION DE LA SINTESIS DE ATP Y CAPTACION DE PROTONES\*.

Síntesis de ATP (Fotofosforilación) y captación de protones en estas actividades se utilizó un medio con 100 mM sorbitol, 100 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM Tricina y 50  $\mu$ M MV (pH= 8) y se midieron en un potenciómetro (Corning modelo 12 acoplado a un registrador Kipp & Zonen BD-40 04/05). A un pH 8 y exceso de  $Mg^{2+}$  la síntesis de ATP (en presencia de 100 mM ADP y 300 mM Pi), 60  $\mu$ g de clorofila con agitación y un minuto de iluminación; resultan en un consumo escalar o producción de 1 ion  $H^+$  por ATP como se observa en la siguiente reacción:



Este es un método que provee un tiempo real de medición de síntesis o hidrólisis de ATP. La técnica es por lo tanto comunmente utilizado para determinar la velocidad y realizar estudios cinéticos particularmente para la hidrólisis de ATP (Hipkins, 1986).

Calculo de la velocidad de captación de protones:

$$0.07 \mu \text{ eq de KOH}/X_1 \cdot X_p / 1 \text{ min} \cdot 60 \text{ min} / 1 \text{ hr} \cdot 1 / 0.060 \text{ mg de clorofila} \\ = \mu \text{ eq } H^+ \text{ ó ATP} \cdot h^{-1} \cdot \text{mg } Cl^{-1}$$

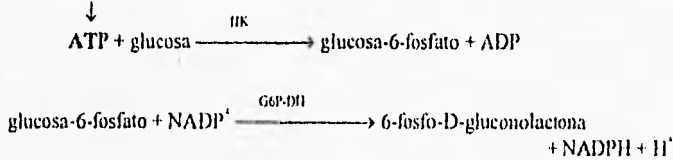
Con la gráfica obtenida a partir del experimento anterior se midió los microequivalentes de protones aprovechados en unidades de longitud  $X_p$ , desde el momento en que se alcanza la meseta en la gráfica, en un minuto. Estas unidades de longitud son transformadas en microequivalentes de protones transportados al adicionar 10 ml de KOH 0.07 N en el medio ya que corresponden al número de  $\mu$ eq de  $H^+$  consumidos en la reacción (Xt).

#### 5.4. SINTESIS DE ATP INDIRECTA\*

Es una determinación de tipo enzimática de la concentración de ATP. Se utilizó para verificar el efecto de algunas boroxalidonas. Se emplearon 2.5 ml de un medio de transporte de electrones ( $T e^-$ ) que contiene 100 mM sorbitol, 5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 15 mM treicina (solución amortiguadora) a pH 8.0 y se agregó 1M glucosa, 1 mM ADP, 3 mM Pi, 4 Unidades Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), 7 mM  $NADP^+$ , 13 mg/ml Hexoquinasa (HK) y se agregó 20  $\mu g/ml$  de clorofila, se evaluó el efecto del  $FD_1$ ,  $FD_3$ ,  $FD_{11}$  a las siguientes concentraciones 0, 0.9, 1.2, 1.5 y 2 mM. Se tomaron lecturas antes y después de iluminar durante 1.5 minutos en un espectrofotometro Beckman a 340 nm.

El principio de este método se basa en lo siguiente:

En la membrana del tilacoide hay síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y Pi.



El ATP generado en la fotosíntesis sirvió para fosforilar la glucosa reacción catalizada por la Hexoquinasa (HK), que forma glucosa-6-fosfato esta a su vez se convirtió a 6-fosfo-D-gluconolactona por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) que emplea como coenzima al  $NADP^+$ , el cual se reduce por los  $H^+$  liberados. Esta es parte de la Ruta de las pentosas fosfato (Montgomery, 1993). Se tiene la relación de que por cada mol de ATP formado, se produce 1 mol de NADPH y este producto se determinó midiéndolo a una absorbancia de 340 nm (Trautschold, 1985). Se expresa en nanomol de  $ATP \cdot lit^{-1} \cdot mg \text{ de } Chl^{-1}$ .

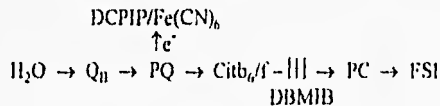
#### 5.5 REACCIONES PARCIALES DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II\*

##### 5.5.1. REACCIONES PARCIALES DEL FOTOSISTEMA II:

###### 5.5.1.1. DE $H_2O$ A DCPIP:

También se determinó por oximetría en 3 ml de medio de reacción similar al usado para el transporte de electrones desacoplado, se adicionó como aceptor de electrones artificial DCPIP 50  $\mu M$ , Ferriocianuro de potasio 300  $\mu M$  permite mantener al DCPIP oxidado durante la reacción, DBMIB 1  $\mu M$  como inhibidor del transporte de electrones hacia el Fotosistema I, agua como donador natural de electrones y se omitió el metilviológeno (MV) (Hall, 1976; Izawa, 1977).

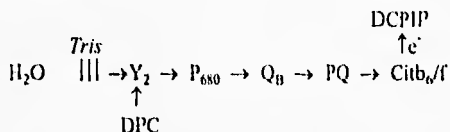
El siguiente esquema ilustra el papel del DCPIP y del DBMIB en el transporte de electrones.



5.5.1.2. REACCION PARCIAL DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DEL DONADOR DPC AL ACEPTOR DCPIP:

Se obtuvieron cloroplastos, los cuales se inhibieron con Tris 0.8 M, pH 8 (este compuesto inhibe la fotólisis del agua) (Yamashita, 1968) se incubaron 30 min. a 0° con agitación en completa oscuridad, se lavaron con 40 ml de medio de aislamiento de cloroplastos ; se centrifugó a 2375 g se resuspendió y cuantificó la cantidad de clorofila; se ensayó la actividad en el medio, agregando 200 µM DPC como donador de electrones y 100 µM de DCPIP como aceptor de electrones y se leyó la absorbancia a 660 nm (antes y después de iluminar por 1.5 minutos).

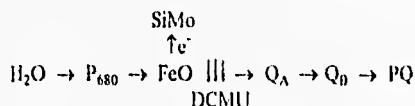
La reacción parcial del transporte de electrones se presenta a continuación:



5.5.1.3. REACCION PARCIAL DE FLUJO DE ELECTRONES DE H<sub>2</sub>O HACIA EL SILICOMOLIBDATO (SiMo):

El flujo se determinó en el medio de fotosistema II con la adición de 200 µM de Silicomolibdato como aceptor de electrones y 10 µM de DCMU como inhibidor y H<sub>2</sub>O como donador de electrones (Hauska, 1977).

El flujo estudiado es como sigue:

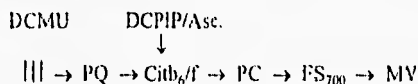


5.5.2. REACCIONES PARCIALES DEL FOTOSISTEMA I.

5.5.2.1. REACCION PARCIAL DESDE DCPIP REDUCIDO AL METILVIOLOGENO (MV):

La reacción se cuantificó con el oxímetro. El medio de reacción ( 3 ml) fue similar al que se usó en el transporte de electrones desacoplados, además de que se le añadieron los siguientes reactivos: 100 µM DCPIP reducido con 300 µM de ácido ascórbico que actuó como donador de electrones para el FSI; como aceptor de electrones MV 50µM y DCMU 10 µM como inhibidor del transporte de electrones del FSII (Hall, 1976; Izawa, 1977; Hipkins, 1986).

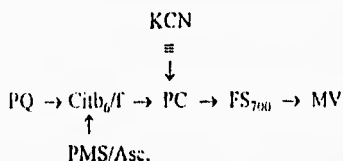
La reacción parcial estudiada del PSI es:



### 5.5.2.2. REACCIÓN PARCIAL DE ELECTRONES DESDE N-METILFENAZINA METOSULFATO (PMS) REDUCIDO A METILVIOLOGENO (MV):

En este caso antes de medir el transporte de electrones, se incubaron los cloroplastos con un medio que contiene 30 mM KCN, 100mM sorbitol, 5 mM MgCl, 10 mM KCl, 15 mM Tricina, pH 8; a 0° por 30 minutos, en la obscuridad, como se sabe el cianuro inhibe a nivel de la PC. Después se centrifugaron a 4750 g por 1.5 min. en una centrifuga BEKCMAN J-21 con rotor de ángulo fijo JA-20, se desechó el sobrenadante y la pastilla que contenía los cloroplastos envenenados se resuspendieron en el medio de aislamiento, se cuantificó la cantidad de clorofila como se ha descrito anteriormente. Se procedió a medir el transporte de electrones con el oxímetro. Al medio de reacción ( 3ml) utilizado en el transporte desacoplado se agregó 200 µM de PMS el cual actuó como donador de electrones hacia el Citb<sub>6</sub>/f, pero en cloroplastos con PC desactivada es capaz de donar electrones directamente a el P700 del FSI, se agregó además 300 µM de ácido ascórbico para reducir el PMS; y 50 µM de MV como aceptor de electrones (Izawa, 1977; Hipkins, 1986).

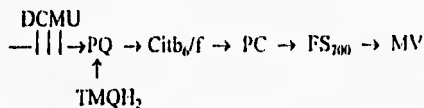
Reacción parcial estudiada:



### 5.5.2.3. REACCION PARCIAL DE TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPLADO DESDE TETRAMETIL-p-BENZOQUINONA (TMQH<sub>2</sub>) A METILVIOLOGENO (MV):

Se determinó en 3 ml de medio con: 100mM sorbitol, 5 mM MgCl, 10 mM KCl, 15 mM Tricina, con la adición de 10 µM DCMU como inhibidor, 250 µM TMQH<sub>2</sub> como danador de electrones a nivel de PQ; la TMQH<sub>2</sub> es oxidada por el FSI. Se agregó 50 µM MV como aceptor de electrones. Las mediciones fueron realizadas en un oxímetro como se describió anteriormente (Hull, 1976; Izawa, 1977 y 1978)

La reacción parcial del FSI comprende lo que se muestra a continuación:



## 5.6. ACTIVIDAD DE ATPasa\*. (Mill, Mitchel, 1980)

### 5.6.1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS INTACTOS.

Se seleccionaron hojas de chícharo y se homogeneizaron con un medio de aislamiento ( 0.35 M Sorbitol, 5 mM ácido ascórbico, 20 mM MES, pH 6.5) en la licuadora (Osterizer mod. L-21) durante 5

seg a velocidad máxima, el homogenado se filtró por 20 capas de gasa, el filtrado se centrifugó a 1425 g en centrifuga (Sorvall super T 21) por 4 minutos a 4°C. El botón se lavó con 40 ml de medio de aislamiento y se volvió a centrifugar a 4750 g por 1 minuto, se resuspendió el botón en 1 ml de medio de resuspensión (0.35 M sacarosa, 2 mM EDTA, 2mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 1 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 15 mM Tricina, pH=7.6). La suspensión de los cloroplastos se guardó en la obscuridad en el refrigerador por lo menos una hora antes de usarse (Arnon, 1949).

#### 5.6.2. ACTIVACION DE LOS FACTORES $Cf_0$ - $Cf_1$ DE LA ATPasa DEPENDIENTE DE $Mg^{2+}$ .

EL complejo  $Cf_0$ - $Cf_1$  unido a la membrana tilacoidal se activó como consecuencia de la iluminación de los cloroplastos. La activación se llevó a cabo en 0.25 ml de medio de activación 1(i) (1.2 mM Sorbitol, 100 mM Tricina, pH = 8) y 0.65 ml de medio 2(ii) (5 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 15 mM Tricina pH= 8) (para lavar los cloroplastos) y 0.1 ml de suspensión de cloroplastos con una concentración 0.3 mg de clorofila por 1 ml de agua. La actividad de la ATPasa dependiente de  $Mg^{2+}$  y activada por la luz se cuantificó como se indica a continuación:

#### 5.6.3. HIDROLISIS DE ATP.

Se utilizó 0.9 ml de medio de hidrolisis de ATP (50 mM KCl, 2mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 15 mM Tricina, 2.2 mM ATP, pH= 8) al cual se le agregó 0.1 ml de la suspensión de cloroplastos activados. El proceso se realizó en la obscuridad absoluta y con agitación suave a 22°C por 1 minuto. Al terminar el tiempo de incubación la reacción se para con 0.5 ml de ácido Tricloroacético (TCA) al 20% en agua (Mills, 1980).

#### 5.6.4. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE FOSFATOS.

La mezcla conteniendo la hidrolisis del ATP se centrifugó a 1425 g por 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga clínica con el fin de descartar los residuos proteicos los cuales se precipitan con el TCA. El fosfato liberado se cuantificó por el método colorimétrico de Fieske-Subbaroo (Summer, 1974). Se toma una alícuota del sobrenadante (con un contenido de 1 mmol de Pi) se afora a 1.6 ml. Se adicionó 0.25 ml de una solución 6% en agua p/v de  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 7H_2O$ , 0.25 ml de  $H_2SO_4$ , 7.5 N. Se agitó suavemente y se adicionó el compuesto colorido de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , al 10 % disuelto en agua acidulada p/v; se agitó en vortex y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Por último se leyó a 660 nm en un espectrofotometro Beckman D. U.

Al mismo tiempo se hizo una curva patrón de  $KH_2PO_4$  de 0.5 a 1  $\mu$ mol de concentración y se gráfica, en la curva que se obtuvo, se extrapola la absorbancia a 660 nm de cada muestra problema para obtener la concentración de Pi liberado de la hidrolisis de ATP obtenida.

#### 5.7. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN LA GERMINACION DE SEMILLAS\*.

Para evaluar el efecto preemergente que pudiera tener las boroxoalidonas en la germinación y respiración en las semillas de plantas de importancia económica, tales como una dicotiledónea: tomate



(*Physalis ixocarpa*) y dos monocotiledoneas: trigo (*Triticum vulgare*) y zacate Johnson (*Sorghum halepense*) esta última es una maleza, se procedió a lo siguiente:

Se esterilizaron cajas de petri con papel filtro whatman del # 2 y agua destilada en el autoclave a presión de 18 kg/m<sup>2</sup> por 15 minutos (García, 1991); todo esto se realiza en una campana de flujo laminar para evitar contaminación; se desinfectaron las semillas con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos y terminado esto se enjuagaron en agua destilada estéril (Horak, 1994). Una vez realizado lo anterior se procedió a colocar el número de semillas que a continuación se indican en el tabla 2, en las cajas de petri inmediatamente se agregó 7 ml de los compuestos a las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 0.8 y 1.2 mM, se sellaron las cajas con papel parafilm para proporcionar una aeración adecuada y evitar así la evaporación del agua, se colocaron en una incubadora a 28°C a completa oscuridad durante 4 días.

