



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

Determinación de la reactividad mediante DFT del fenoxiherbicida 2,4-D y sus efectos *in vitro* en el modelo *Arabidopsis thaliana*.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA

ADRIAN GUSTAVO BADILLO MORALES

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Luisa Roxana Licona Ibarra

ASESORA DE TESIS

Dra. Laura Morales Lara

ASESOR TÉCNICO

Dr. Ricardo Darío Peña Moreno

MARZO 2023

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Luisa Roxana Licona Ibarra, por introducirme a la química cuántica, logrando que me apasionara este tema, además de ser una gran persona conmigo en todo momento. A la Dra. Laura Morales Lara y el Dr. Ricardo Darío Peña Moreno, quienes me orientaron y apoyaron para la elaboración de este trabajo de investigación, les tengo mucha estima y cariño por lo que han hecho por mí.

A los sinodales: la Dra. Fabiola Gabriela Nieto Caballero, el Dr. Armando Mena Contla y el Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes por la revisión, corrección y retroalimentación para mejorar esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Químicas por el equipo y el espacio proporcionado.

Al Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes por haberme proporcionado el material necesario para hacer posible el estudio *in vitro*.

A los miembros del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, en especial a: Sofía Angélica García Vargas, por enseñarme técnicas experimentales, además de siempre estar abierta cuando requería orientación y ser una excelente amiga. Paloma Montserrat Rosas Licona, por explicarme temas biológicos asociados al estudio en plantas, pero también por el apoyo y cariño que me ha brindado para ser un mejor estudiante y persona. Jessica Alejandra Linares González, Karla Del Razo López y a Teresa de Jesús Larios Pachuca por la revisión en la redacción de esta tesis, y los buenos momentos que pasamos durante mi estancia en su grupo de investigación.

Para Liliana Dinorah Pérez Lima Ponce y a Estefanía del Alba Lizama García por ser un soporte fundamental durante mi vida académica y su amistad incondicional en el transcurso de la carrera.

A Karen Myrshanel Gil Linares, María Fernanda Barrientos Carrasco, Victoria Cruz Romano y Leonardo Brayan Acevedo Meza por su increíble amistad durante la licenciatura.

DEDICATORIA

A mi familia.

Principalmente a mis padres Francisco Erasmo Badillo Cisneros y Leticia Morales Pérez, a mis hermanas Beatriz Badillo Morales y Daniela Badillo Morales. Que me han apoyado en todo momento, gracias por enseñarme a no rendirme y luchar por mis sueños.

ÍNDICE

I.	INDICE DE FIGURAS.....	6
II.	ÍNDICE DE TABLAS.....	9
III.	RESUMEN.....	10
1.	INTRODUCCIÓN	11
2.	ANTECEDENTES	12
3.	MARCO TEÓRICO	13
3.1	Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....	13
3.1.1	Propiedades químicas y físicas del herbicida 2,4-D	14
3.2	Ácido indol-3-acético	15
3.2.1	Propiedades físicas y químicas del ácido indol-3-acético.....	16
3.3	Efecto del 2,4-D en las plantas	17
3.4	Mecanismo de entrada del 2,4-D y el IAA a la célula vegetal	18
3.5	Interacción de la auxina y el 2,4-D en el complejo proteico TIR1-ASK1	19
3.6	<i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo.....	20
3.7	Clorofila e inhibición de la fotosíntesis en presencia del herbicida 2,4-D.....	21
4.	JUSTIFICACIÓN	22
5.	OBJETIVOS.....	23
5.1	OBJETIVO GENERAL	23
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6.	METODOLOGÍA.....	24
6.1	Cálculos teóricos.....	24
6.1.1	Aproximaciones utilizadas en cálculos teóricos.....	24
6.1.2	Teoría de los Orbitales Frontera (TOF).....	24
6.1.3	Descriptores de la reactividad global	25

6.1.4 Descriptores de la reactividad local.....	26
6.1.5 Descripción de la proteína TIR1-ASK1	27
6.2 Estudio <i>in vitro</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
6.2.1 Preparación del medio MS para el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
6.2.2 Tratamiento agudo con 2,4-D en <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
6.2.3 Tratamiento crónico con 2,4-D en <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
6.2.4 Determinación de la clorofila como biomarcador	29
6.3 Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1 Determinación de la estructura molecular y la reactividad del 2,4-D y el IAA.....	30
7.2 Evaluación de la capacidad inhibitoria del herbicida 2,4-D en <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
7.2.1 Evaluación de la CE ₅₀ del 2,4-D de un herbicida comercial en <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
7.2.2 Determinación de la concentración de clorofila en <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
8. CONCLUSIONES.....	73
9. BIBLIOGRAFÍA.....	75

I. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Figura 2. Estructura molecular del ácido indol-3-acético

Figura 3. Formas de aplicación del herbicida 2,4-D y su absorción en la planta

Figura 4. Vías de transporte de auxinas en una célula vegetal

Figura 5. Cavidad hidrofóbica del TIR1 con IAA y el 2,4-D

Figura 6. Ilustración de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*

Figura 7. Sitios de interacción del 2,4-D en el complejo TIR1-ASK, los enlaces de hidrógeno se muestran con las líneas verdes discontinuas

Figura 8. Residuos de la proteína TIR1-ASK que interactúan con el ligando IAA, los enlaces de hidrógeno se muestran con las líneas verdes discontinuas

Figura 9. Estructura molecular del ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Figura 10. Estructura molecular del ácido indol-3-acético

Figura 11. Superposición estructural del 2,4-D tomada del cristal en azul y del complejo proteico

Figura 12. Superposición estructural del IAA, tomada del cristal en azul y del complejo proteico

Figura 13. Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del 2,4-D aislado de la estructura cristalina

Figura 14. Funciones de Fukui del 2,4-D aislado de la estructura cristalina A) f^+ , B) f^- , C) f^0

Figura 15. Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del IAA aislado de la estructura cristalina

Figura 16. Funciones de Fukui del IAA aislado de la estructura cristalina A) f^+ , B) f^- , C) f^0

Figura 17. Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del 2,4-D extraída del complejo proteico TIR1-ASK1

Figura 18. Funciones de Fukui del 2,4-D extraído del complejo proteico TIR1-ASK1 A) f^+ , B) f^- , C) f^0

Figura 19. Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del IAA extraída del complejo proteico TIR1-ASK1

Figura 20. Funciones de Fukui del IAA extraído del complejo proteico TIR1-ASK1 A) f^+ , B) f^- , C) f^0

Figura 21 Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del 2,4-D con los aminoácidos que interacciona en el complejo proteico TIR1-ASK1

Figura 22. Funciones de Fukui del 2,4-D con los aminoácidos que interacciona con el complejo proteico

Figura 23. Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del IAA con los aminoácidos que interacciona en el complejo proteico TIR1-ASK1

Figura 24. Funciones de Fukui del IAA con los aminoácidos que interacciona con el complejo proteico TIR1-ASK1 A) f^+ , B) f^- , C) f^0

Figura 25. La interacción de los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1 con el 2,4-D

Figura 26. La interacción de los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1 con el IAA

Figura 27. Determinación de la CE50 del 2,4-D de un herbicida comercial

Figura 28. Contenido de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento

Figura 29. Contenido de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento

Figura 30. Contenido de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento

Figura 31. Determinación de la concentración de la clorofila a 7, 14 y 21 días a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D

Figura 32. Matriz de correlación de forma gráfica de la concentración de la clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento

Figura 33. Matriz de correlación de forma gráfica de la concentración de la clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento

Figura 34. Matriz de correlación de forma gráfica de la concentración de la clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento

Figura 35. Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en *Arabidopsis thaliana* durante 7 días de tratamiento obtenidas con Cooling Tech

Figura 36 Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en *Arabidopsis thaliana* durante 7 días de tratamiento obtenidas con Primo Star

Figura 37. Matriz de correlación de forma gráfica de parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento

Figura 38. Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en *Arabidopsis thaliana* durante 14 días de tratamiento obtenidas con Cooling Tech

Figura 39. Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en *Arabidopsis thaliana* durante 14 días de tratamiento obtenidas con Primo Star

Figura 40. Matriz de correlación de forma gráfica de parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento

Figura 41. Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en *Arabidopsis thaliana* durante 21 días de tratamiento obtenidas con Cooling Tech

Figura 42. Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en *Arabidopsis thaliana* durante 21 días de tratamiento obtenidas con Primo Star

Figura 43. Matriz de correlación de forma gráfica de parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del 2,4-D

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del IAA

Tabla 3. Aminoácidos que interaccionan con el 2,4-D y el IAA en el complejo TYR1-ASK, en verde se marcan los aminoácidos marcados por el PDBsum.