Pasado el tiempo se procedió a contar el número de semillas que germinaron y calcularlo en %, y se calculó I<sub>50</sub>, para evaluar el efecto de los compuestos en la germinación, esto nos sirve para evaluar a nuestro compuesto con características de herbicida pre-emergente.

TABLA 2. Número de semillas utilizadas en germinación.

SEMILLA	#
<i>Triticum vulgare</i>	25
<i>Physalis ixocarpa</i>	100
<i>Sorghum halepense</i>	100

#### 5.8. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN LA RESPIRACION DE SEMILLAS\*.

Se procede de la misma manera como se muestra en el punto anterior, pero en este caso el número de semillas varia como se indica en la tabla 3. y se tomaron lecturas de las semillas cada 24 horas durante 72 hrs.

TABLA 3. Número de semillas utilizadas en respiración.

SEMILLA	#
<i>Triticum vulgare</i>	20
<i>Physalis ixocarpa</i>	300
<i>Sorghum halepense</i>	50

La primera lectura de respiración se efectuó después de 24 hrs de imbibición, colocando las semillas en una cubeta de medición de un oxímetro el cual registra el consumo de oxígeno durante 2 minutos. (Modificado de Upadhyaya, 1986)

Se toman lecturas cada 24 hrs durante 72 hrs.

Calculo de la respiración:

$$1200 \text{ nanoátomos de O}_2/20\text{cm} \cdot X_p/\text{min} \cdot 60 \text{ min/hr} \cdot 1/\# \text{ semillas.} \\ = \text{nat O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{semilla}^{-1}$$

Donde:

1200 nanoátomos de O<sub>2</sub>/20 cm corresponden al número total de nanoátomos de O<sub>2</sub> en 20cm de nuestra papel graficador.

X<sub>p</sub> = Es la distancia que se obtiene del trazo problema y corresponde al número de nanoátomos de O<sub>2</sub> consumidos por las semillas en 1 minuto.

Se procedió a calcular la respiración con la formula anterior y se grafica en % de actividad de los compuestos de inhibir la respiración y se calculó los valores de inhibición que presenta en diferentes concentraciones (I).

\* todos los experimentos aqui descritos se realizaron por triplicado, los valores que aparecen son el promedio de las repeticiones y su desviación estándar.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 6.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN LA FOTOSINTESIS.

El 50% de los herbicidas comerciales inhiben la fotosíntesis en el lado reductor del fotosistema II a nivel de la enzima redox  $Q_B$  (Albores-Velasco, 1986). En cambio algunas boroxozalidonas se sabe que actúan como herbicidas (Farfán, 1993), pero se desconoce si estos inhiben a la fotosíntesis. El objetivo del presente trabajo es elucidar el mecanismo por el cual las boroxozalidonas actúan como herbicidas inhibiendo la fotosíntesis.

En general los compuestos orgánicos sintetizados mediante procesos químicos y utilizados como herbicidas, se sabe que actúan a nivel de fotosíntesis a través de inhibir la enzima redox  $Q_B$  (inhibidores de la reacción de Hill) o inhibiendo la  $H^+$ -ATPasa a nivel de  $CF_0$  o  $CF_1$  (inhibidores de la transducción de energía), o a través de actuar como desacoplantes disipando el gradiente electroquímico de protones y como aceptores de electrones en el lado reductor del fotosistema I. A continuación se describe el efecto que tuvieron las boroxozalidonas en las diferentes actividades de la fotosíntesis:

Los compuestos difenil(isoleucinato-O,N)borano  $FD_3$ ; difenil(leucinato-O,N)borano  $FD_3$ ; difenil(metionato-O,N)borano  $FD_6$ ; difenil(fenilglicinato-O,N) borano  $FD_9$ ; difenil(tirosinato-O,N)borano,  $FD_{10}$ ; difenil(prolinato-O,N)borano,  $FD_{12}$  no presentan actividad inhibitoria en una de las principales actividades de la fotosíntesis (fotosfosforilación). Ver apéndice.

difenil(glutamato-O,N)borano

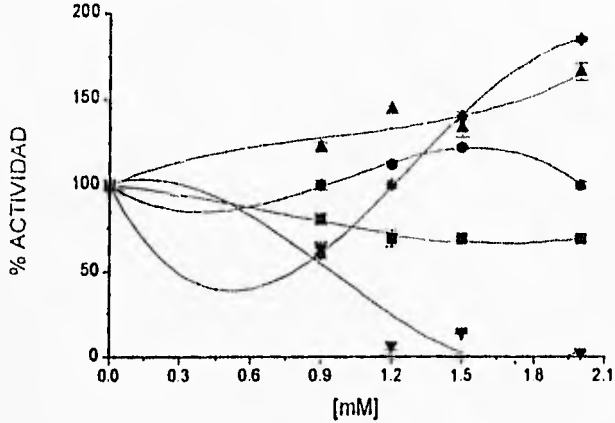


Figura 5. Efecto del difenil(glutamato-O,N)borano,  $FD_1$  en las diferentes actividades de la fotosíntesis dependientes de luz:  $T_e^-$  (■) basal, (●) fosforilado (▲) desacoplado, los valores en velocidad correspondientes al control son: 143, 229 y 720 ( $\mu\text{equiv } e^- \cdot \text{mg. chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) respectivamente; (▼) fotofosforilación, control: 1367 (nanomoles de ATP  $\cdot \text{mg. chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) y (◆) captación de protones, control: 100 ( $\mu\text{M H}^+ \cdot \text{mg. chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

En la figura 5. se observó que el difenil(glutamato-O,N)borano,  $FD_1$  inhibe el  $T_e^-$  basal conforme incrementa su concentración llegando a un 31% a 2 mM, mientras que a la misma concentración el  $T_e^-$  fosforilado no es afectado aún hasta 2 mM y el  $T_e^-$  desacoplado es acelerado hasta un 166%, la fotofosforilación se inhibió un 98% a 2 mM y por último la captación de protones se aceleró hasta 185% a 2 mM. Por los datos descritos podemos deducir que este compuesto actúa como un inhibidor de la transducción de energía ya que solo afectó la fotofosforilación y no los demás transportes. Los inhibidores de la transferencia de energía afectan algún paso final de la síntesis de ATP, a nivel de la  $H^+$ -ATPasa que es la enzima responsable de la síntesis de esta molécula.

difenil(lisinato-O,N)borano

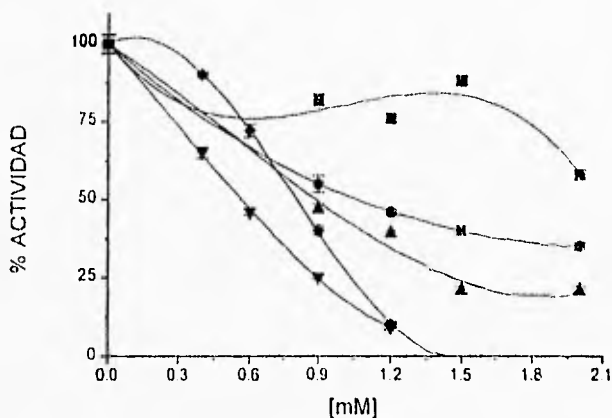


Figura 6. Efecto del difenil(lisinato-O,N)borano,  $FD_2$  en las diferentes actividades de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinaca e iluminados:  $T^+ e^-$  (■) basal, (●) fosforilado (▲) desacoplado, los valores en velocidad son: 486, 669 y 1267 ( $\mu eq e^- \cdot mg \cdot chl^{-1} \cdot h^{-1}$ ) respectivamente; (▼) fotofosforilación, control: 197 ( $\mu M ATP \cdot mg \cdot chl^{-1} \cdot h^{-1}$ ) y (◆) captación de protones, control: 100 ( $\mu M H^+ \cdot mg \cdot chl^{-1} \cdot h^{-1}$ ).

A continuación se presentan los resultados del efecto de difenil(lisinato-O,N)borano,  $FD_2$  en las diferentes actividades de la fotosíntesis. Los datos obtenidos se muestran en la figura 6 en donde se observa que el difenil(lisinato-O,N)borano,  $FD_2$  inhibió el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado dependiente de concentración siendo mayor la inhibición cuando aumenta la concentración del difenil(lisinato-O,N)borano,  $FD_2$  obteniéndose 42%, 51% y 79% de inhibición respectivamente a 2 mM. De acuerdo con la hipótesis quimiosmótica de transducción de energía al inhibirse el flujo de electrones no hay generación de energía libre por lo que no habrá captación de protones y tampoco síntesis de ATP. En la misma figura .6. se observa que a medida que aumenta la concentración del difenil(lisinato-O,N)borano,  $FD_2$  la síntesis de ATP y la captación de  $H^+$  se inhiben 100% a 1.2 y 2 mM respectivamente; estos datos indican que el difenil(lisinato-O,N)borano,  $FD_2$  actuó como inhibidor de la reacción de Hill de  $H_2O \rightarrow MV$ . Por lo que se requiere localizar el sitio de inhibición para saber que enzima es la que afecta.

difenil(glicinato-O,N)borano

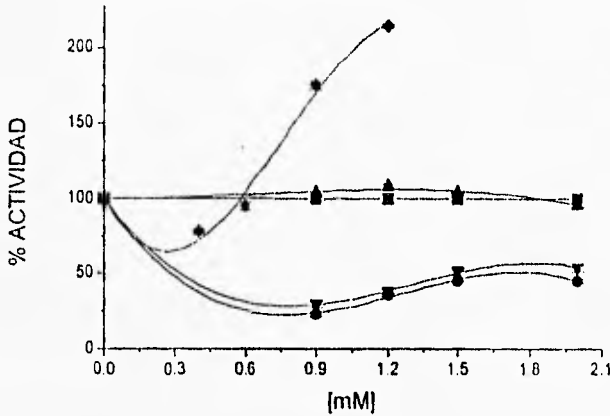


Figura 7. Efecto del difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub> en las diferentes actividades de la fotosíntesis: T e<sup>-</sup> (■) basal, (●) fosforilado (▲) desacoplado, los valores correspondientes a el control en velocidad son: 520, 960 y 1920 μeq e<sup>-</sup> .mg.chl<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> respectivamente; (▼) fotofosforilación, control: 986 nanomoles de ATP . mg.chl<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> y (◆) captación de protones, control: 100 H<sup>+</sup> . mg.chl<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Los resultados encontrados del difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub> muestran que no tiene efecto en el transporte de electrones basal (figura 7.) sugiriendo así de manera inmediata que no tiene efecto sobre alguna enzima de la cadena redox y que su efecto está relacionado con la fotofosforilación. El transporte de electrones desacoplado se activó levemente y a la concentración de 2 mM presentó una inhibición solo del 2%; en cambio el transporte de electrones fosforilado se inhibió un 77% a una concentración de 0.9 mM siendo este el efecto máximo inhibitorio del compuesto, por otro lado encontramos que a 2 mM el T e<sup>-</sup> fosforilado y la fotofosforilación se inhibieron en menor grado siendo un 55% y 46% respectivamente, esta última observación sugiere que el compuesto primero actúa como inhibidor de la transducción de energía y después además de este efecto actúa desacoplado la fotofosforilación a altas concentraciones, mientras que la captación de protones se ve aumentada hasta un 215% a la concentración 1.2 mM. lo anterior nos indica que este compuesto modifica la permeabilidad de la membrana a protones haciendola impermeable a ella aunque la síntesis de ATP es inhibida. Los resultados indican que este compuesto actúa como inhibidor de la transducción de energía-desacoplante débil. Para terminar de caracterizar sus propiedades del difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub> se estudió su efecto en la H<sup>+</sup>-ATPasa.

difenil(treoninato-O,N)borano

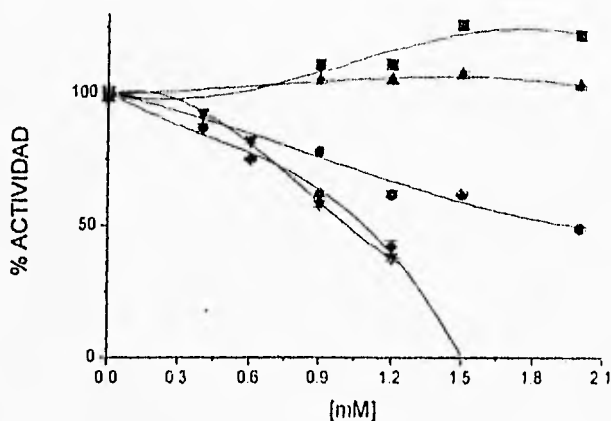


Figura 8. Efecto del difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub> en las diferentes actividades de la fotosíntesis: T e<sup>-</sup> (■) basal. (●) fosforilado (▲) desacoplado, los valores correspondientes a el control en velocidad son: 514, 914 y 1657.5  $\mu\text{eq e}^- \cdot \text{mg.chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  respectivamente; (▼) fotofosforilación, control: 205  $\mu\text{M ATP} \cdot \text{mg.chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y (◆) captación de protones, control: 160 ( $\mu\text{M H}^+ \cdot \text{mg.chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

La caracterización del difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub> sobre la fotosíntesis se observó una activación del transporte de electrones basal de 122% (figura 8.) sugiriendo que actúa como desacoplante a medida que aumenta la concentración del compuesto, sin afectar el transporte de electrones desacoplado, mientras que el T e<sup>-</sup> fosforilado y la fotofosforilación fueron inhibidos 51% y 62% respectivamente a la misma concentración de 2 mM, y además de que la captación de protones es inhibida 100% a 1.5 mM. Los resultados indican que este compuesto actúa como desacoplante y que posiblemente interacciones con alguna de las subunidades de H<sup>+</sup>-ATPasa, ya que inhibe en mayor grado la fotofosforilación y la captación de protones, por lo tanto se efectuaron estudios a nivel del complejo CF<sub>0</sub> y CF<sub>1</sub>.

difenil(aspartato-O,N)borano

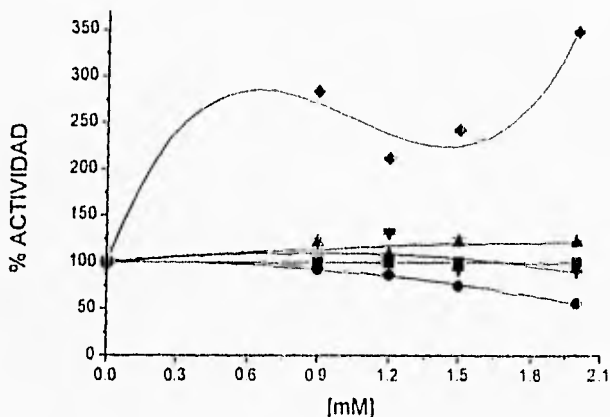


Figura 9. Efecto del difenil(aspartato-O,N)borano,  $FD_8$  en las diferentes actividades de la fotosíntesis:  $T_e$  (■) basal, (●) fosforilado (▲) desacoplado, los valores correspondientes a el control en velocidad son: 129, 400 y 920  $\mu\text{eq e}^-\cdot\text{mg}\cdot\text{chl}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  respectivamente; (▼) fotofosforilación, control: 581  $\mu\text{M ATP}\cdot\text{mg}\cdot\text{chl}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  y (◆) captación de protones, control: 96  $\mu\text{M H}^+\cdot\text{mg}\cdot\text{chl}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

El estudio del efecto del difenil(aspartato-O,N)borano,  $FD_8$  sobre la fotosíntesis indicó que no tiene efecto en el  $T_e$  basal (figura 9.), por otro lado el  $T_e$  fosforilado y la síntesis de ATP son inhibidos 44% y 9% respectivamente a 2 mM; mientras que la captación de protones y el transporte de electrones desacoplado son activados 248% y 22% respectivamente a la misma concentración. Los resultados indican que este compuesto se comportó como un inhibidor débil de la transferencia de energía. Además presenta una débil inhibición de la  $H^+$ -ATPasa por lo que no es recomendable efectuar estudios posteriores para caracterizarlo.



difenil(serinato-O,N)borano

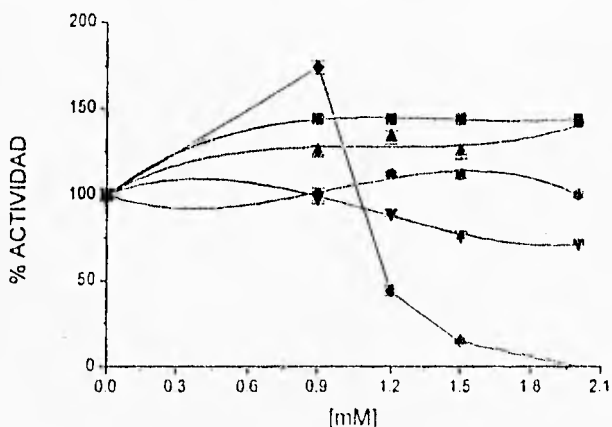


Figura 10. Efecto del difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> en las diferentes actividades de la fotosíntesis: T e<sup>-</sup> (■) basal, (●) fosforilado (▲) desacoplado, los valores correspondientes a el control en velocidad son: 129, 229 y 960  $\mu\text{eq.e}^- \cdot \text{mg.chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  respectivamente; (▼) fotofosforilación, control: 5080 nanomoles.ATP  $\text{mg.chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y (◆) captación de protones, control: 96  $\text{H}^+ \cdot \text{mg.chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Mientras en los resultados obtenidos del estudio del difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> sobre la fotosíntesis. En la figura 10. en la que el T e<sup>-</sup> basal y desacoplante fueron activados un 144% y 141% a 2 mM respectivamente. En cambio el transporte de electrones fosforilado no presentó efecto a 2 mM del difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub>, en cambio a la concentración de 1.2 y 1.5 mM activó el T e<sup>-</sup> desacoplado hasta un 112% para ambas concentraciones; por otro lado este compuesto inhibió la fotofosforilación un 29% a 2 mM y la captación de protones fue inhibida 100% a 1.5 mM. De los datos podemos deducir que este compuesto se comporta como un desacoplante débil de la fotofosforilación, y no se caracterizó en la actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa.

## 6.2. LOCALIZACION DEL SITIO DE ACCION DEL DIFENIL(LISINATO-O,N)BORANO EN LA REACCION DE HILL.

En la localización de la enzima que es inhibida por el difenil(lisinato-O,N)borano, FD<sub>2</sub> de la cadena transportadora de electrones del cloroplasto, se encontró que el transporte de electrones de H<sub>2</sub>O→DCPIP (fotosistema II) es inhibida 74% a 1.2 mM indicándonos así que este compuesto tiene efecto en el FSII y no presenta inhibición en el FSI, tan marcada como en el primero, como se puede ver en la tabla 4. Para conocer el sitio específico de inhibición del difenil(lisinato-O,N)borano, FD<sub>2</sub> en el FSII se determinó el efecto de este compuesto en las siguientes reacciones parciales H<sub>2</sub>O→SiMO y DPC→DCPIP, encontrándose que no presentó efecto alguno en este último segmento de la cadena transportadora de electrones. Mientras que para la reacción de H<sub>2</sub>O→SiMO se presentó una inhibición del 76% a 1.2 mM indicando la inhibición del complejo enzimático que fotoliza al agua (EOC).

FS	Conc. mM	H <sub>2</sub> O→DCPIP [%]	H <sub>2</sub> O→SiMO [%]	DPC→DCPIP [%]
	II	0	0	0
	0.4	18	25	0
	0.9	34	35	0
	1.2	74	76	0
FS	Conc. mM	DCPIP <sub>red</sub> →MV μeq e <sup>-</sup> x h <sup>-1</sup> x mg chl <sup>-1</sup>	PMS <sub>red</sub> →MV μeq e <sup>-</sup> x h <sup>-1</sup> x mg chl <sup>-1</sup>	TMQH <sub>2</sub> →MV μeq e <sup>-</sup> x h <sup>-1</sup> x mg chl <sup>-1</sup>
	I	0	1933	2233
	0.4	1933	1873	2214
	0.9	2040	1562	2133
	1.2	2400	1533	2000

Tabla 4. Las actividades del (FSII) Fotosistema II se dan en porcentaje y para los del (FSI) Fotosistema I en velocidad; el control es cero % inhibición. Los valores del flujo de electrones fueron: para FS II de agua a DCPIP, de agua a SiMO y DCP a DCPIP 622, 133 y 120 respectivamente en μeq e<sup>-</sup> · h<sup>-1</sup> · mg Chl<sup>-1</sup>.

Se ha reportado que una estructura, por ej. -C-NH, sp<sub>2</sub> que presentan un grupo deficiente de electrones (electrón no apareado) unido a un portador lipofílico, parece ser lo requerido para una actividad inhibitoria en el fotosistema II (Van Assche, 1982).

Se sabe que la unión de inhibidores fotosintéticos al cloroplasto es a través de fuerzas no covalentes débiles, sugiriendo que los puentes de hidrógeno pueden estar involucrados (Van Assche, 1982). En este trabajo el difenil(lisinato-O,N)borano es el único que presenta un grupo NH<sub>2</sub> y este grupo puede ser importante para la actividad.

Las aminas son útiles desacoplantes de cloroplastos pero a pH altos (cerca de 8.0) estas tienden a inhibir el transporte de electrones por la inactivación irreversible de la enzima que oxida el agua (Izawa, 1969).

El amonio, que es isoelectrónico con el agua, inhibe la evolución del O<sub>2</sub> y altera el estado S<sub>2</sub>. Subsecuentes estudios también han demostrado que el amonio se une directamente al magnesio en el estado S<sub>2</sub>. Se ha reportado que el amonio induce modificaciones del estado S<sub>2</sub> al igual que el Sr<sup>2+</sup>.

(Hansson, 1990). Los diferentes efectos de los inhibidores del FSI a nivel de la enzima que fotoliza el agua pueden deberse a una desactivación de los estados S, conversión del potencial alto del citocromo b-559 en una forma de potencial bajo o bien inducen cambios estructurales que modifican la transferencia normal de electrones (Mathis, 1984).

### 6.3. INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA Y DE LA $H^+$ -ATPasa.

Los compuestos difenil(glutamato-O,N)borano,  $FD_1$ , difenil(glicinato-O,N)borano,  $FD_2$ , difenil(treoninato-O,N)borano,  $FD_3$ , y difenil(aspartato-O,N) borano,  $FD_4$  que se comportaron como inhibidores de la transferencia de energía. Este compartamiento es igual al de otros compuestos como el Dio-9, Florizin (0.05 a 2 mM), N-Etilmaleimida (1 mM), ATP (3 mM), Sintalina (1-2 mM), N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCCD) (40  $\mu$ M), Kaempferol (0.13 mM) (Mc Carty, 1977). Durante el transporte de electrones fotosintéticos una parte de la energía libre de las reacciones de oxidoreducción se transfiere por mecanismos acoplados a la fosforilación del ADP. Sustancias que inhiben esta captura de energía en ATP por inhibición de algún mecanismo desconocido en las reacciones de fosforilación son conocidos como inhibidores de la transferencia de energía (Izawa, 1972). La principal distinción de un inhibidor de la transferencia de energía es la disminución de la velocidad del transporte de electrones en condiciones fosforilantes. El flujo de electrones en ausencia de Pi (transporte de electrones basal) o en la presencia de desacoplantes, los flujos de electrones no son afectados o son inhibidos ligeramente (Mc Carty, 1977). Más de una vía terminal de la fotosforilación puede ser inhibida sin un efecto directo en el transporte de electrones o en la magnitud del gradiente de  $H^+$ . (Mc Carty, 1977). Por ejemplo la Florizina bloquea la fosforilación pero no disocia el transporte de electrones basal (Izawa, 1966). Otros compuestos tales como el sulfonato p-mercuribenceno y el acetato fenilintercarica exhiben una inhibición similar característica pero a veces demuestran una leve actividad desacoplante (Izawa, 1972). El Dio-9 estimula la captación de protones (Karlshand, Avron, 1971; Mc Carty et al., 1971). Algunos compuestos no afectan la captación de  $H^+$  o la estimulan como los antisueros anti- $\gamma$  que son antisueros para las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  del complejo  $CF_1$ . Un inhibidor de la transferencia de energía atenúa el transporte de electrones de una manera indirecta. La velocidad de transporte de electrones es baja en condiciones no fosforilantes y el gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal es alta (Mc Carty, 1977). La fosforilación disminuye la magnitud del gradiente de pH y estimula la velocidad del transporte de electrones fosforilante. Por bloqueo de un paso final en la formación de ATP, los inhibidores de la transferencia de energía también impiden el aumento de la velocidad del transporte de electrones debido a la inhibición de la fosforilación ya que esta regula el flujo de electrones (Mc Carty, 1977).

El potencial electroquímico  $\Delta\mu_{H^+}$  generado por el transporte de electrones se utiliza para impulsar una bomba de protones reversible, capaz de hidrolizar ATP en un sentido ("ATPasa"), pero en condiciones fisiológicas funciona en sentido contrario, es decir sintetizando ATP por lo que es más correcta su denominación de "ATP sintetasa" (Nicholls, 1992). De ahí la importancia de conocer el efecto de estos compuestos en la  $H^+$ -ATPasa; establecimos condiciones en las que, al añadir ATP al orgánulo en el cual previamente se activó la ATPasa se produjo la hidrólisis de este nucleótido y los protones son bombeados en sentido contrario hasta alcanzar un equilibrio entre la energía liberada por la hidrólisis de más ATP y la energía necesaria para bombear más protones en contra de un gradiente creado (Nicholls, 1992).

Concentración	H <sup>+</sup> -ATPasa actividad μMoles Pi/mg clorofila/hr	% Control
Control	190.4	
FD <sub>1</sub> , 0.9 mM	169.8	89
FD <sub>1</sub> , 1.5 mM	115.4	60
FD <sub>1</sub> , 2.0 mM	136.2	71
Control	260	
FD <sub>3</sub> , 0.9 mM	218.8	84
FD <sub>3</sub> , 1.5 mM	122	47
FD <sub>3</sub> , 2.0 mM	101.6	39
Control	391.8	
FD <sub>7</sub> , 0.9 mM	408	104
FD <sub>7</sub> , 1.5 mM	353.6	90
FD <sub>7</sub> , 2.0 mM	339.4	86
Control	130.8	
FD <sub>8</sub> , 0.9 mM	213.8	163
FD <sub>8</sub> , 1.5 mM	191	146
FD <sub>8</sub> , 2.0 mM	113.8	87
Control	77.8	
NH <sub>4</sub> Cl, 0.5 mM	166.2	213
NH <sub>4</sub> Cl, 1.1 mM	400.2	514
NH <sub>4</sub> Cl, 2.2 mM	440.8	566
Control	85	
FCCP, 1 μM	130	152
FCCP, 2 μM	175	204
FCCP, 4 μM	305	359

Tabla 5. Efecto de los inhibidores de la transferencia de energía: difenil(glutamato-O,N)borano FD<sub>1</sub>, difenil(glicinato-O,N)borano FD<sub>3</sub>, difenil(treoninato-O,N)borano FD<sub>7</sub>, difenil(aspartato-O,N)borano FD<sub>8</sub>, en la actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa, en relación al efecto de dos desacoplantes NH<sub>4</sub>Cl y FCCP sobre la actividad de esta enzima. El control es el 100% de actividad.