Tabla 4. Reactividad del 2,4-D aislado del cristal.

Tabla 5. Reactividad del IAA aislado del cristal.

Tabla 6. Reactividad del 2,4-D aislado del complejo proteico TIR1-ASK1.

Tabla 7. Reactividad del IAA aislado del complejo proteico TIR1-ASK1.

Tabla 8. Reactividad del 2,4-D interaccionando con los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1.

Tabla 9. Reactividad del IAA interaccionando con los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1

Tabla 10. Reactividad global del 2,4-D extraído del cristal, del complejo proteico y la interacción con los aminoácidos del TIR1-ASK1.

Tabla 11. Reactividad global del IAA extraído del cristal, del complejo proteico y la interacción con los aminoácidos del TIR1-ASK1

III. RESUMEN

El control de maleza en los cultivos requiere que los agricultores empleen herbicidas, los cuales, debido a su composición química, actúan como disruptores endocrinos causantes de toxicidad en las plantas. Existen herbicidas que imitan el efecto de las auxinas naturales, como es el caso del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) considerado como un herbicida clorofenoxi. Debido a los efectos inducidos a nivel molecular se han buscado mecanismos que permitan comprender la reactividad de este tipo de compuestos. Así, los descriptores de reactividad globales y locales calculados en este trabajo mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT por sus siglas en inglés) permitieron comprender la relación entre estructura, estabilidad y reactividad de 2,4-D y de la auxina natural ácido indol-3-acético (IAA) en diferentes sistemas (cristalino y proteico TIR1-ASK1) demostrando que el 2,4-D presenta una mayor reactividad global en el sistema proteico mismas que pudieron relacionarse con los efectos de este herbicida sobre la morfología y producción de clorofila en el cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* mismos que se analizaron estadísticamente demostrando que el aumento de la concentración del 2,4-D presenta un efecto negativo tanto en la producción de clorofila, así como en la alteración morfológica.

1. INTRODUCCIÓN

La problemática actual sobre el uso constante del herbicida 2,4-D se debe a su alta efectividad para el control de la maleza en los diferentes tipos de cultivos como trigo, maíz y arroz a un bajo costo, por lo que el uso constante de dicho herbicida hormonal ha estado ocasionando un gran impacto ecotoxicológico afectando principalmente a los ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos, así como los organismos que lo conforman. El presente trabajo tiene el objetivo determinar y analizar las estructuras del herbicida 2,4-diclorofenoxyacetico (2,4-D) y la auxina natural ácido indol-3-acético (IAA), así como sus efectos *in vitro* en *Arabidopsis thaliana*.

Los objetivos de esta investigación son, comparar la estructura del 2,4-D y la auxina natural IAA cuando se encuentran en forma cristalina y en el complejo proteico TIR1-ASK1, calcular y analizar la estructura electrónica del ácido 2,4-diclorofenoxyacético y el ácido indol-3-acético mediante el uso de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), del mismo modo determinar la reactividad del 2,4-D y el IAA a partir de descriptores locales y globales, la evaluación de la capacidad inhibitoria del herbicida 2,4-D sobre parámetros fisiológicos en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, así como el análisis estadístico de los efectos herbicidas del 2,4-D sobre el desarrollo fisiológico en *Arabidopsis thaliana*.

Se empleó la Teoría de Funcionales de la Densidad DFT (*Density Functional Theory*) para el cálculo de los descriptores de reactividad global y local del 2,4-D y del IAA. A partir de los orbitales frontera HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) y LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) se determinaron los índices de reactividad global: dureza η , blandura s , potencial químico electrónico μ y los índices de reactividad local: funciones de Fukui f^+ , f^- y f^0 . Estas últimas nos permiten determinar los sitios locales susceptibles a un ataque nucleofílico, electrofílico y por radicales libres respectivamente.

También, se llevó a cabo un estudio *in vitro*, de los efectos inhibitorios del herbicida 2,4-D en un lapso de 21 días en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sobre los parámetros fisiológicos: longitud de raíz, longitud del tallo, largo y ancho de la hoja y la determinación de la cantidad de clorofila en la plántula. Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico de los efectos del herbicida 2,4-D producidos en *Arabidopsis thaliana*.

2. ANTECEDENTES

En este trabajo se hizo un análisis bibliométrico en Scopus sobre la determinación de la reactividad mediante DFT del 2,4-D y sus efectos *in vitro* en un modelo biológico *Arabidopsis thaliana*, del cual no se encontraron resultados y por ello se realizaron dos análisis bibliométricos, el primero sobre estudios teóricos mediante la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) sobre la estructura del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el segundo sobre el 2,4-D en el complejo proteico TIR1-ASK1 en *Arabidopsis thaliana*. El primer análisis bibliométrico mostró 24 artículos científicos que abarcan del año 2007 al 2023, siendo China el país con 14 artículos relacionados con estudios teóricos mediante DFT en 2,4-D, en México se registró un artículo publicado en 2022. El contenido de estos artículos se refiere a la síntesis de compuestos inorgánicos para la degradación y/o adsorción del 2,4-D, y un artículo menciona el empleo del análisis conformacional en el modelado molecular sobre agroquímicos, mediante QSAR del 2,4-D publicado en Brasil en el año 2013.

Mientras que en el segundo análisis bibliométrico arrojó seis artículos científicos que abarca del año 2006 al 2023, los países con el mayor número de artículos registrados son Bélgica, Japón, Suecia y Estados Unidos con estudios del 2,4-D en TIR1-ASK1 en el modelo biológico *Arabidopsis thaliana*. No se registró ningún artículo publicado por grupos de investigación mexicanos, por lo que la investigación interdisciplinaria sobre la estructura del 2,4-D mediante DFT y sus efectos fisiológicos en *Arabidopsis thaliana* es necesaria, e importante ya que se encuentra poco estudiado.

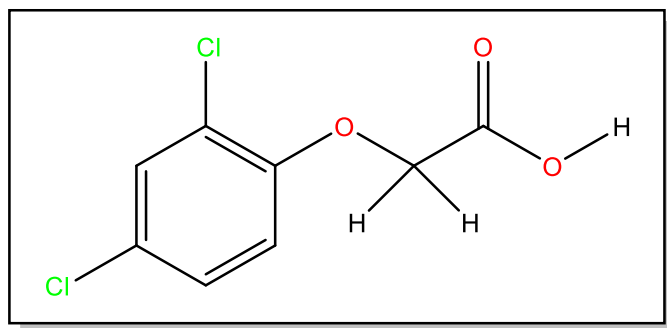
3. MARCO TEÓRICO

3.1 Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

El herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético con fórmula empírica $C_8H_6O_3Cl_2$, conocido como “2,4-D” (figura 1), es un derivado de los ácidos fenoxialcanoicos clasificados como reguladores del crecimiento vegetal que funcionan como auxinas sintéticas o herbicidas hormonales creado en 1940 (Juan *et al.*, 2021; Song, 2014; Zafra-Lemos *et al.*, 2021). Es un herbicida aniónico ampliamente utilizado en cultivos como trigo, maíz y arroz para controlar malezas de hoja ancha debido a su buena selectividad y bajo costo (Salcedo *et al.*, 2021). Debido a los bajos coeficientes de adsorción y la alta solubilidad en agua de las sales del 2,4-D, este puede migrar fácilmente a través del entorno agrícola y provocar la contaminación de las aguas subterráneas, lo que afecta la calidad del agua potable y también la salud humana (Gaultier *et al.*, 2008). Las formulaciones de sal y éster de 2,4-D se derivan de la molécula de ácido original por lo que la sal de dimetilamina (DMA) y el éster de 2-etilhexilo (EHE) son las más utilizadas en aproximadamente del 90 al 95% del uso total en todo el mundo (Islam *et al.*, 2018).