Como se observa en la tabla 5 los compuestos difenil(glutamato-O,N)borano, FD<sub>1</sub>; difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub>; difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub>; presentaron un efecto inhibitorio en la actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa, aumentando esta al aumentar la concentración del compuesto. El difenil(glicinato-O,N) borano, FD<sub>3</sub> presentó una inhibición de 61% a una concentración 2 mM, mientras que el difenil(glutamato-O,N)borano, FD<sub>1</sub> y el difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub> presentó 29% y 14% a 2 mM respectivamente. En el caso del difenil(aspartato-O,N)borano, FD<sub>8</sub> tiene un aumento en la actividad de hidrólisis del ATP a las concentraciones de 0.9 y 1.5 mM pero al aumentar la concentración a 2 mM el efecto fue inhibitorio con un valor del 13 %. El flujo de electrones a lo largo de la cadena transportadora produce una translocación de protones en la misma dirección que la que se origina por la hidrólisis espontánea del ATP por la ATP sintetasa (ATPasa) (Nicholls, 1992). El efecto de estas translocaciones de protones es el establecimiento de un circuito de protones a través de la membrana transductora de energía. Este

circuito de protones es muy similar a un circuito eléctrico (Nicholls, 1992). La velocidad de la conversión química está ligada a la corriente de electrones, o de protones, que fluye por el resto del circuito, la cual depende de la resistencia de este. El comportamiento químico de estas boroxazolidonas está dado posiblemente por el grupo funcional que se presenta en su sustituyente, para el caso del  $FD_1$  y  $FD_4$  es el carboxilo  $-COOH$ ; para el  $FD_7$  y  $FD_{11}$  es el grupo  $-OH$  y el del  $FD_3$  es un  $-H$ , dado sus características tienden a ceder un ion hidrógeno ó bien pueden formar puentes de hidrógeno con otras moléculas (Van Assche, 1982). Estos grupos pueden contribuir al igual que la estructura principal para conferir la hidrofobicidad necesaria para atacar el sitio blanco de acción, alguna enzima que interviene en la fotosíntesis (Miyoshi, 1990; Trebst, 1984; Trebst, 1978). Las boroxazolidonas actuarían incrementando la conductancia de la membrana, produciendo un cortocircuito, ya que el gradiente electroquímico  $\Delta\mu H^+$  altera la conformación de la  $CF_1$  en cloroplastos; y este cambio conformacional afecta la actividad catalítica de la  $CF_1$  (Nicholls, 1992). O pueden unirse a alguna subunidad de la  $H^+$ -ATPasa, como en el caso de la N-etilmaleimida que se une a la subunidad  $\gamma$  de la  $CF_1$  (Mc Carty, 1979); en  $CF_1$  de *Rhodospirillum*, la subunidad  $\gamma$  es necesaria para la fotosíntesis (Peña-Valdivia, 1990); provocando así un cambio conformacional de la  $H^+$ -ATPasa y su inactivación.

En general, los herbicidas son fitotóxicos debido a una fotooxidación de las membranas fotosintéticas. Las plantas tienen mecanismos que previenen el daño que pudieran sufrir las membranas por tóxicos como  $^3Cl$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  que son normalmente producidos en pequeño grado durante la fotosíntesis. Plantas tratadas con inhibidores del transporte de electrones del fotosistema II o del fotosistema I producen una mayor cantidad de estas especies tóxicas, las cuales dañan los mecanismos de protección, resultando en fitotoxicidad. Los mecanismos de protección presentes en plantas incluye lo siguiente: carotenoides que protegen de  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ ; superóxido dismutasa (SOD) convierte  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  y la catalasa y peroxidasa protegen del  $H_2O_2$ . Los carotenoides y  $\alpha$ -tocoferol están presentes en la membrana tilacoidal, ascorbato y glutatiónas se localizan en el estroma del cloroplasto; la catalasa y peroxidasa están presentes en los peroxisomas que se encuentran cercanos o en las proximidades de los cloroplastos. El  $H_2O_2$  también se detoxifica en el estroma del cloroplasto por el ciclo del ascorbato/glutatióna conducido por el NADPH. El ciclo de las xantofilas puede también ayudar en la disminución de especies tóxicas de oxígeno. El proceso de peroxidación de lípidos destruye la integridad de membranas, principiando la pérdida de compartamentación celular y fitotoxicidad (Fuerst, 1991). Los ácidos grasos más abundantes en la membrana de los tilacoides son los ácido linolénicos y linolécicos. Estos ácidos grasos polinsaturados son utilizados en la peroxidación de lípidos. La  $^3Cl$  y  $OH$  pueden extraer átomos de hidrógeno de ácidos grasos insaturados resultando así un radical lipídico. La estructura molecular resulta en una configuración de dieno conjugado dentro del radical del ácido graso que se puede convertir a un radical peróxido lipídico con la adición de oxígeno molecular. El proceso de peroxidación de lípidos es autocatalítica desde que el radical del peróxido lipídico puede iniciar la abstracción de hidrógeno de lípidos cercanos. El radical de peróxidos lipídicos puede convertirse en endoperóxidos e hidroperóxidos. El  $^1O_2$  puede reaccionar directamente con ácidos grasos polinsaturados y producir directamente un hidroperóxido lipídico. Hidroperóxidos de lípidos se degradan en pequeños fragmentos de hidrocarbóno tales como el etano y malondialdehído (Fuerst, 1991).

En base a lo anterior se puede decir que las boroxazolidonas, estudiadas en esta tesis, son posiblemente asimiladas por alguno de los mecanismos arriba mencionados y de ahí que no se les encuentre un efecto inhibitor potente; dado que algunos herbicidas son fitotóxicos como consecuencia de sus interacciones con el transporte de electrones y subsecuentemente con la

destrucción de membranas fotosintéticas (Fuerst, 1991). Esto plantea que el mecanismo de asimilación de las boroxozalidonas requiere ser estudiado con más detalle.

#### 6.4. RESPIRACION DE SEMILLAS DE PLANTAS AGRICOLAS Y MALEZAS.

Con el objeto de estudiar la posible actividad herbicida de pre-emergencia de las boroxozalidonas en la respiración durante la germinación de semillas, se determinó el efecto de los complejos de difenil borano en la respiración de las siguientes semillas de plantas agrícolas: dicotiledonea, tomate (*Physalis ixocarpa*); dos tipos de semillas de monocotiledonea, trigo (*Triticum vulgare*) y la maleza: zacate Jhonson (*Sorghum halepense*) durante 72 horas a 28°C.

La respiración anaeróbica sirve como fuente principal de ATP usado en las reacciones que requieren energía durante el crecimiento y desarrollo de las plantas. Siedow, 1995. Y en este caso encontramos que los compuestos de difenil borano, presentan diferentes actividades como son la inhibitoria o desacoplante, esto provoca la desorganización funcional del transporte de electrones mitocondrial llevando así a la inactivación de las vías metabólicas dependientes de ATP y con ello a la muerte del embrión. Sin embargo, en el caso de aquellos compuestos que presentan una recuperación gradual del efecto inicial de los compuestos que producen desacoplamiento o inhibición podemos decir que son metabolizados.

El orden de actividad en relación a la inhibición y concentración, sobre la respiración de las diferentes semillas, se da en la tabla 6 con los valores de inhibición  $I_{25}$ ,  $U_{50}$ ,  $I_{15}$ , donde se aprecia la concentración a la cual tenemos un 25% de inhibición de la respiración de las semillas de trigo y zacate Jhonson, mientras que para el tomate la inhibición solo es de 15%, el caso de  $U_{50}$  nos indica un 50% de desacoplamiento en relación al control; estos datos se obtuvieron a las 72 hrs. de imbibidas las semillas y el orden de actividad que se presenta esta dado en relación a la concentración de compuesto que se utilizó, para obtener ese porcentaje de inhibición, es decir con menor cantidad de compuesto obtenemos un mayor efecto ya sea inhibidor y/o desacoplante sobre las semillas indicando así, su mayor actividad, por el contrario si tenemos una mayor concentración y un menor efecto, el compuesto no es activo. En base a esto se da el orden de mayor a menor actividad inhibitoria donde se toma en consideración el efecto de la concentración menor; para cada uno de los casos estudiados.

##### 6.4.1. EFECTO DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN LA RESPIRACION DE *Physalis ixocarpa* DURANTE LA GERMINACION.

A continuación se describe el efecto del difenil(glutamato-O,N)borano,  $FD_1$  sobre la respiración de semillas de *Physalis ixocarpa*, se muestra en la figura 11, un efecto inhibitorio máximo a las 24 hrs con 34%, 29% y 36% de inhibición a 0.5, 0.8 y 1.2 mM, ya que para los siguientes días de germinación este efecto se revierte para todos los casos, presentándose una ligera inhibición del 11% a 1.2 mM a las 72 hrs. mientras que se acelera un 137.6 a las 48 hrs para todas las concentraciones utilizadas. Estos resultados sugieren que el compuesto es metabolizado por las semillas de tomate a medida que transcurre el tiempo de germinación, esta observación requiere investigaciones posteriores para que sea aclarado.

El siguiente compuesto que se describe sobre la respiración de las semillas de tomate durante la germinación se muestra en la figura 11 Se observa que el difenil(lisinato-O,N)borano,  $FD_2$  a las

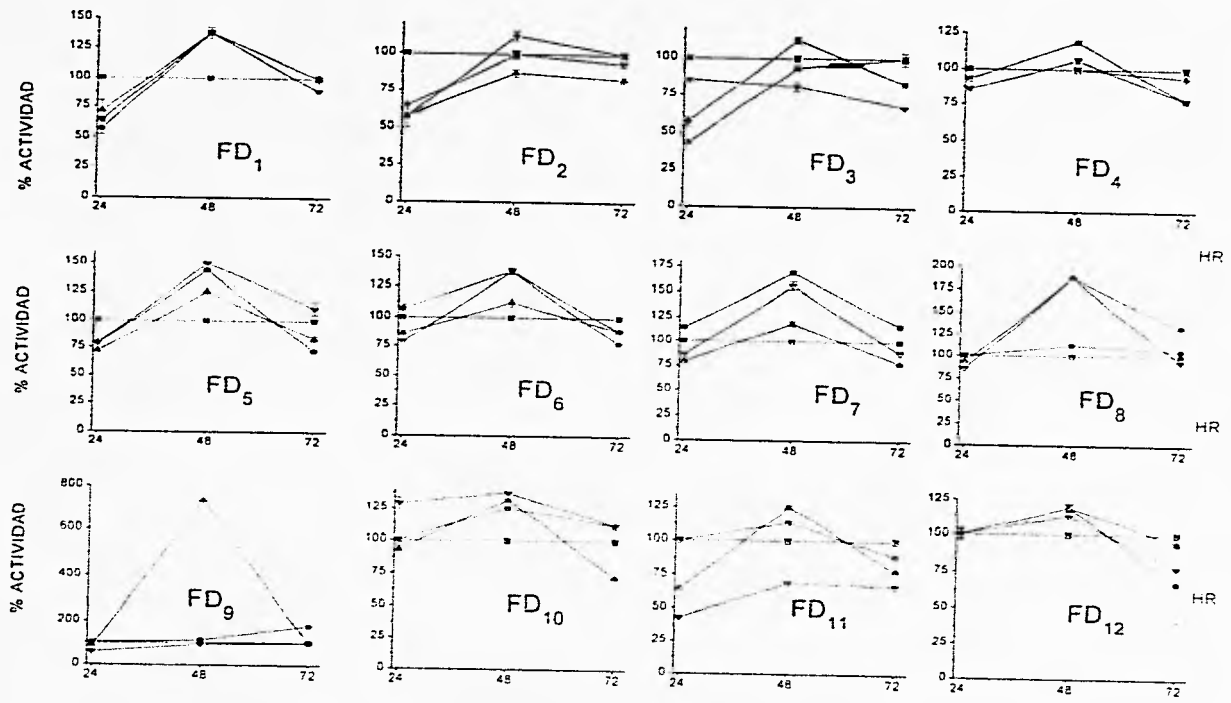


Figura 11. Efecto de los complejos de difenilborano en la respiración de semillas de tomate (*Physalis ixocarpa*) a 28°C durante 24, 48 y 72 horas de inhibición. ■, control; ●, 0.5 mM; ▲, 0.8 mM; ▼, 1.2 mM.

24 hrs de imbibición a las concentraciones de 0.5, 0.8 y 1.2 mM presentó los siguientes valores de inhibición 43%, 43% y 36% respectivamente, en donde se ve mayor inhibición conforme aumenta el tiempo de exposición de las semillas al compuesto durante la germinación de las semillas, siendo la concentración de 0.8 mM la que presenta un efecto más constante ya que a las 48 hrs tiene un 13% de inhibición y a las 72 hrs de 17%. Nótese que este compuesto es parcialmente transformado ya que hay reversión parcial de la inhibición de la germinación

A continuación se describen los resultados del difenil(glicinato-O,N)borano,  $FD_1$  en donde se observa el mayor efecto de inhibición (figura 11) a las 24 hrs para todas las concentraciones de menor a mayor concentración producen 43%, 57% y 14% a 0.5, 0.8 y 1.2 mM ya que a las 48 hrs y a 0.5 mM del compuesto presenta un activación en la velocidad de la respiración del 112.5% comparado con el control, aunque posteriormente la respiración disminuye a las 72 hrs de germinación con sólo un 17% de inhibición, para la concentración de 0.8 mM vemos que hay una recuperación gradual de la respiración ya que a las 48 hrs la inhibición es tan solo de 6% y a las 72 hrs tiene la misma velocidad que el control, para la concentración de 1.2 mM solo presenta una disminución del 34 % a las 72 hrs siendo esta concentración la más constante en su efecto inhibitorio a través del tiempo de germinación. Estas observaciones también nos indican que el difenil(glicinato-O,N)borano,  $FD_1$  es metabolizado durante la germinación de las semillas de tomate.

En cambio el difenil(isoleucinato-O,N)borano,  $FD_2$  tiene poco efecto inhibitorio en la respiración de las semillas de tomate durante la germinación como se puede apreciar en la figura 11 a la concentración de 1.2 mM a las 72 hrs donde solo inhibe un 22%. Por otro lado a las 48 hrs a una concentración de 0.8 mM activa la respiración un 119 %. De lo anterior deducimos que es un compuesto con poca actividad inhibitoria de la respiración aunque también es metabolizado.