Figura 1

Estructura química del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)



Nota. Elaboración propia.

El herbicida 2,4-D puede reducir las tasas de crecimiento, inducir problemas reproductivos y producir cambios en la apariencia o el comportamiento, o podría causar la muerte de especies no objetivo, incluidas plantas, animales y microorganismos. También se le conoce como disruptor

endocrino y afecta los procesos de desarrollo incluso en bajas concentraciones (Pattanasupong et al., 2004). De acuerdo con Duke en 1996 los herbicidas alteran la fisiología de la planta, provocando un desarrollo anormal y finalmente la muerte de la planta (O., 1996). Y de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, el 2,4-D causa la muerte de las plantas de tres maneras: alterando la plasticidad de las paredes celulares, influyendo en la producción de proteínas y aumentando la producción de etileno (Sandalio *et al.*, 2016).

3.1.1 Propiedades químicas y físicas del herbicida 2,4-D

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético está conformado por un grupo fenólico con un éter unido a un ácido carboxílico y 2 halógenos que se encuentran en posición *orto* y *para* con respecto al oxígeno del éter. La estructura presenta una región hidrofóbica que está ubicada en la parte fenólica y en los dos halógenos mientras que la región hidrofílica está presente en el ácido carboxílico y el grupo éter, dichas regiones son importantes ya que, al interaccionar con los aminoácidos del complejo proteico, el 2,4-D se acomoda de acuerdo su naturaleza hidrofílica e hidrofóbica (figura 1).

El 2,4-D se presenta en forma cristalina como polvo blanco e inodoro. Su peso molecular es de 221.01 g/mol, su solubilidad en agua es baja con 569 mg/L y es altamente hidrofóbico con un valor de 2.81 en logP (coeficiente de reparto octanol-agua). El pH del 2,4-D presenta un valor de 1.4 (tabla 1).

Tabla 1

Propiedades físicas y químicas del 2,4-D

Propiedades físicas y químicas

Descripción física	Es un sólido inodoro de color blanco
Peso molecular	221.01 g/mol
Punto de fusión	140.5 °C
Punto de ebullición	160 °C
Solubilidad	569 mg L ⁻¹ en agua
pH	1.4

pka	2.8
LogP	2.81

El 2,4-D en forma de sal con la dimetilamina favorece su solubilidad, generando un medio de transporte para llevar el 2,4-D a los tejidos de las plantas. La forma de entrar a las células es atravesando la membrana plasmática y llegando al sitio de interés que es el TIR1-ASK1, donde estará ligado de una manera específica, ya que el TIR1-ASK1 presenta una región hidrofóbica e hidrofílica. Este complejo proteico acepta de manera semejante tanto a la auxina natural (IAA) como el 2,4-D (auxina sintética).

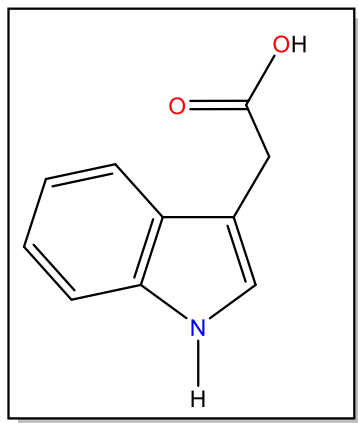
El 2,4-D tiene una estructura cristalina triclinica con un grupo espacial P-1, cuya estructura se obtuvo del Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) con código de referencia 695525 (Sieró *et al.*, 2011).

3.2 Ácido indol-3-acético

Las auxinas como el ácido indol-3-acético, con fórmula empírica $C_{10}H_9O_2N$, conocido como IAA (figura 2), regula múltiples procesos de adaptación al estrés, procesos de crecimiento y el desarrollo a lo largo del ciclo de vida de las plantas (Adamowski & Friml, 2015; Salehin *et al.*, 2015), por lo que es vital la disposición adecuada y equilibrada de la síntesis, el almacenamiento, la degradación y el transporte de auxinas. Existen mecanismos de tránsito específicos y no específicos a través de la membrana plasmática (PM), y en particular, la auxina es transportada activamente por portadores de entrada y salida para controlar el suministro espacial y temporal y asegurar un crecimiento óptimo de la planta (Adamowski & Friml, 2015).

Figura 2

Estructura química del ácido indol-3-acético (IAA)



Nota. Elaboración propia.

Las auxinas naturales como el IAA se caracterizan por ser ácidos débiles ($pK_a = 4.7$) y, como consecuencia, una proporción significativa se protona a valores de pH de apoplasto regulares de entre 4,5 y 5,5 (Kasprzewska *et al.*, 2015). Esto puede permitir que la molécula se difunda a través de la membrana plasmática, y este flujo de difusión es ampliamente reconocido, aunque la captación celular a través de las proteínas transportadoras de auxina también es necesaria y de vital importancia. El citoplasma tiene un pH cercano a la neutralidad y, a este pH, el IAA se desprotona y se vuelve aniónico, quedando atrapado en la célula por la conocida trampa de aniones, provocando que el IAA requiera de proteínas transportadoras para pasar al espacio extracelular (Sheldrake, 1974).

3.2.1 Propiedades físicas y químicas del ácido indol-3-acético

El ácido indol-3-acético está conformado por un indol que es un compuesto orgánico heterocíclico, dicha estructura bicíclica consiste en un benceno unido a un pirrol (anillo de 5 miembros con el átomo de nitrógeno como heteroátomo) y un ácido carboxílico en la posición 3 del pirrol (figura 2). La estructura tiene una región hidrofóbica que está ubicada en la parte bicíclica y una región hidrofílica en el ácido carboxílico. Dichas regiones son importantes ya que al interactuar el IAA

con los aminoácidos del complejo proteico este se acomoda de acuerdo a su naturaleza hidrofílica e hidrofóbica (Tan *et al.*, 2007).

En la tabla 2 se presentan las propiedades físicas del IAA, este es un sólido en forma de polvo escamoso de color canela claro a rosa claro, no presenta olor, su peso molecular es 175.18 g/mol, su solubilidad en agua es de 1.38 g/L por lo que tiene carácter hidrofóbico presentando un valor de logP de 1.41 siendo menos hidrofóbico que el 2,4-D. El pH del IAA es de 1.4.

Tabla 2

<i>Propiedades físicas y químicas del IAA</i>	
Propiedades físicas y químicas	
Descripción física	Sólido inodoro en forma de polvo escamoso de color canela
Peso molecular (g/mol)	175.18 g/mol
Punto de fusión (°C)	168.5 °C
Punto de ebullición (°C)	415 °C
Solubilidad en agua	1.38 g L ⁻¹
pH	1.4
pka	4.7
LogP	1.41

El IAA tiene una estructura cristalina monocíclica con un grupo espacial P2₁/C y cuya estructura se obtuvo del Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) con código de referencia 141657 (Nigović *et al.*, 2000).

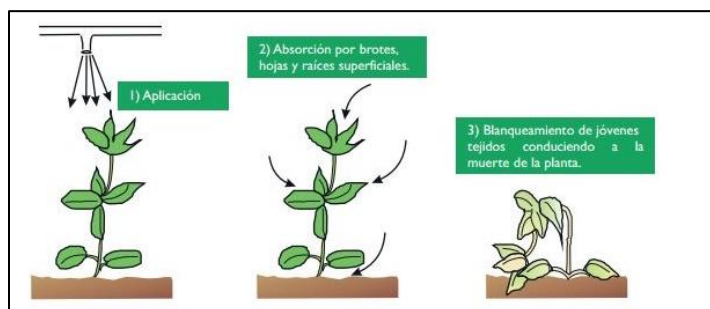
3.3 Efecto del 2,4-D en las plantas

El herbicida 2,4-D comercial se aplica al cultivo en forma de rocío (figura 3) en un tiempo prolongado y en ciertas épocas del año dependiendo el tipo de cultivo. Cuando es aplicado en altas concentraciones el 2,4-D se absorbe a través de las raíces, tallos y hojas donde se transloca a los

meristemas de la planta (Munro *et al.*, 1992). Las raíces se engrosan y se atrofian, el floema y el xilema en el tallo se desintegran o se bloquean y cesa el crecimiento de las hojas. Se produce un crecimiento descontrolado e insostenible, que provoca el enrollamiento del tallo, el marchitamiento de las hojas, disminución del tamaño de la raíz y, finalmente la muerte de la planta (Song, 2014).