Por otro lado en la figura 11 se observa que el difenil(leucinato-O,N)borano,  $FD_3$  presenta un pequeña inhibición de la respiración de las semillas de tomate a las 24 hrs de inhibición, pero también este se revierte a las 48 hrs ya que se manifiesta una actividad desacoplante ya que activa la respiración a los siguientes valores porcentuales de velocidad de 143.8 %, 125% y 150% a las concentraciones de 0.5, 0.8 y 1.2 mM respectivamente, siendo la de las 72 hrs de germinación la más constante en la activación a 111%. Estas observaciones muestran que el difenil(leucinato-O,N)borano,  $FD_3$  es transformado por las semillas de tomate durante la germinación.

El efecto del difenil(metionato-O,N)borano,  $FD_4$  sobre la respiración de las semillas de tomate es de desacoplante ya que activa la respiración a las 24 y 48 hrs para la concentración 0.5 mM incrementándose a 107%, 137.5 % el cual se ve disminuido a las 72 hrs con 22% de inhibición. Para las concentraciones de 0.8 y 1.2 mM a las 48 hrs presentó una activación de la respiración de 112.5% y 137.5% respectivamente y la cual disminuye para ambos casos con un 11% de inhibición. Estos resultados nos indican que este compuesto también es metabolizado durante la germinación al igual que los otros compuestos descritos. (figura 11)

Al igual que el compuesto anterior el difenil(treoninato-O,N)borano,  $FD_5$  presenta una actividad desacoplante a la concentración 0.5 mM a las 24, 48 y 72 hrs con los siguientes valores respectivamente 114%, 169% y 116.7% presentándose un efecto inhibitorio de 21% y 22% a las 24 y 72 hrs a la concentración de 0.8 mM; en cambio a la concentración de 1.2 mM esta inhibición es de solo 11% a las 72 hrs (figura 11). Los datos también indican que este compuesto sufre metabolismo durante la germinación.

En la figura 11 se muestra el efecto del difenil(aspartato-O,N)borano,  $FD_6$  sobre la respiración en semillas de tomate durante la germinación y se observa que a la concentración de 0.5 mM presenta los siguientes valores de actividad 100%, 112.5% y 105.5% a las 24, 48 y 72 hrs respectivamente (figura 11), indicándonos que se comporta como un desacoplante de la fosforilación



oxidativa, ya que se activa la respiración. Vemos que esta actividad de desacoplamiento se hace mas evidente a la concentración de 0.8 mM después de las 24 hrs de imbibición, es decir, a las 48 hrs presenta el valor de 187.5% y de 133% para las 72 hrs. Cabe mencionar que este compuesto a su concentración máxima de 1.2 mM no tiene un efecto drástico de inhibición en la respiración ya que la afecta un 14%, aunque si presenta un efecto desacoplante similar al de la concentración 0.8 mM a las 48 hrs. Debido a que activa la respiración de las semillas de tomate indica que desacopla la fosforilación oxidativa ya que este organelo es el responsable de la respiración y también que necesita más de 24 hrs para translocarse en la mitocondria para desacoplar y además es metabolizado ya que inhibe la respiración a las 72 hs de germinación.

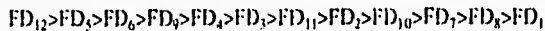
A continuación se describe el efecto del difenil(fenilglicinato-O,N)borano, FD<sub>9</sub> sobre la respiración de las semillas de tomate. Se observa que el efecto inhibitorio de la respiración más potente se localiza a las 24 hrs y a la concentración de 0.8 y 1.2 mM del compuesto. En cambio a las 48 hrs y 0.8 mM desacopla la fosforilación de la mitocondria ya que activan el flujo de electrones a 112% y 131 % a 0.5. En cambio a 1.2 mM y a las 72 hrs inhibe un 21% y a las otras concentraciones no presentó efecto. (figura 11)

En la figura 11 se observa que el difenil(tirosinato-O,N)borano, FD<sub>10</sub> presenta un efecto desacoplante débil a las 24 hrs y máxima a las 48 hrs a todas las concentraciones ensayadas de 0.5, 0.8 y 1.2 mM, aunque a 1.2 mM disminuye la potencia netivadora de la respiración de este compuesto. En general podemos decir que este compuesto actúa como un desacoplante de la fosforilación oxidativa ya que acelera el consumo de oxígeno en la respiración de las semillas de tomate y a altas concentraciones se observa ligero metabolismo del compuesto.

El difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> a las 24 hrs a la concentración de 0.5 mM presenta 100% de actividad, mientras que a concentraciones de 0.8 y 1.2 es de 36 y 57 % de inhibición, para las 48 hrs hay un aumento de 113% y 125% a 0.5 y 0.8 mM mientras que a 1.2 mM hay inhibición del 31% a 1.2 mM. Para las 72 hrs encontramos que los valores de inhibición son 11%, 22% y 33% a las concentraciones de 0.5, 0.8 y 1.2 mM. (figura 11) Estos datos también indican que el compuesto es metabolizado por las semillas de tomate durante la germinación.

Finalmente los estudios del difenil(prolinato-O,N)borano, FD<sub>12</sub>, muestran que a las 24 hrs no tiene efecto y que se presenta un efecto de activación de la respiración a las 48 hrs de manera desacoplante para todas las concentraciones tenemos los siguientes valores 118%, 119% y 112.5% a 0.5, 0.8 y 1.2 mM del compuesto, en cambio a las 72 hrs hay una inhibición, de menor a mayor concentración tenemos un 33%, 6% y 22% de inhibición. De lo anterior podemos deducir que este compuesto tarda en penetrar en la semillas de tomate y por ende tenemos un retardo en su efecto en la respiración y el compuesto es metabolizado por las semillas de tomate durante la germinación. (figura 11)

El orden de mayor a menor actividad inhibitoria de los compuestos se da a continuación:



#### 6.4.2. EFECTO DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN LA RESPIRACION DE *Triticum vulgare* DURANTE LA GERMINACION.

A continuación se presenta el estudio del difenil(glutamato-O,N)borano, FD<sub>1</sub> sobre la respiración de las semillas de *Triticum vulgare* durante su germinación en donde se observa una

actividad inhibitoria a las 24 hrs y 48 hrs para todas las concentraciones ensayadas observándose máxima inhibición de 79% a 0.5 y 0.8 mM. Para las 72 hrs se presenta una aceleración de la respiración en las primeras dos concentraciones de 0.5 mM y 0.8 mM siendo de 132% y 248% respectivamente; en cambio para la máxima concentración de 1.2 mM tenemos un 8% de inhibición a las 72 hrs. Estos datos indican que el difenil(glutamato-O,N)borano, FD<sub>1</sub> es metabolizado por las semillas de trigo durante la germinación y su producto induce desacoplamiento. (figura 12)

En la figura 12 se observa el efecto del difenil(lisinato-O,N)borano, FD<sub>2</sub> sobre la respiración de las semillas de trigo durante la germinación en donde se muestra una inhibición notable a la concentración de 0.5 mM. Cabe mencionar que al paso del tiempo se ve una recuperación gradual en la respiración de las semillas ya que para las 48 hrs el efecto inhibitorio disminuye de mayor a menor concentración de la siguiente manera 58%, 27% y 6 % a 0.5, 0.8 y 1.2 mM del compuesto, notándose que se recupera más rápidamente a la mayor concentración comparada con las otras dos concentraciones menores; en donde vemos que a las 72 hrs la inhibición que encontramos es de 66%, 64% y de 38% para las concentraciones de 0.5, 0.8 y 1.2 mM. Este compuesto es el más constante en su efecto inhibitorio siendo por tanto uno de los más potentes como inhibidores de la respiración de las semillas de trigo, así los datos nos indican que el compuesto es metabolizado por las semillas de trigo durante la germinación.

En la figura 12 el difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub> a las 24 hrs y 48 hrs se encontró un efecto inhibitorio de la respiración. En la misma figura 12 encontramos que este efecto se revierte de manera desacoplante con los valores de 118%, 103% y 156% a 0.5, 0.8 y 1.2 mM. Estos indica que el compuesto es metabolizado durante la germinación de las semillas.

El estudio del efecto del difenil(leucinato-O,N)borano, FD<sub>4</sub> sobre la respiración de las semillas de trigo presenta un efecto desacoplante a las 24 hrs con los siguientes valores 133% y 300% para las concentraciones de 0.8 y 1.2 mM ya que a la de 0.5 mM hay un efecto inhibitorio del 23%. Encontramos que conforme transcurre el tiempo de imbibición el efecto desacoplante del compuesto se ve disminuida siendo los valores de inhibición a las 72 hrs con los siguientes porcentajes de 46%, 43% y 14% para las concentraciones de 0.5 mM, 0.8 mM y 1.2 mM respectivamente. Los datos indican que el compuesto es metabolizado durante la germinación y que la respiración es inhibida en todas las concentraciones ensayadas. figura 12.

El difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>5</sub> actúa inhibiendo la respiración de las semillas durante todo el tiempo de registro de la respiración de las semillas y se observa al final de este una recuperación que no llega a ser total para ninguna de las concentraciones ensayadas (figura 12). Vemos que a valores de 0.5 mM, 0.8 mM y 1.2 mM respectivamente son de 37%, 46% y 46% a las 24 hs., y a las 48 hrs de germinación de 38.5%, 58% y 62% respectivamente y al final de 11%, 35% y 11% de inhibición de la respiración a las 72 hrs. Estos datos también indican que el compuesto es metabolizado.

El difenil(aspartato-O,N)borano, FD<sub>6</sub> a las 24 hrs inhibe la respiración de las semillas de trigo (figura 12) obteniéndose los siguientes valores 40%, 50% y 53% para las concentraciones de 0.5, 0.8 y 1.2 mM, para las siguientes 48 hrs de germinación encontramos que hay un efecto desacoplante para todos los casos tenemos una activación de la respiración de 240%, 177% y 113% a las concentraciones de 0.5 mM, 0.8 mM y 1.2 mM, esta activación disminuye considerablemente para la concentración 0.5 mM a las 72 hrs. ya que es inhibida un 85% siendo esto el efecto más drástico en la respiración, la concentración de 0.8 mM inhibe únicamente 37% y para la concentración de 1.2 mM tenemos un valor de activación de 104%. Dado los resultados obtenidos indican que el compuesto es un inhibidor-desacoplante y es metabolizado durante la germinación de las semillas de trigo

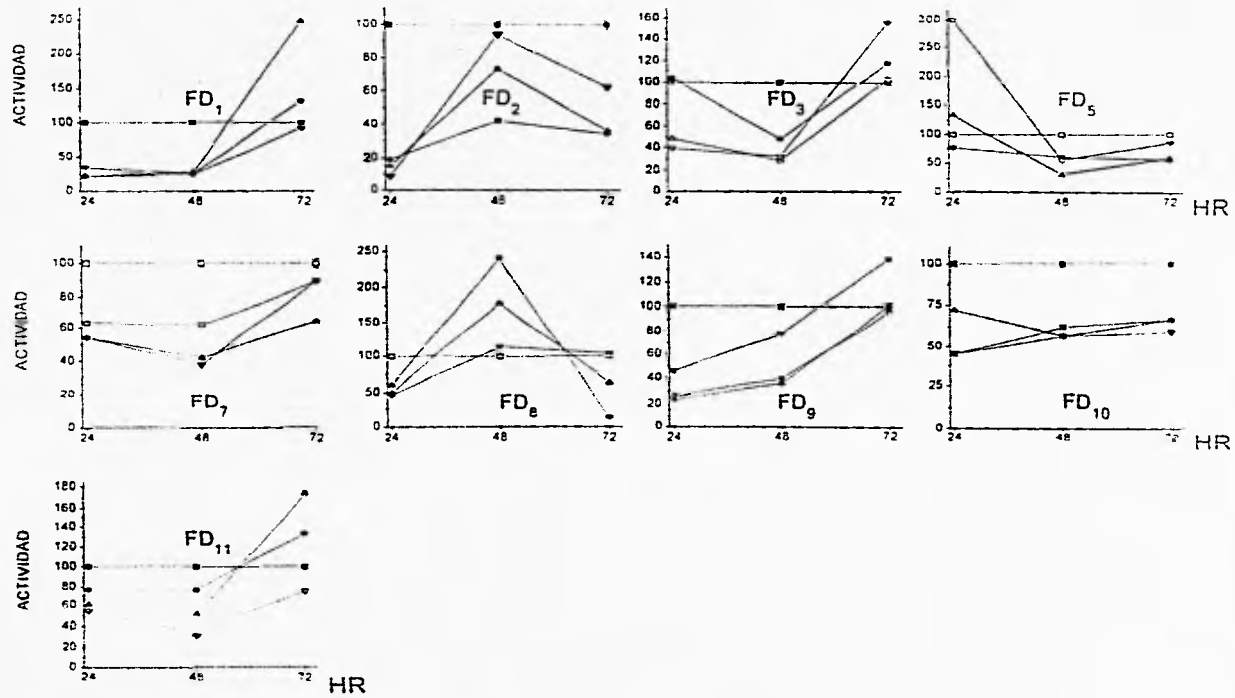


Figura 12. Efecto de los complejos de difenilborano en la respiración de semillas de trigo (*Triticum vulgare*) a 28°C durante 24, 48 y 72 horas de imbibición. ■. control; ●, 0.5 mM; ▲, 0.8 mM; ▼, 1.2 mM.

El estudio del difenil(fenilglicinato-O,N)borano, FD<sub>9</sub> sobre la respiración de las semillas de trigo presenta un efecto de inhibición obteniéndose una mayor actividad a las 24 y 48 hrs ya que a las 72 hrs presentan una recuperación de la captación de oxígeno por parte de las semillas, a la concentración de 0.5 mM se encontró que a las 24 hrs hay una inhibición del 74% a las 48 hrs de 61% y finalmente a las 72 de solo 5% siendo esta concentración la que presenta un mayor efecto inhibitorio para las 24 y 48 hrs de respiración; a la concentración de 0.8 mM del compuesto tenemos que a las 24 hrs inhibe 77% y a las 48 hrs un 55% recuperándose totalmente a las 72 hrs, para la concentración 1.2 mM tenemos que actúa como un desacoplante ya que la demanda de oxígeno por parte de las semillas se ve incrementado en relación al control con los siguientes valores a 1.2 mM tenemos 126%, 324% y 138% para los tiempos 24, 48 y 72 hrs de germinación respectivamente figura 12.

El difenil(tirosinato-O,N)borano, FD<sub>10</sub> presenta una inhibición constante de la respiración de las semillas de trigo durante la germinación para todas las concentraciones ensayadas, tal como se muestra en la figura 12, así como para todos los tiempos de imbibición. Tenemos que este compuesto presenta un efecto inhibitorio de la respiración a la concentración 0.5 mM y que no varía para las demás concentraciones ya que los valores de inhibición son semejantes para las demás concentraciones, como se puede apreciar en la figura 12 ya que a las 72 hrs de menor a mayor concentración presenta un 34%, 34% y 41% de inhibición siendo esta similar para las horas anteriores. Este compuesto parece que no es metabolizado durante la germinación ya que siempre inhibe la respiración.

El complejo difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> manifiesta una actividad inhibitoria de la respiración de las semillas de trigo a las 24 y 48 hrs, aunque a las 72 hrs hay un desacoplamiento de la respiración de 133% y 173% a 0.5 y 0.8 mM ya que a 1.2 mM se inhibe 24%. Dado las variaciones en respuesta a la respiración, este compuesto indica que es metabolizado durante la germinación de las semillas de trigo. (figura 12)

El orden de actividad de mayor a menor inhibición de los compuestos es el siguiente en base a los valores que se presentan en la tabla 6:

$$FD_2 > FD_8 > FD_9 > FD_{10} > FD_5 > FD_1 > FD_{11} > FD_7 > FD_3$$

#### 6.4.3. EFECTO DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN LA RESPIRACION DE *Sorghum halepense* DURANTE LA GERMINACION.

El estudio del difenil(glutamato-O,N)borano, FD<sub>1</sub> sobre la respiración de las semillas del zacate Jhonson (*Sorghum halepense*) durante la germinación presenta una aceleración máxima de esta actividad respecto al control de un 200% a una concentración 1.2 mM a las 24 hrs de imbibición, mostrando una actividad de desacoplamiento de la respiración figura 13 En cambio a las 48 y 72 hrs se observa inhibición de la respiración a todas las concentraciones ensayadas siendo mayor la inhibición a mayor concentración figura 13.

En la figura 13. Se muestra el efecto del difenil(hisinato-O,N)borano, FD<sub>2</sub> sobre la respiración de las semillas de zacate Jhonson. Este compuesto presenta una activación de la respiración de 150%, 466.7% y 133% a las concentraciones 0.5, 0.8 y 1.2 mM a las 24 hrs, estos resultados indican que este compuesto produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Sin embargo este compuesto inhibe la respiración a mayores tiempos de germinación, siendo mayor la

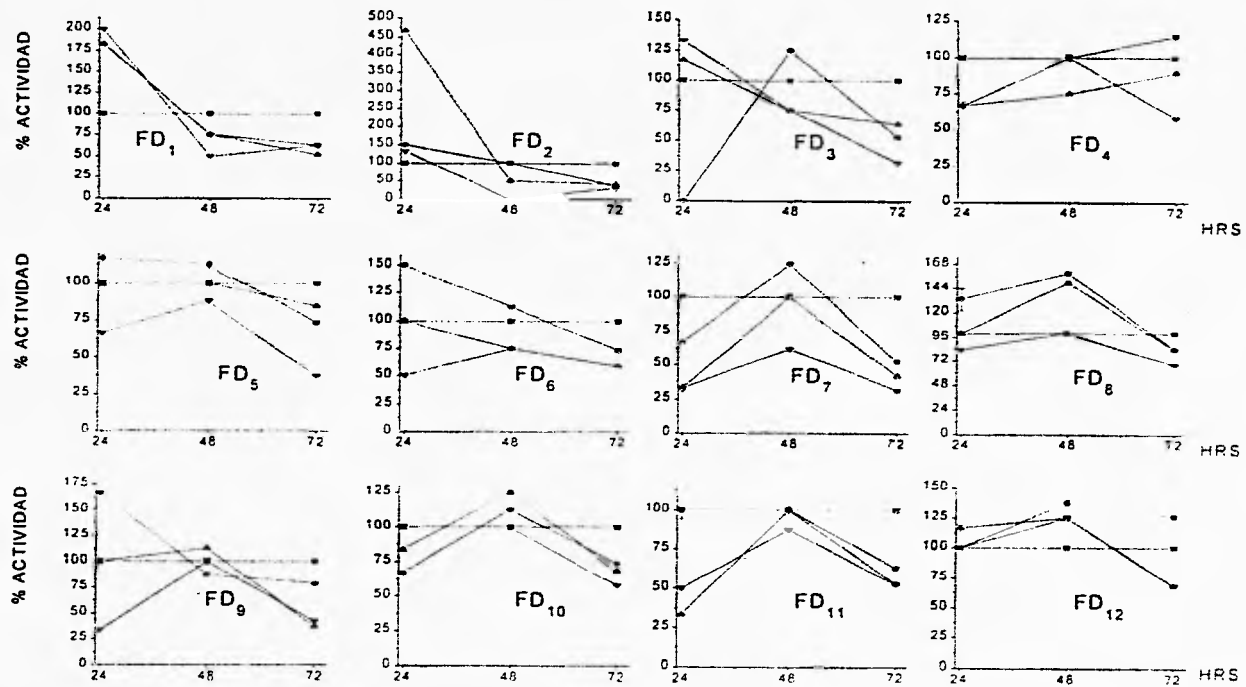


Figura 13. Efecto de los complejos de difenilborano en la respiración de semillas de zacate Jhonson (*Sorghum halepense*) a 28°C durante 24, 48 y 72 horas de imbibición. ■, control; ●, 0.5 mM; ▲, 0.8 mM; ▼, 1.2 mM.

inhibición a mayor concentración. Estos resultados indican que este compuesto también es metabolizado durante la germinación de las semillas de zacate Johnson.

A continuación se presenta el efecto del difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub> sobre la respiración de las semillas de *Sorghum halepense* durante la germinación. Encontramos que a 0.5 mM este compuesto tiene un efecto drástico del 100% de inhibición a las 24 hrs de imbibición en cambio hay una activación de la respiración a 0.8 mM y 1.2 mM a las 24 hrs. Por lo que este compuesto se comporta como inhibidor de la respiración a bajas concentraciones del compuesto y como desacoplante a altas concentraciones. Este compuesto es metabolizado durante la germinación ya que a las 48 hrs, se inhibe la respiración a medida que aumenta su concentración figura 13.

El complejo de difenil(isoleucinato-O,N)borano, FD<sub>4</sub> inhibe la respiración de semillas de *Sorghum halepense* durante la germinación a todas las concentraciones ensayadas.(figura 13).

Por otro lado el difenil(leucinato-O,N)borano, FD<sub>5</sub> no presenta un efecto inhibitorio potente de la respiración en las semillas de *Sorghum halepense* ya que solo inhibe un 63% a las 72 hrs a una concentración de 1.2 mM tal como se muestra en la figura 13; y en las otras concentraciones no tiene efecto marcado.

Difenil(metionato-O,N)borano, FD<sub>6</sub> a una concentración de 0.5 mM a las 24 y 48 hrs presenta una activación de la respiración de 150%, 112.5% respectivamente indicando que actúa como desacoplante de la respiración, sin embargo este proceso se revierte a las 72 hrs ya que se inhibe un 26%. A la concentración 1.2 mM presenta un efecto inhibitorio de la respiración del 50%, 25% y 42% a las 24, 48 y 72 hrs respectivamente siendo esto su efecto inhibitorio más potente. Los resultados indican que el compuesto es metabolizado en la germinación de la semillas de *Sorghum halepense*. (figura 13)

En cambio el difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub> inhibe la respiración a las 24 hrs de imbibición y desacopla a las 48 hrs de imbibición y vuelve a inhibir la respiración a las 72 hrs. Estos resultados muestran, figura 13, que el compuesto se metaboliza durante la germinación.

El difenil(aspartato-O,N)borano, FD<sub>8</sub> presenta una activación de la respiración de las semillas de zacate Johnson acelerándola a una concentración de 0.5 mM durante 24 y 48 hrs con los valores de 133% y 159.7% respectivamente, mientras que a las 72 hrs se inhibe solo un 16%. Estos resultados indican que el compuesto se comporta como un desacoplante, aumentando la potencia desacoplante a las 48 hrs de imbibición, en cambio a las 72 hrs se observa inhibición de la respiración siendo esta mayor al aumentar la concentración del compuesto figura 13. Estos resultados indican que este compuesto es metabolizada.

El difenil(fenilglicinato-O,N)borano, FD<sub>9</sub> presenta un efecto desacoplante de 166% a las 24 hrs de imbibición y a una concentración de 0.5 mM fue la activación más alta detectada, comportándose durante las 48 y 72 hrs como un inhibidor débil de la respiración. A las 72 hrs solo se observa inhibición de la respiración. Estos resultados también indican, que este compuesto es metabolizado durante la germinación del zacate Johnson. figura 13.

Por otro lado el difenil(tirosinato-O,N)borano, FD<sub>10</sub> figura 13. también presenta efecto desacoplante ya que activa la respiración siendo mayor a bajas concentraciones, esta actividad desacoplante disminuye drásticamente a las 48 hrs de imbibición y a las 72 hrs de imbibición se observa inhibición de la respiración a todas las concentraciones ensayadas siendo mayor la inhibición de la respiración a mayor concentración del compuesto. Estas observaciones indican que este compuesto es metabolizado por las semillas de zacate Johnson durante la germinación.

El difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> tiene un efecto inhibitorio de la respiración de semillas de zacate Johnson a las 24 hrs de imbibición y a las 48 hrs se revierte, en cambio a las 72 hrs de imbibición se observa su inhibición de la respiración a todas las concentraciones ensayadas. figura 13 indicándonos que el compuesto es metabolizado.

Finalmente describiremos el efecto del difenil(prolinato-O.N)borano, FD<sub>12</sub> sobre la respiración de semillas de zacate Jhonson y los resultados encontrados se muestran en figura 13. Se observa que tiene una actividad desacoplante débil a las 24 hrs de imbibición y después a las 72 hrs inhibe débilmente la respiración. Los resultados encontrados con este compuesto indican que es metabolizado durante la germinación de las semillas del zacate Jhonson

El orden de actividad inhibitoria de los compuestos es el siguiente en base a los valores de que se presenta en la tabla 6:

$$FD_2 > FD_1 > FD_7 > FD_3 > FD_{11} > FD_9 > FD_5 > FD_6 > FD_{10} > FD_{12} > FD_4 > FD_8$$

COMPUESTO	<i>Triticum vulgare</i>		<i>Sorghum halepense</i>	<i>Physalis ixocarpa</i>
	I <sub>25</sub>	U <sub>50</sub>	I <sub>25</sub>	I <sub>15</sub>
FD <sub>1</sub>		540	260	1200
FD <sub>2</sub>	150		200	720
FD <sub>3</sub>		1100	300	450
FD <sub>4</sub>			1000	300
FD <sub>5</sub>	300		500	250
FD <sub>6</sub>			500	250
FD <sub>7</sub>	700		280	750
FD <sub>8</sub>	150		1080	750
FD <sub>9</sub>	170		580	300
FD <sub>10</sub>	250		600	700
FD <sub>11</sub>		650	380	550
FD <sub>12</sub>			780	200

Tabla 6. Valores de las concentraciones (μM) de inhibición del 25%, 15% y desacoplamiento 50% (I<sub>25</sub>, U<sub>50</sub>, I<sub>15</sub>) para la respiración de las semillas de: *Triticum vulgare*, *Sorghum halepense* y *Physalis ixocarpa*.

6.5. EFECTO DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN LA GERMINACION DE SEMILLAS DE PLANTAS AGRICOLAS Y MALEZAS.

COMPUESTO	<i>Sorghum halepense</i>			<i>Triticum vulgare</i>			<i>Physalis ixocarpa</i>	
	0.5	0.8	1.2	0.5	0.8	1.2	0.5	
FD <sub>1</sub>	61±1.15	52±1.5	27±1.7	84±1	72±2	16±2	54±1	
FD <sub>2</sub>	70±1.5	27±1.1	29±1.7	48±1.7	20±1.7	4±1	69±1.7	
FD <sub>3</sub>	79±2.6	43±1.5	34±2	28±1.15	12±1	0±0	55±2	
FD <sub>4</sub>	86±2.6	68±1.5	68±1.7	92±2	92±1	84±2	49±2.6	
FD <sub>5</sub>	61±3	50±1.7	45±2.6	76±1	60±2	68±1.7	20±1.7	
FD <sub>6</sub>	100±0	52±1	100±0	96±2	100±0	68±1	30±1.5	
FD <sub>7</sub>	88±1	47±1.7	16±1	92±1.5	20±1.7	20±1	50±2	
FD <sub>8</sub>	61±3	57±2.6	47±1	72±1	68±1	64±1	54±2	
FD <sub>9</sub>	75±1	68±1	66±1.7	52±1.7	12±1.7	40±1.5	7±1	
FD <sub>10</sub>	70±2.6	57±2	29±1.7	92±1.7	72±1.7	32±1.15	18±1.7	
FD <sub>11</sub>	68±1	57±2	27±1.5	60±1.7	8±1	4±0	45±1	
FD <sub>12</sub>	84±2	100±0	75±1	88±1	88±1.7	80±1.5	31±1.15	

Tabla 7. Efecto de las boroxozalidonas en la germinación de la maleza zacate Jhonson (*Sorghum halepense*) y de las plantas agrícolas trigo (*Triticum vulgare*) y tomate (*Physalis ixocarpa*). Los valores representan el porcentaje de germinación de plantas, con su desviación estandar, que lograron crecer en presencia de los compuestos.