Figura 3

Formas de aplicación del herbicida 2,4-D y su absorción en la planta.



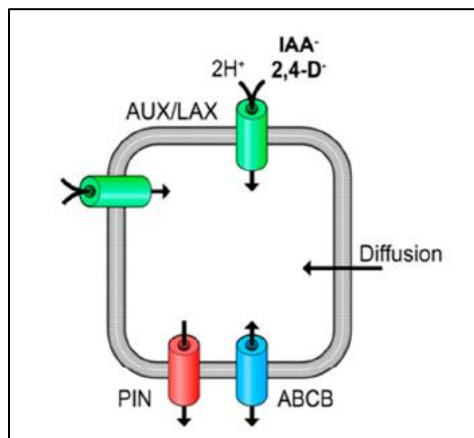
Nota: obtenido de (Mula, 2022).

3.4 Mecanismo de entrada del 2,4-D y el IAA a la célula vegetal

En primera instancia las auxinas naturales como el IAA y las sintéticas como el 2,4-D son ácidos débiles y, como consecuencia, una proporción significativa es protonada en el apoplasto regular con valores de pH entre 4,5 y 5,5 (Kasprzewska *et al.*, 2015). Las auxinas protonadas están dominadas por sistemas de anillos aromáticos hidrófobos, haciendo posible que atraviesen o se difundan dentro y a través de las membranas plasmáticas, aunque la captación celular a través de las proteínas transportadoras de auxinas también es necesaria y de vital importancia (Figura 4) (Parry *et al.*, 2001; Sheldrake, 1974). El citoplasma tiene un pH cercano a la neutralidad y, a este pH, el IAA y el 2,4-D se desprotona y se vuelve aniónico, quedando atrapado en la célula por la conocida trampa de aniones y dependiendo de las proteínas de transporte para salir (Sheldrake, 1974).

Figura 4

Vías de transporte de auxinas en una célula vegetal



Nota: obtenido de (Singh et al., 2018).

El co-transporte de dos protones con cada anión IAA⁻ y el gradiente de pH que respalda el co-transporte de dos protones es necesario y suficiente, aunque la hiperpolarización de la membrana plasmática puede estimular aún más la acumulación de auxina (Hertel *et al.*, 1983). Además, el calcio extracelular proporciona una fuerte estimulación de la acumulación de IAA en los protoplastos (Benning, 1986). Dado que el aumento del calcio intracelular parece ser una respuesta rápida a la auxina en los pelos radiculares (Dindas et al., 2018). También es interesante notar la retroalimentación de la captación de auxina en el pH apoplástico (espacio extracelular periférico a la plasmalema de las células vegetales por el que fluye agua y otras sustancias) y viceversa (Barbez *et al.*, 2017; Inoue *et al.*, 2016). La captación puede elevar el pH apoplástico a través del simporte de protones con IAA a través de AUX1 (Figura 4) y, en las raíces, la captación de auxina también regula la actividad de la membrana plasmática H⁺ ATPasa en bajas concentraciones (Fendrych *et al.*, 2018), bombeando los protones hacia el exterior.

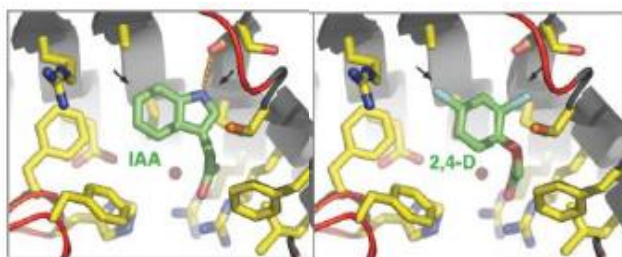
3.5 Interacción de la auxina y el 2,4-D en el complejo proteico TIR1-ASK1

A pesar de tener diferentes estructuras de anillo, el análogo de auxina sintética “2,4-D” se une a TIR1 de manera similar a IAA. A través de un grupo carboxilo común, el análogo de la auxina está atado al piso del bolsillo TIR1. El anillo de dicloro fenilo del 2,4-D encaja en la base de la

bolsa con su dimensión más ancha (definida por los dos cloros grandes) alineada con la de la bolsa, imitando así los anillos dobles de los otros dos compuestos de auxina (Fig.5). En ambos casos, la estructura de anillo del compuesto se adapta a la forma general y, en general, a las propiedades hidrofóbicas de la cavidad TIR1. Por lo tanto, el sitio de unión de auxina de TIR1 está definido por dos residuos polares altamente selectivos (Arg 403 y Ser 438) acoplados espacialmente a una cavidad hidrofóbica menos selectiva y de forma fija. Este sitio de unión a hormonas parcialmente promiscuo en TIR1 explica cómo el receptor de auxina puede potencialmente unirse a una variedad de compuestos de auxina (Tan *et al.*, 2007).

Figura 5

Cavidad hidrofóbica del TIR1 con IAA y el 2,4-D



Nota: obtenido de (Tan *et al.*, 2007).

3.6 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

La *Arabidopsis thaliana* (fig. 6) también conocida como berro de oreja de ratón, es una planta vascular dicotiledónea de la familia de Brassicáceas. A pesar de su pequeño tamaño dicha planta ha tenido un impacto notable en la ciencia vegetal (Cruz López, 2022). El uso de *Arabidopsis thaliana* como modelo se debe a una combinación de varias características: en primer lugar, su pequeño tamaño, produce muchas semillas autopolinización y ciclo de vida corto de aproximadamente seis semanas lo que hace muy conveniente para cultivar (Cruz López, 2022). Además de que se conoce su secuencia genómica por lo cual se convierte en un excelente modelo de estudio para la investigación genética molecular. Existen aproximadamente 125 millones de bases del genoma de *Arabidopsis thaliana* dentro del cual se encuentran 33518 genes, de los cuales codifican proteínas 27379 pertenecientes a más de 11000 familias (Carmen, 2015).

Las condiciones ambientales adecuadas para un crecimiento ideal de las plantas de *Arabidopsis thaliana* es de 22-23 °C de temperatura óptima, aunque el rango de temperatura que puede soportar es de 16-25°C. Con respecto a los requerimientos de luz, la intensidad de luz necesaria se encuentra entre 120 y 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (De et al., 2019).

Figura 6

Ilustración de la planta modelo Arabidopsis thaliana



3.7 Clorofila e inhibición de la fotosíntesis en presencia del herbicida 2,4-D

Las plantas verdes, algas y algunas bacterias requieren clorofila (Chl), una molécula esencial para la fotosíntesis. En la naturaleza existen al menos 5 moléculas de Chl químicamente diferentes y las más abundantes son la clorofila *a* y la *b* (Chl *a* y Chl *b*) (Chen et al., 2010). Todas las clorofilas, junto con otros pigmentos como los carotenoides actúan como importantes recolectores de luz. La clorofila *a* (Chl *a*) cumple una doble función en la fotosíntesis oxigénica que es en la captación de la luz y en la conversión de la energía de los fotones absorbidos en energía química mientras que la clorofila *b* (Chl *b*) su función es la de aumentar la capacidad de absorción de luz de la clorofila *a* (Björn et al., 2009).

Muchos de los herbicidas pueden actuar como antagonistas (cuya función es la de bloquear los receptores e inhiben sus respuestas) del fotosistema II al bloquear el flujo de electrones en el complejo del Fotosistema II (PSII) y por lo tanto inhibe la fotosíntesis (Schuijt *et al.*, 2021). También los herbicidas pueden afectar indirectamente la eficiencia del fotosistema II al inhibir la biosíntesis de caroteno (pigmento fotosintético), ácidos grasos, formación de microtubos o mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (DeLorenzo *et al.*, 2001).