Estudiamos el efecto de las boroxozalidonas sobre la germinación de semillas de malezas y plantas cultivables. Los compuestos de difenil borano presentan efecto en la germinación de semillas de *Sorghum halepense*, *Triticum vulgare*, *Physalis ixocarpa*, como se observa en la tabla 7, la germinación de *Triticum vulgare* (figura 14), es afectada por el difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub> > difenil(lisinato-O,N)borano, FD<sub>2</sub> > difenil(fenilglicinato-O,N)borano, FD<sub>9</sub> > difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> > difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub> > difenil(glutamato-O,N)borano, FD<sub>1</sub> > difenil(tirosinato-O,N)borano, FD<sub>10</sub>. Para *Sorghum halepense* (figura 15), el difenil(lisinato-O,N)borano, FD<sub>2</sub> > difenil(glicinato-O,N)borano, FD<sub>3</sub> > difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub> > difenil(leucinato-O,N)borano, FD<sub>4</sub> > difenil(glutamato-O,N)borano, FD<sub>1</sub> > difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> > difenil(tirosinato-O,N)borano, FD<sub>10</sub> > difenil(aspartato-O,N)borano, FD<sub>8</sub>. Y para *Physalis ixocarpa* (figura 16), encontramos que el difenil(fenilglicinato-O,N)borano, FD<sub>9</sub> > difenil(tirosinato-O,N)borano, FD<sub>10</sub> > difenil(leucinato-O,N)borano, FD<sub>5</sub> > difenil(metionato-O,N)borano, FD<sub>6</sub> > difenil(prolinato-O,N)borano, FD<sub>12</sub> > difenil(serinato-O,N)borano, FD<sub>11</sub> > difenil(isoleucinato-O,N)borano, FD<sub>4</sub> > difenil(treoninato-O,N)borano, FD<sub>7</sub>; el orden en el que se



dan los compuestos es en base a los valores de  $I_{50}$  que presentan para cada caso en la tabla 8 y se dan de mayor efecto y menor concentración a menor efecto. Los valores de desviación estándar encontrados para cada concentración utilizada en los compuestos no se traslapan entre las diferentes concentraciones empleadas. Se calculó el  $I_{50}$  que se refiere a la concentración de compuesto necesaria para inhibir el 50% de la germinación de semillas. El significado de  $I_{50}$  es el siguiente entre más activo es el compuesto menos es la concentración requerida para inhibir en un 50% la germinación. Para los compuestos anteriormente mencionados encontramos que el compuesto empieza a tener un efecto inhibitorio a bajas concentraciones y que se va incrementando al aumentar la concentración. Para los compuestos que no aparecen nombrados en el efecto a la germinación es porque sus concentraciones no alcanzan a inhibir 50% de la germinación. Los resultados muestran que cada compuesto presenta un comportamiento individual al inhibir la germinación de diferentes semillas.

COMPUESTO	<i>Sorghum halepense</i>	<i>Triticum vulgare</i>	<i>Physalis ixocarpa</i>
FD <sub>1</sub>	840	960	-
FD <sub>2</sub>	650	490	-
FD <sub>3</sub>	740	350	-
FD <sub>4</sub>	-	-	490
FD <sub>5</sub>	800	-	280
FD <sub>6</sub>	-	-	320
FD <sub>7</sub>	840	650	500
FD <sub>8</sub>	1100	-	-
FD <sub>9</sub>	-	510	250
FD <sub>10</sub>	990	1000	270
FD <sub>11</sub>	890	560	400
FD <sub>12</sub>	-	-	330

Tabla 8. Valores de  $I_{50}$  ( $\mu$ M) de las boroxozalidonas en la germinación de *Sorghum halepense*, *Triticum vulgare* y *Physalis ixocarpa*. Los compuestos que no tienen valor de  $I_{50}$ , es porque a las concentraciones usadas no inhibió 50% de la germinación de las semillas.

La inhibición de la germinación se puede deber al afectar múltiples eventos tales como: el transporte de iones, síntesis de proteínas, desactivación de hormonas y metabolismo energético celular. En base a la baja actividad que presentan estos compuestos sobre la germinación, principalmente en las malezas (*Sorghum halepense*); podemos sugerir que presentan mecanismos de inactivación metabólica, método por el que algunas plantas se protegen del efecto de triazinas (Schneegeurt, 1994).

A pesar de que el Boro y sus compuestos derivados tienen un efecto tóxico sobre plantas se ha encontrado que su toxicidad es reducida por la formación de complejos borato-azúcar (Yokota,

1990). La formación de complejos asimilables por los organismos permite que los complejos de Boro sean utilizados como herbicidas, como en el caso de estas boroxalidonas, o insecticidas ya que la toxicidad, puede disminuir en relación a la estructura. (Woods, 1994)

Aunque los rangos de toxicidad del boro, varían de especie a especie (Fox, 1989; Nohel, 1988; Picchioni, 1991; Francois, 1991). En otros casos, las plantas son menos sensibles a la acción del herbicida porque disminuye la sensibilidad de los sitios de acción, como sucede con los ariloxifenoxipropionatos y ciclohexanedionas. Otros métodos concebibles incluyen la disminución de la asimilación o acumulación del compuesto, o en una disminución del número de sitios de unión potenciales del herbicida (Sehnegurt, 1994).

En *Physalis ixocarpa* (figura 17) apreciamos que aunque no se inhibe la germinación completamente, sí la continuación de la elongación tanto de la raíz como la del tallo. El efecto de los compuestos probablemente es la disminución de *de novo* de la síntesis de nucleótidos, ya que el crecimiento de la plántula experimenta una rápida división celular y este período necesita de la síntesis de ATP, nucleótidos, etc., por una vía intermediaria de nucleótidos-glucosílicos, de gran cantidad de polisacáridos, material necesario para la pared celular (Mangat, 1979). O bien por algún otro proceso de postgerminación como la síntesis de ADN, ARN o proteínas, necesarias para la continuación del desarrollo de la planta.

Algunos otros herbicidas, colapsan el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática ya sea directamente por el transporte de electrones a través de la membrana o por interacción con alguna proteína específica de membrana. De acuerdo a esta hipótesis el colapso del gradiente de protones es fitotóxico porque altera la regulación del movimiento de solutos en la célula y también agotan el ATP de la célula (Gronwald, 1993).

6.6. SELECTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS DE DIFENIL BORANO EN SU ACTIVIDAD HERBICIDA DE PREEMERGENCIA.

COMPUESTO	EFEECTO EN:	SELECTIVIDAD
FD <sub>1</sub>	monocotiledoneas	selectivo
FD <sub>2</sub>	monocotiledoneas	selectivo
FD <sub>3</sub>	monocotiledoneas	selectivo
FD <sub>4</sub>	dicotiledoneas	selectivo
FD <sub>5</sub>	monocotiledoneas y dicotiledoneas	no selectivo
FD <sub>6</sub>	dicotiledoneas	selectivo
FD <sub>7</sub>	monocotiledoneas y dicotiledoneas	no selectivo
FD <sub>8</sub>	monocotiledoneas y dicotiledoneas	no selectivo
FD <sub>9</sub>	monocotiledoneas y dicotiledoneas	no selectivo
FD <sub>10</sub>	monocotiledoneas y dicotiledoneas	no selectivo
FD <sub>11</sub>	monocotiledoneas y dicotiledoneas	no selectivo
FD <sub>12</sub>	dicotiledoneas	selectivo

Tabla. 9. Selectividad de las boroxozalidonas en las semillas de monocotiledoneas y dicotiledoneas en la caracterización de su efecto preemergente.

En base a los resultados analizados en la respiración y germinación de semillas de monocotiledónea y dicotiledóneas encontramos que los complejos de difenil borano presenta cierta selectividad para monocotiledóneas y dicotiledóneas aunque también se presenta un efecto no selectivo es decir afectan ambos tipos (tabla 9) En la actividad evaluada de preemergencia se encontró que los compuestos presentan una preferencia en afectar a las semillas de monocotiledoneas y dicotiledoneas, como ejemplo tenemos al FD<sub>3</sub>, FD<sub>7</sub>, FD<sub>8</sub>, FD<sub>9</sub>, FD<sub>10</sub> y FD<sub>11</sub>, mientras que se apreció una selectividad para monocotiledoneas por parte de FD<sub>1</sub>, FD<sub>2</sub> y FD<sub>3</sub> ya que inhibieron preferentemente al *Sorghum halepense* y *Triticum vulgare* mientras que para el FD<sub>4</sub>, FD<sub>6</sub> y FD<sub>12</sub> afecto a *Physalis ixocarpa*, (dicotiledonea).

La selectividad (tabla 9) y potencia de actividad en la respiración (tabla 6) permite reconocer el modo de acción de los compuestos en semillas y cual es el más adecuado para usarlo contra algún tipo específico de malezas.

*Triticum vulgare*

DPHB,

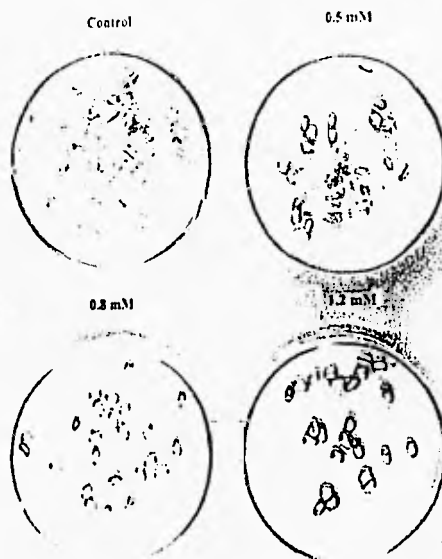


Figura 14. Efecto del difenil(glicinato-O,N)borano,  $FD_3$  en la germinación de *Triticum vulgare*. Este compuesto con mayor efecto en la germinación de esta semilla. Se colocaron 25 semillas en cada caja y la observación corresponde a los 4 días.

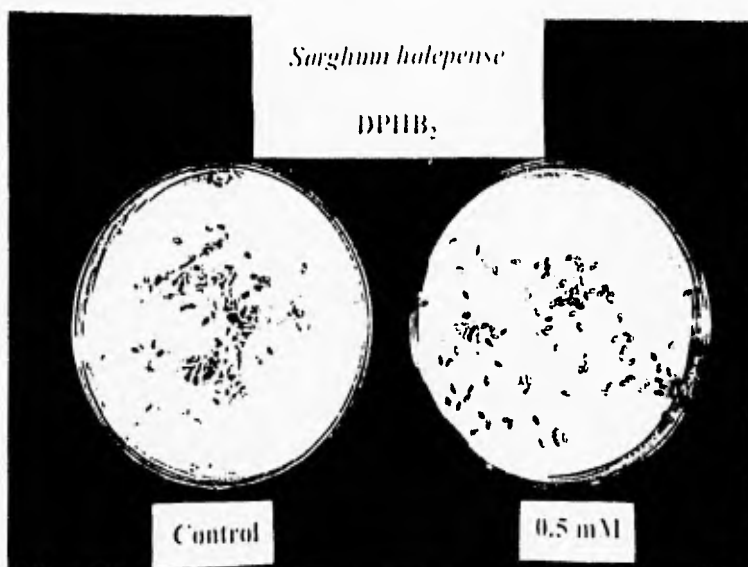


Figura 15. Efecto del difenil(lisinato-O,N)borano, FD<sub>2</sub> en la germinación de *Sorghum halepense*. Este compuesto afecta de manera potente la germinación de esta semilla. Se colocaron 100 semillas y se observaron al cuarto día.

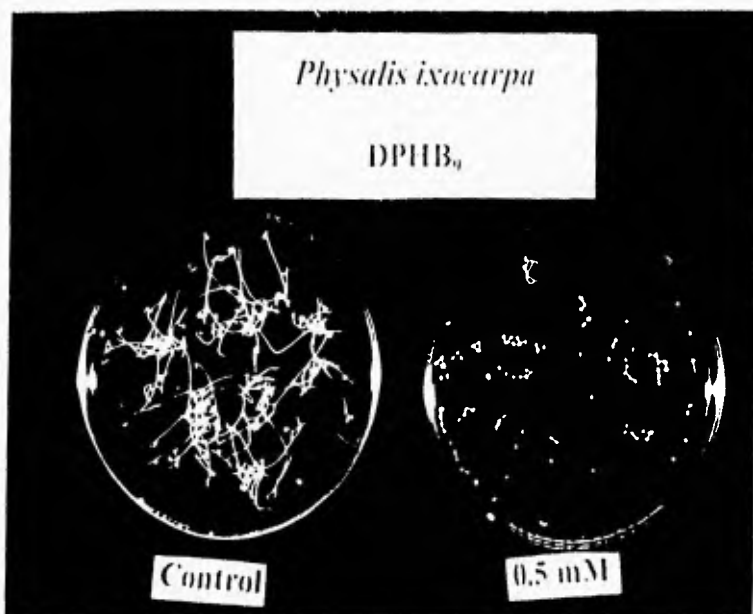


Figura 16. Efecto del difenil(fenilglicinato-O,N)borano, FD<sub>9</sub> en la germinación de *Physalis ixocarpa*. Este compuesto presenta un efecto potente en la inhibición de la germinación de esta semilla. El número de semillas fue de 100 de acuerdo a material y métodos.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

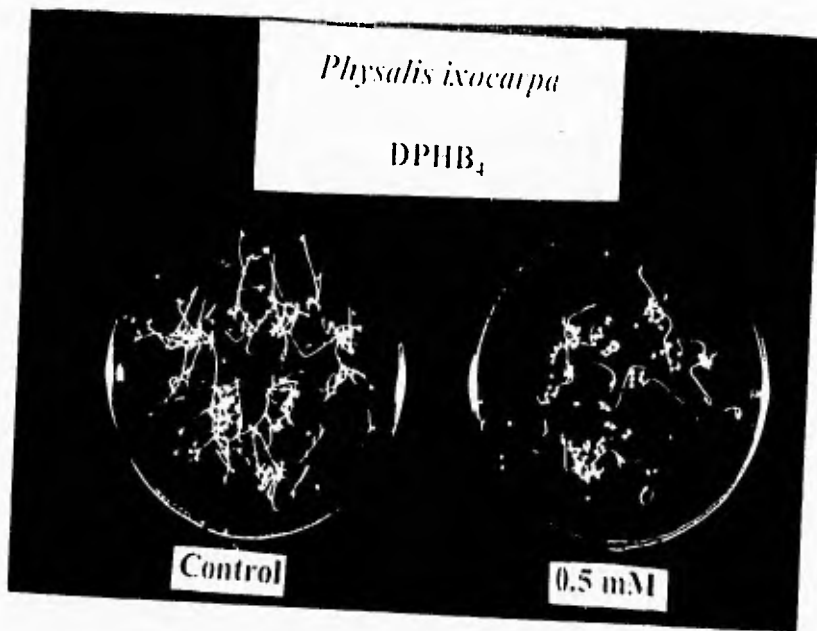


Figura 16. Efecto del difenil(isoleucinato-O,N)borano, FD<sub>4</sub> en la germinación de *Physalis ixocarpa*. Presenta una inhibición en la continuación del desarrollo de la planta a .5 mM. Condiciones en material y métodos.

## 7. CONCLUSIONES:

En la fotosíntesis el compuesto difenil(lisinato-O,N)borano  $FD_2$  que presenta  $-NH_2$  en su estructura es inhibidor de la reacción de Hill en cloroplastos de chicharo y específicamente inhibe el complejo EOC, del Fotosistema II; (Van Assche, 1982).

Por otra parte los complejos difenil(glutamato-O,N)borano, difenil(glicinato-O,N)borano, difenil(treoninato-O,N)borano, difenil(aspartato-O,N)borano, son inhibidores de la transferencia de energía e inhiben a la  $H^+$  ATPasa. Su actividad probablemente este relacionado con los grupos  $-COOH$ ,  $-H$ ,  $-CH_3$  que contienen en su estructura. (Trebst, 1978, Trebst, 1984 y Miyoshi, 1990).

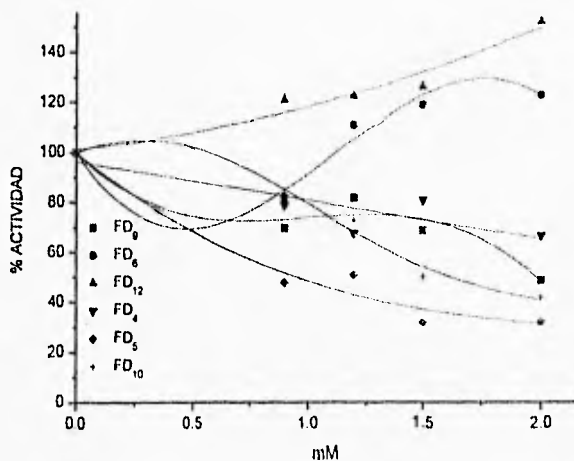
El difenil(serinato-O,N)borano es un desacoplante débil, el cual tiene un sustituyente  $-OH$  en su estructura.

Los difenil(isoleucinato-O,N)borano, difenil(leucinato-O,N)borano, difenil(metionato-O,N)borano, difenil(fenilglicinato-O,N)borano, difenil(tirosinato-O,N)borano, difenil(prolinato-O,N)borano, presentan efecto mínimo en la fotosíntesis.

En los ensayos para evaluar su actividad de herbicida preemergente, las boroxozalidonas se probaron en la respiración y germinación de dos especies de monocotiledoneas (trigo y zacate Jhonson) y una especie de dicotiledonea (tomate). De todas las boroxozalidonas probadas el difenil(glutamato-O,N)borano, difenil(lisinato-O,N)borano y difenil(glicinato-O,N)borano causaron un efecto inhibitorio en respiración y germinación de monocotiledoneas; mientras que la respuesta de monocotiledoneas para el difenil(isoleucinato-O,N)borano, difenil(metionato-O,N)borano y difenil(prolinato-O,N)borano fue menor comparado al que presento a la dicotiledonea en los procesos evaluados, que fue mayor. Mientras que el difenil(leucinato-O,N)borano, difenil(treoninato-O,N)borano, difenil(aspartato-O,N)borano, difenil(fenilglicinato-O,N)borano, difenil(treoninato-O,N)borano y difenil(serinato-O,N)borano inducen una inhibición tanto de la respiración y germinación del trigo, zacate Jhonson y tomate.



### 8. APENDICE:



Efecto de los compuestos difenil(isoleucinato-O,N)borano FD<sub>4</sub>, difenil(leucinato-O,N)borano FD<sub>5</sub>, difenil(metionato-O,N)borano FD<sub>6</sub>, difenil(fenilglicinato-O,N)borano FD<sub>9</sub>, difenil(tirosinato-O,N)borano FD<sub>10</sub>, difenil(prolinato-O,N)borano FD<sub>12</sub> en la fotosíntesis. Los compuestos antes mencionados, presentaron poco efecto de inhibición en las actividades de la fotosíntesis; en relación a los demás. (Desviación estándar máximo 3.4). Ver resultados y discusión.

## 8. LITERATURA CONSULTADA

1. Albores-Velasco, M., Lotina-Hennsen, B., Zapien, A., González, G. y Migueles, L. 1986. Structure-activity relationship studies of dibromo phenolic derivatives as photosynthetic electron chain inhibitors. *Pestic. Sci.* 17:396-402.
2. Arnon, D. I. 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
3. Bergmeyer., *Methods y Enzymatic Alalysis*. Vol VII. U.D. 1985.
4. Berkaloff., *Biología y Fisiología Celular*, Vol. III, Omega, Barcelona, 1893.
5. Bewley J. D. y Michael B., *Seeds*, Plenum Press. London, 1994.
6. Bradbeer, J. W., *Seed Dormancy and germination*, Bsc, PhD, Dsc. Blacic academic & professional, London. 1992.
7. Darnell, J.E., Lodish, H., Baltimore, D. *Molecular cell biology*. Scientific American Books. United States of America. 1990.
8. Dilley, R. A. Ion Transport. *Methods in Enzymology*. XXIV(B):64-68 (San Pietro, A. de) Acad. Press. Nueva York. 1972.
9. Farfán, N., Silva, D. y Santillan, R. 1993. NMR studies of 1,1-Diphenylboroxazolidone derivatives of  $\alpha$ -aminoacids. *Heteroatom. Chemistry*. 4:1-4.
10. Fuerst, E. P. y Norman, A. M. 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science*. 39:458-464.
11. Francois, L.E. 1991. Yield and Quality Responses of Garlic and Onion to Excess Boron. *HortScience*, 26(5):547-549.
12. González, V. J. G. *Herbicidas Inhibidores de la fotosíntesis*. Tesis de Licenciatura. UNAM.1981.
13. Good, N. E.. *Enciclopedia of Plant Physiology*. New Series, vol. 5:429-436 (trebs, A y Avron, M. eds.) Springer-Verlag. Berlin, Nueva York. 1977.
14. Gronwald, J. W. 1993. Interactions of herbicide with membranes. *Papers Plant ScienceResearch Unit.*, pp. 254 Presented during the WSSA annual meeting in Denver. Colorado, as a symposium of section X-physiology.

15. Hall, D.O. En topics in Photosynthesis Vol. 1 (Baber, J. de) Elsevier North-Holland, Londres, 1976.
16. Hansson, O. y Wydrzynski, T. 1990. Current perceptions of photosystem II. *Photosynthesis Research*. 23:131-162.
17. Hartmann T. H. et. al., Plant Science growth, development and utilization of cultivated plants. Prentice Hall, 1988.
18. Hipkins, M. F. y Baker, N. R., Photosynthesis transduction a practical approach. IRL Press. Oxford, Washington, 1986.
19. Horak, J. M. y Sweat, K. J. 1994. Germination, emergence and seedling establishment of Buffalo gourd (*Curcubita foetidissima*). *Weed Science*. 42:358-363.
20. Izawa, S y Pan, R. L. 1978. Photosystem I electron transport and phosphorylation supported by electron donation to the plastoquinone region. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 83:1171-1177.
21. Izawa, S, Encyclopedia of plant physiol. New Series. Vol 5: 226-282. (Trebs, A., y Avron, M. eds.) Springer-Verlag. Berlin, Nueva York. 1977.
22. Izawa, S. y Good, N. E. 1972. Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Methods in Enzymology*. XXIV: 2:355-377.
23. Izawa, S., Winget, D. G. y Good, N. E. 1966. Phlorizin. a specific inhibitor of photophosphorylation and phosphorylation-coupled electron transport in chloroplasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 22:223-226.
24. Klingman, G. C. y Ashton, F. M., Estudio de las plantas nocivas. Linusa, México, 1984.
25. Linscott, D.L., Handbook of Pest Management in Agriculture, Vol 3: 75-112 (Pimentel, D. de.) CRC Press. Florida USA. 1981.
26. Lotina-Hennsen, B., Albores-Velasco, M. y García, Ch. L. 1989. Herbicidas y productividad agrícola. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 33:109-117.
27. Mangat, B. S. 1979. The effect of Diuron on the soluble nucleotide pool and growth of bean and corn seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 10:251-258.
28. Mathis, P. y Rutherford, A. W. 1984. Effect of phenolic herbicides on the oxygen-evolving side of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 767:217-222.
29. Mc Carty, R. E. 1977. Energy transfer inhibitors of photophosphorylation in chloroplasts. *Enciclopedia of Plant Physiol.* New Series. 5: 436-447.

30. Mills, J. D., Mitchell, P. y Schurmann, P. 1980. Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS LETTERS*. 112:173-177.
31. Miyoshi, H., Tsujishita, H., Tokutake, N y Fujita, T. 1990. Quantitative analysis of uncoupling activity of substituted phenols with a physicochemical substituent and molecular parameters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1016: 99-106.
32. Montgomery, R., Bioquímica, Mosby-Year Book Wolfe Publishing, México, 1993.
33. Moreland, D. E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31:597-638.
34. Moreno, M. E., Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Instituto de Biología, UNAM, 1984.
35. Nable, R. O. 1988. Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: A preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant and Soil*, 112: 45-52.
36. Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. Bioenergetics. Academic Press. San Diego. 1992.
37. Oetmeier, W. y Renger, G. 1980. The function of diphenylamines as modifiers of photosystem II electron transport in isolated spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 593:113-124.
38. Peña, V. C. y Lotina, H. B. 1989. H<sup>+</sup>-ATPasa (Cl<sub>0</sub>-Cl<sub>1</sub>) de cloroplastos. *Biol. Educ. Bioquim.* 8:52-61.
39. Peter D. Principles and practices of Plants Science. Prentice Hall. 1988.
40. Picchioni, G. A. y Miyamoto, S. Boron uptake and effects on growth and carbohydrate partitioning of pistachio seedlings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(4):706-711.
41. Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. Biology of plants. Worth Publishers. New York. 1992.
42. Romero, M. A., James, M. G., Mirantones, F. B. y Haro, C. J. 1995. Síntesis de herbicidas y pruebas biológicas para determinar su actividad sobre maleza. *Rev. Soc. Quím. Mex.* # 1. 39:15-23.
43. Schneegurt, A. M., Heim, R. D. y Larrinua, M. I. 1994. Investigation into the mechanism of isoxaben tolerance in dicot weeds. *Weed Science*. 42:163-167.
44. Schon, K. M., Novacky, A. y Blevins, G. D. 1990. Boron induces hyperpolarization of sunflower root cell membranes and increases membrane permeability to K<sup>+</sup>. *Plant Physiol.* 93:556-571.

45. Serrano, R. y Villalba, J. M. 1993. Bomba de protones de la membrana vegetal. *Investigación y Ciencia*. # 196,62-69.
46. Shewry, P. R., Napier, J. A. y Tatham, A. S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*. 7:945-956.
47. Siedow, J. N. y Umbach, A. L. 1995. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *The Plant Cell*. 7:821-831.
48. Strobel, G. A. 1991. Control biológico de malas hierbas. *Investigación y Ciencia*. #180,52-58.
49. Sumer, S. 1974. Scientific apparatus and laboratory methods a method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science*. 100: 413-415.
50. Trautschold, I., Lamprecht, W., Schweitzer, G. 1985. UV-method with Hexokinase and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. In: *Methods y Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer, H. U., de), pp 346-357, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press. New York.
51. Trebst, A. 1972. Measurement of Hill Reactions and photoreduction. *Methods in Enzymology*. XXIV: 146-165.
52. Trebst, A. y Draber, W. 1978. Structure activity correlations of recent herbicides in photosynthetic reactions. In: *Advances in pesticide science, Part 2* (Geissbühler, H., Brooks, G. T. y Kearney, P. C. eds.), pp 223-234, Pergamon Press.
53. Trebst, A., 1984, Structure activity correlation of herbicides affecting plastoquinone reduction by photosystem II: Electron density distribution in inhibitors and plastoquinone species. *Z Naturforsch*, 39C 405-411.
54. Upadhyaya, K. M. 1986. Effects of salicylhydroxamate on respiration, seed germination and seedling growth in *Avena fatua*. *Physiol. Plant*. 67:43-48.
55. Van Assche, J. C. y Carles, P. M. 1982. In: *Biochemical Responses Induced by Herbicides*. ACS symposium Series 181 (Moreland, D. E., St. Jhon, J. B. and Hess, F. D., eds.), pp 1-21, American Chemical Society, Washington D.C.
56. Woods, W. G. 1994. An introduction to Boron: History, Sources, Uses, and Chemistry. *Environmental Health Perspectives*. 102(Suppl 7):5-11.
57. Wilen, R. W., Ewan, B. E. y Gusta, L. V. 1994. Interaction of abscisic acid and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance. *Can. J. Bot.* 72:1009-1017.

- 58. Yamashita T. and Warren, L. B. 1968. Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts. *Plant Physiol.* 43: 332-346.
- 59. Yokota, H. y Konishi, S. 1990. Effect of the formation of a sugar-borate complex on the growth inhibition of pollen tubes of *Camellia sinensis* and cultured cells of *Nicotiana tabacum* by toxic level of borate. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 36:275-281.