4. JUSTIFICACIÓN

La problemática que se investiga es sobre el herbicida 2,4-D, que, por su alta efectividad en los cultivos a un bajo costo es de uso constante, ocasionando un gran impacto ecotoxicológico, afectando principalmente a los ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos. La necesidad de investigar sobre el herbicida 2,4-D es debido a los efectos inducidos a nivel molecular, por lo que la realización de esta investigación resulta pertinente ya que actualmente no se tiene información sobre el análisis de la reactividad del 2,4-D comparado con el IAA y en el complejo proteico TIR1-ASK1, así como de los efectos provocados en *Arabidopsis thaliana*. De ahí que el uso de cálculos teóricos mediante DFT de la estructura electrónica del 2,4-D, de la auxina natural IAA y en el complejo proteico TIR1-ASK1 permite evaluar la reactividad de estos sistemas. Además, el estudio de la capacidad inhibitoria del herbicida 2,4-D y el análisis estadístico de sus efectos sobre el desarrollo fisiológico en *Arabidopsis thaliana*, posibilita que se determinen las alteraciones fisiológicas que provoca. El aprovechamiento profesional que se obtiene al realizar este estudio es en la contribución del conocimiento de la reactividad del herbicida 2,4-D.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar y analizar las estructuras del herbicida 2,4-D y la auxina natural IAA, así como sus efectos *in vitro* en *Arabidopsis thaliana*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la estructura geométrica del 2,4-D y el IAA cuando se encuentran en forma cristalina y en el complejo proteico TIR1-ASK1.
- Calcular y analizar la estructura electrónica del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el ácido indol-3-acético mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT).
- Determinar la reactividad del 2,4-D y el IAA a partir de descriptores locales y globales.
- Evaluar la capacidad inhibitoria del herbicida 2,4-D sobre parámetros fisiológicos en *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar estadísticamente los efectos herbicidas del 2,4-D sobre el desarrollo fisiológico en *Arabidopsis thaliana*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cálculos teóricos

6.1.1 Aproximaciones utilizadas en cálculos teóricos

Los métodos *ab initio*, los métodos semiempíricos, el método de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) y el método de la mecánica molecular son las cuatro aproximaciones más importantes para calcular propiedades moleculares. La teoría de funcionales de la densidad es una metodología que está basada en la energía como un funcional de la densidad electrónica, no intenta calcular la función de onda, sino que calcula la densidad de probabilidad electrónica, ρ , y calcula la energía electrónica a partir de ρ . Mediante DFT es posible calcular los orbitales moleculares de un sistema, así como índices de reactividad.

6.1.2 Teoría de los Orbitales Frontera (TOF)

La Teoría de Orbitales Moleculares describe la situación electrónica de las moléculas en términos de orbitales moleculares cuyo papel en las mismas es similar al que cumplen los orbitales atómicos en los átomos, es empleada para obtener cambio de energía en las reacciones químicas, para estudiar la estabilidad, la densidad electrónica y la reactividad (Stephanos & Addison, 2017). Por lo tanto, la teoría de los orbitales frontera demuestra que los orbitales moleculares ocupados de más alta energía (HOMO) y los orbitales moleculares desocupados de más baja energía (LUMO) de las moléculas orgánicas determinan el proceso de transferencia de electrones durante la interacción entre moléculas y con ellos es posible determinar índices de reactividad (Fukui & Fujimoto, 1997).

Las modificaciones estructurales y condiciones externas son importantes para el estudio de las reacciones químicas, es por eso por lo que surgen varios índices de reactividad global y local para determinar la reactividad química de una molécula o una especie química.

6.1.3 Descriptores de la reactividad global

La reactividad global nos permite medir la respuesta global de un sistema para determinar su comportamiento con los alrededores. Los descriptores de reactividad global que se estudian en este trabajo son el potencial químico, la dureza global, la blandura y la electrofilia. El potencial químico (μ), se define por las derivadas parciales de primer orden de la energía total (E) con respecto al número de electrones (N) a un potencial externo constante $v(r)$ y la dureza global (η) se define por las derivadas parciales de segundo orden de la energía total (E) con respecto al número de electrones (N) a potencial externo constante $v(r)$ (Koopmans, 1934).

$$\mu = -\chi = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{V(r)} \dots (1)$$

$$\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{V(r)} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \mu}{\partial N} \right)_{V(r)} \dots (2)$$

Los conceptos químicos cualitativos derivados de la Teoría de los Funcionales de la Densidad conceptual se miden para poder definir la reactividad y estabilidad de un sistema, incluida la afinidad electrónica (A) y el potencial de ionización (I) (Pearson, 1986; Pearson & Songstad, 1967).

$$A = -E_{LUMO} \dots (3)$$

$$I = -E_{HOMO} \dots (4)$$

Los valores de dureza global (η), blandura (S) y potencial químico (μ) se pueden aproximar utilizando la energía de los orbitales frontera E_{HOMO} y E_{LUMO} , de acuerdo con las ecuaciones 5, 6 y 7 respectivamente.

$$\eta = (I - A) \dots (5)$$

$$S = \frac{1}{2\eta} \dots (6)$$

$$\mu = \left(\frac{E_{HOMO} + E_{LUMO}}{2} \right) \dots (7)$$

Como la afinidad electrónica de un ligando se define por su capacidad para aceptar electrones de un donante, la energía de ionización de los átomos y moléculas es una medida de su reactividad química. La alta energía de ionización indica un alto nivel de estabilidad, así como la inercia química. La estabilidad molecular y la reactividad se pueden evaluar por la dureza absoluta de un compuesto y su suavidad absoluta (Pearson, 2005). La dureza química es una medida útil para evaluar el comportamiento de los sistemas químicos. Determina qué tan resistente es un grupo de núcleos y electrones a los cambios en su distribución de electrones (Pearson, 2005). El potencial químico (μ) se refiere a la inclinación de un sistema de equilibrio para que escapen los electrones. El mayor potencial químico electrónico conduce a una menor estabilidad y una mayor reactividad.

Otra medida de reactividad global es el índice de electrofilia (ω), que define la naturaleza cuantitativa de la electrofilia de un compuesto. Es una medida de la disminución de la energía debido al flujo máximo de electrones entre el donante y el aceptor (Ayers & Parr, 2008). El índice de electrofilia se obtiene mediante la ecuación 8.

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad \dots (8)$$

6.1.4 Descriptores de la reactividad local

Los descriptores locales determinan el comportamiento reactivo de los átomos que forma una molécula. Fukui desarrolló las llamadas Funciones de Fukui f^+ , f^- y f^0 que relaciona los conceptos de la Teoría de Funcionales de la Densidad DFT con la reactividad. En un punto $\mathbf{r}$, $f^+(\mathbf{r})$ mide la reactividad para un ataque nucleofílico, $f^-(\mathbf{r})$ mide la reactividad para un ataque electrofílico y $f^0(\mathbf{r})$ describe un ataque por un radical (Fukui, 1982). La cuantificación de las funciones es posible a través de las siguientes ecuaciones:

$$f_k^+ = [q_k(N + 1) - q_k(N)] \quad \dots (9)$$

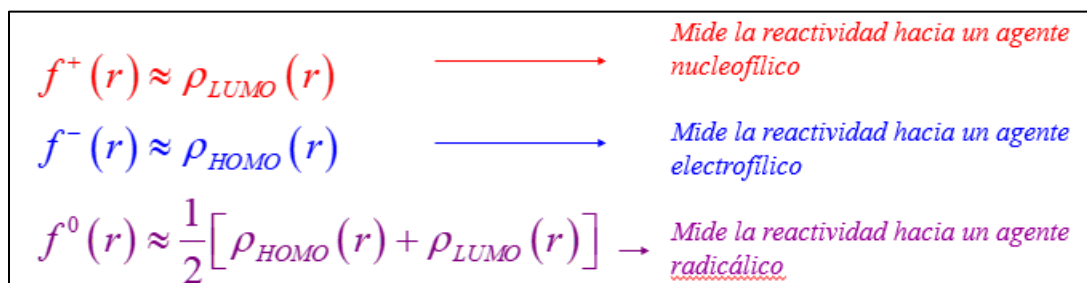
$$f_k^- = [q_k(N) - q_k(N - 1)] \quad \dots (10)$$

$$f_k^0 = \frac{1}{2} [q_k(N + 1) - q_k(N - 1)] \quad \dots (11)$$

donde $q_k(N)$ denota la población electrónica del átomo k del sistema de referencia de acuerdo al análisis poblacional de Mulliken o el de Hirschfeld. A mayores valores de las funciones de Fukui mayor es la reactividad del sitio y estas están asociadas a la densidad electrónica del HOMO y LUMO de acuerdo con el esquema 1.

Esquema 1

Relación entre las funciones de Fukui y la densidad de los orbitales frontera HOMO y LUMO



Cuando el sistema reacciona con un electrófilo los electrones involucrados en la transferencia provienen del HOMO mientras que, frente a un nucleófilo, los electrones entran al orbital LUMO.

6.1.5 Descripción de la proteína TIR1-ASK1

La proteína se obtuvo a partir del repositorio de Protein Data Bank. La estructura de la proteína se identifica como “Mecanismo de percepción de auxina por la ubiquitina ligasa TIR1 (2P1N)”, depositado con una resolución de 2.5 Å determinado por difracción de rayos X y clasificado como proteína de señalización en el organismo *Arabidopsis thaliana*. Su peso total de la estructura es de 174.47 kDa.

6.2 Estudio *in vitro* en *Arabidopsis thaliana*

6.2.1 Preparación del medio MS para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

El medio Murashige & Skoog (MS), fue inventado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962 en su artículo llamado *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures* en donde mencionan la composición del medio donde contienen todos los micronutrientes y macronutrientes, vitaminas, suplementos orgánicos y reguladores del

crecimiento vegetal necesarios para el crecimiento y la multiplicación *in vitro* de órganos vegetales (Murashige & Skoog, 1962).

Se elaboró la preparación por cada litro de Medio MS de acuerdo con las siguientes características, 4.43 g de medio MS comprado en Sigma Aldrich, se adicionó 1% (peso/volumen) de sacarosa, 1% (peso/volumen) de agarosa y ajustar el pH entre 5.5 a 5.6. Para el cultivo *in vitro* bajo las condiciones de esterilidad, las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron al 10% (v/v) de cloro y Tritón X-100 al 1% (v/v) durante 15 minutos, enjuagado 5 veces en H₂O tridestilada y estéril.

El cultivo de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo en medio MS (con vitaminas) de la marca Phytotechnology, se sembraron semillas del ecotipo Columbus 8. Se colocaron 20 semillas por placa de cultivo con un volumen de 20 mL y se estratificó a 4°C durante 24 h en oscuridad. Así mismo, las semillas se observaron a temperatura ambiente, expuestos a un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad y se dejaron crecer durante 7 días para su uso posterior de las plántulas.

6.2.2 Tratamiento agudo con 2,4-D en *Arabidopsis thaliana*

Los tratamientos se realizaron con el herbicida comercial Fitoamina 40 de la marca Dragon que contiene 2,4-D con formulación de sal de dimetilamina a diferentes concentraciones de control, 0.080mM, 0.100mM, 0.200mM, 0.300mM y 0.500mM teniendo como referencia la concentración utilizada por Salcedo con una concentración de 22.1 mg/L de 2,4-D de grado analítico (99.9% de pureza) (Salcedo *et al.*, 2021). Se realizó el efecto agudo a las concentraciones mencionadas teniendo registros al día 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 11 días.

6.2.3 Tratamiento crónico con 2,4-D en *Arabidopsis thaliana*.

Los tratamientos se realizaron con el herbicida comercial Fitoamina 40 de la marca Dragon que contiene 2,4-D con formulación de sal de dimetilamina a diferentes concentraciones de control, 0.080 mM, 0.100 mM y 0.150 mM. Se realizó el efecto crónico a las concentraciones mencionadas

a diferentes cortes de tiempo de 7 días, 14 días y 21 días teniendo registro para cada concentración la longitud de la raíz, tallo, largo y anchura de la hoja.

6.2.4 Determinación de la clorofila como biomarcador

Para la determinación de la clorofila se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Arnon donde se extrae las hojas del modelo de *Arabidopsis thaliana*, pesar 10 mg de muestra para tritarlo en un mortero adicionando 5 ml de acetona al 80%, hasta extraer todo el colorante de la muestra (Anie & Ar No N, 1949), para las muestras de control, 0.080mM, 0.100 mM y 150 mM del 2,4-D con sal dimetilamina (herbicida comercial), posteriormente colocar las muestras en un tubo falcón de 15 mL y centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, separar el sobrenadante que contiene los pigmentos, ajustar cada tubo a 10 mL con acetona al 80%. Se mide en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 645 y 663 nm (Hiscox A N & Israelstam, 1979) utilizando acetona como blanco. Se realizó la determinación de la clorofila para los cortes de tiempo de 7, 14 y 21 días a las concentraciones de control, 0.080 mM, 0.100 mM y 0.150 mM.

El equipo utilizado en las determinaciones espectroscópicas fue un espectrofotómetro de Thermo Scientific Genesys 20 de 300 a 1100 nm de longitud de onda. Para la determinación de clorofila *a*, *b* y total se utilizaron las ecuaciones descritas por Arnon, usando los coeficientes de absorción específicos dados por Mackinney fueron:

$$\text{Clorofila } a = (12.7 \cdot \text{Abs } 663\text{nm}) - (2.69 \cdot \text{Abs } 645\text{nm}) \dots (12)$$

$$\text{Clorofila } b = (22.9 \cdot \text{Abs } 645\text{nm}) - (4.68 \cdot \text{Abs } 663\text{nm}) \dots (13)$$

$$\text{Clorofila total} = (20.2 \cdot \text{Abs } 645\text{nm}) + (8.02 \cdot \text{Abs } 663\text{nm}) \dots (14)$$

6.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las mediciones en las plántulas en exposición del herbicida 2,4-D durante 7, 14 y 21 días de tratamiento fueron sometidos a un análisis de varianza tipo 1 y 2 (ANOVA) para detectar diferencias significativas entre los parámetros de la cantidad de clorofila *a*, *b* y total. Posteriormente, se efectuó la prueba de Tukey para determinar entre que grupos se encuentran las diferencias significativas detectadas con el análisis de la varianza. Para la longitud

de la raíz, longitud del tallo, ancho y largo de la hoja se realizó una correlación de Pearson en relación con la concentración del herbicida 2,4-D.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación de la estructura molecular y la reactividad del 2,4-D y el IAA

Se llevó a cabo un estudio de la estructura molecular y de la reactividad del ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,4-D y del ácido indol 3-acético IAA, tomando en cuenta 3 estructuras de cada molécula. Las estructuras moleculares se tomaron de dos sistemas:

1.- Del Crambridge Crystallographic Data Center CCDC, del 2,4-D (Sieró et al., 2011) (Código 695525) y del IAA (Nigović et al., 2000) (código 141657) y es etiquetado como 2,4-D(M_{cris}) e IAA(M_{cris}).

2.- Del Protein Data Bank PDB, del 2,4-D (código PDB: 2P1N) y del IAA (código PDB: 2P1P) y es etiquetado como 2,4-D(M_{CP}) e IAA(M_{CP}).

3. Además de las moléculas aisladas, también se considera la interacción del 2,4-D y del IAA con los aminoácidos dentro del complejo TIR1-ASK1 (Tan *et al.*, 2007), etiquetados como 2,4-D M-AA e IAA M-AA.

Con el servidor web PDBsum se realizó el análisis sobre las interacciones del herbicida 2,4-D y el IAA con el complejo TIR1-ASK1. En el caso del 2,4-D los aminoácidos que interaccionan de manera directa con este son la arginina-403 y la serina-438 y con el IAA son la arginina-403, serina-438 y leucina-439. Además de estos aminoácidos, también se consideraron otros aminoácidos que se encuentran cercanos a las moléculas de interés Tabla 3, figuras 7 y 8.

Tabla 3

Aminoácidos que interaccionan con el 2,4-D y el IAA en el complejo TYR1-ASK, en verde se marcan los aminoácidos marcados por el PDBsum.

PDB-SUM		CÁLCULO	
IAA	2,4-D	IAA	2,4-D
ARG403	ARG403	ARG403	ARG403
SER438	SER438	SER438	SER438
LEU439	LEU439	LEU439	LEU439
LEU404		LEU404	LEU404
		PHE79	PHE79

Figura 7

Sitios de interacción del 2,4-D en el complejo TIR1-ASK1, los enlaces de hidrógeno se muestran con las líneas verdes discontinuas

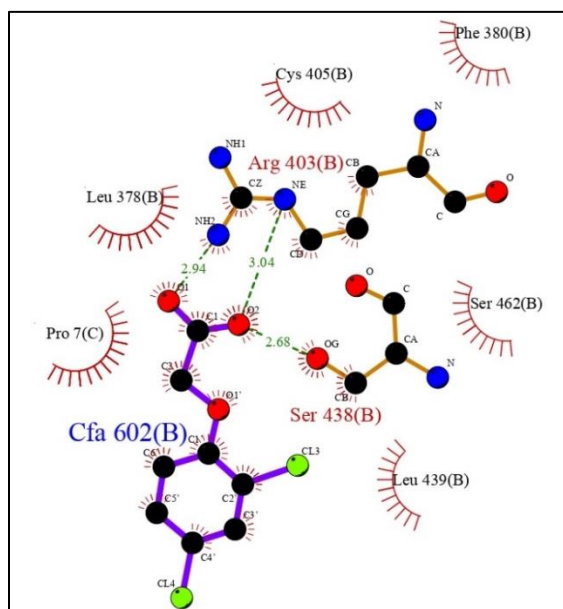


Figura 8

Residuos de la proteína TIR1-ASK1 que interactúan con el ligando IAA, los enlaces de hidrógeno se muestran con las líneas verdes discontinuas

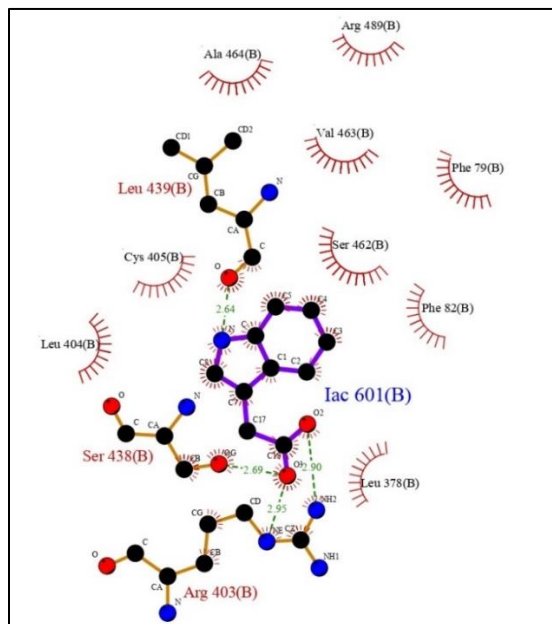


Figura 9

Estructura molecular del ácido 2,4-diclorofenoxiacético

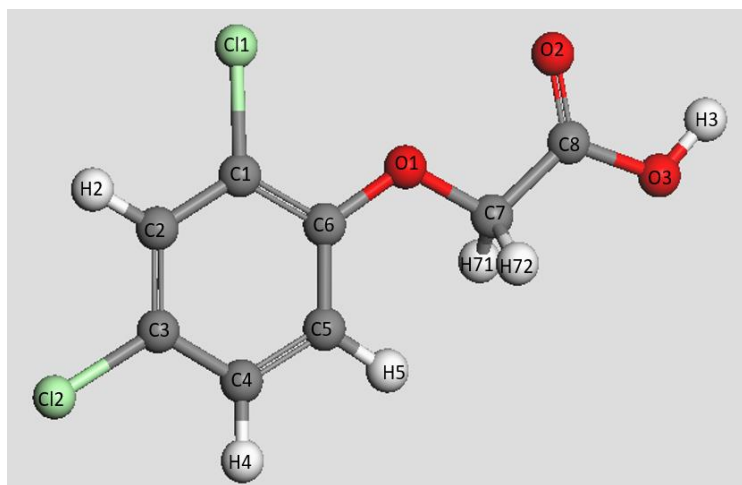
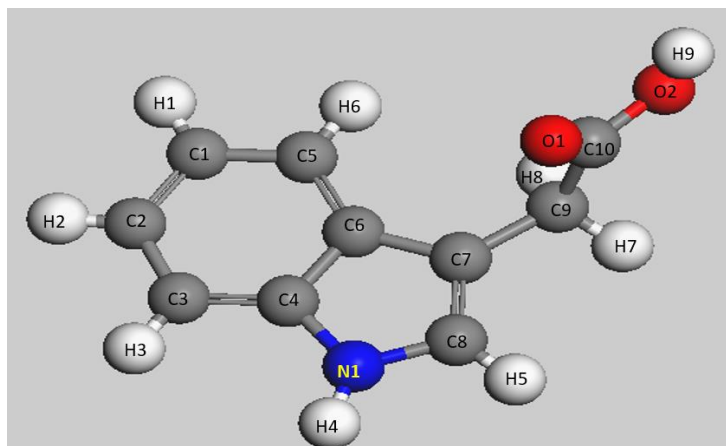


Figura 10

Estructura molecular del ácido indol-3-acético



Con el fin de comparar la estructura geométrica de la molécula del 2,4-D tomada de la estructura cristalina con la molécula tomada del complejo proteico TIR1-ASK1, se realizó una superposición entre ellas (figura 11). La molécula color azul turquesa corresponde a la molécula de la estructura cristalina, y en colores la molécula del complejo proteico, su similitud entre ellas corresponde a un 98.92%. En el caso de la IAA también se llevó a cabo la superposición de las estructuras moleculares (figura 12), y la similitud entre ellas corresponde a un 99.03%.

Figura 11

Superposición estructural del 2,4-D extraído del cristal en azul y del complejo proteico

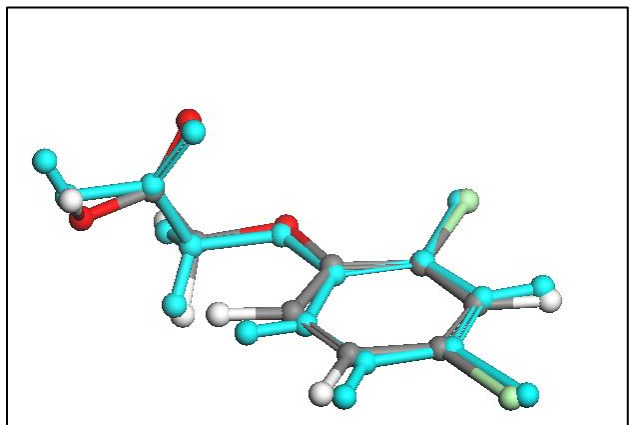
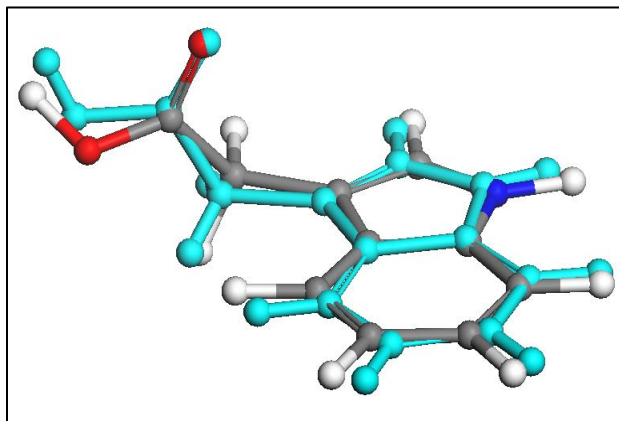


Figura 12

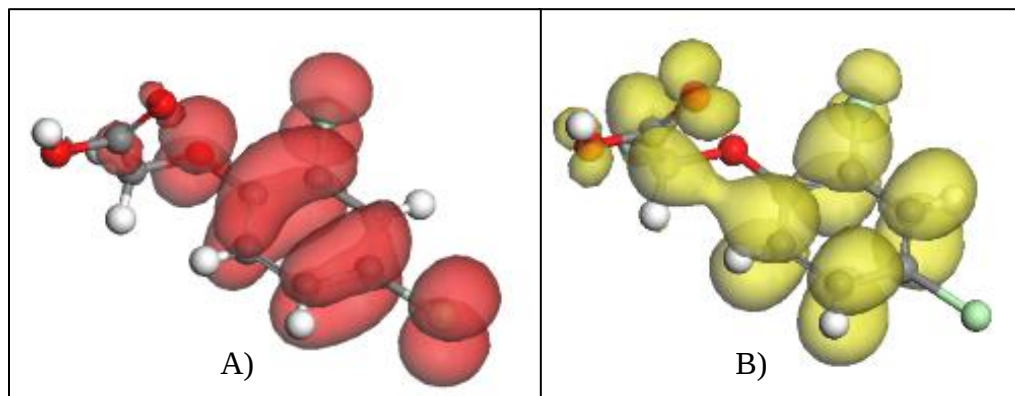
Superposición estructural del IAA extraído del cristal en azul y del complejo proteico



Se obtuvieron los orbitales fronteras del 2,4-D(M_{cris}) (figura 13), el HOMO se presenta de color rojo mientras que el LUMO de color amarillo, se observa que el HOMO se encuentra esparcido por toda la molécula, pero específicamente en el anillo fenólico, los dos átomos de color y el oxígeno del grupo éter, mientras que el LUMO se muestra de igual manera en la parte fenólica pero más localizado en los enlaces C-H, en el Cl1-H y en la región hidrofílica.

Figura 13

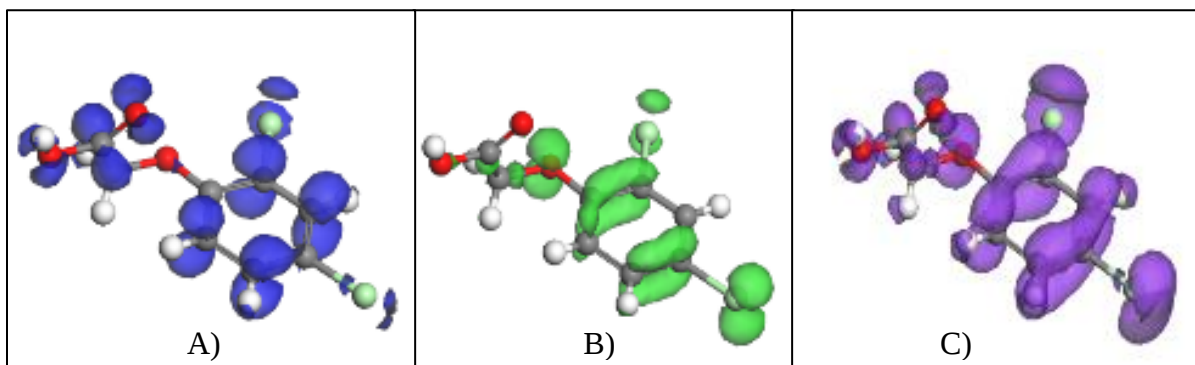
Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del 2,4-D aislado de la estructura cristalina



Se sacó la reactividad local mediante las Funciones de Fukui del 2,4-D(M_{cris}) (figura 14), donde la “ f^+ ” es representado de color azul y tiene la misma región que esta presenta el LUMO, el ataque electrofílico “ f^- ” representado de color verde presenta la misma región que el HOMO y el “ f^0 ” se muestra de color violeta donde presenta la combinación del ataque electrofílico y nucleofílico. También se observa que ambos cloros que conforma la parte del anillo fenólico están presentes en los tres tipos de ataques, por lo que debería presentar una mayor probabilidad de ataque.

Figura 14

Funciones de Fukui del 2,4-D aislado de la estructura cristalina A) f^+ , B) f^- , C) f^0



La tabla 4 se muestra los átomos que son susceptibles a ciertos ataques en el 2,4-D(M_{cris}), donde el Cl2 presenta mayor susceptibilidad a un ataque electrofílico y por radicales libres con valores

de 0.190 y 0.142 respectivamente mientras que por el ataque nucleofílico el Cl1 presenta un valor de 0.115. Podemos decir que en este sistema los átomos de Cl que se encuentran en la parte fenólica son los más reactivos.

Tabla 4

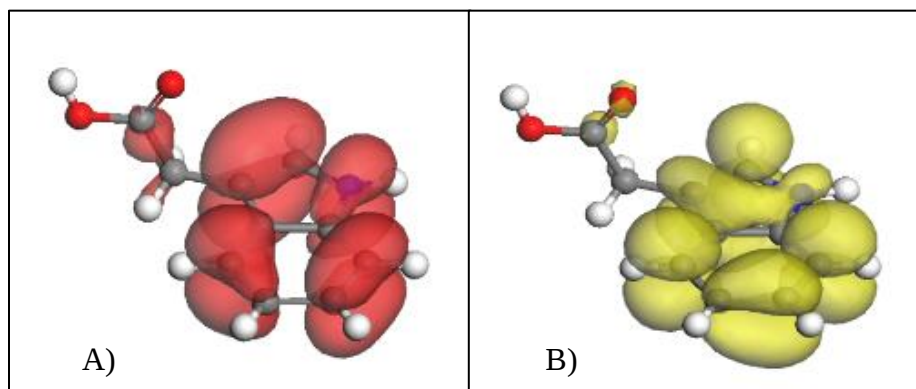
Reactividad del 2,4-D aislado del cristal

Átomo	Cl2	C8	Cl1
f^-	0.190		
f^+	0.093	0.070	0.115
f^0	0.142		0.130

Se obtuvieron las orbitales fronteras de la auxina natural IAA(M_{cris}) (figura 15), el HOMO se presenta de color rojo mientras que el LUMO de color amarillo, se observa que el HOMO se encuentra esparcido por toda la región indólica y una pequeña parte en el enlace C9-C10, mientras que el LUMO se muestra igualmente en la parte indólica.

Figura 15

Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del IAA aislado de la estructura cristalina

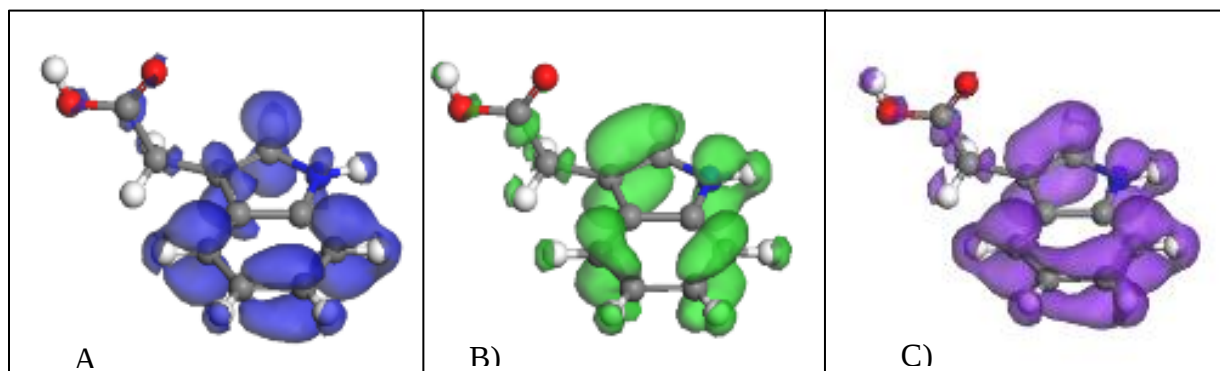


La reactividad local del IAA IAA(M_{cris}) mediante las Funciones de Fukui (figura 16), donde la “ f^+ ” tiene la misma región que presenta el LUMO, el ataque electrofílico “ f^- ” presenta la misma

región que el HOMO y el “ f^0 ” se encuentra localizada en la región indólica. La región indólica presenta mayor preferencia en los ataques nucleofílicos, electrofílicos y por radicales libres.

Figura 16

Funciones de Fukui del IAA aislado de la estructura cristalina A) f^+ , B) f^- , C) f^0



La tabla 5 presenta los átomos que son susceptibles a ciertos ataques en el IAA(M_{cris}), donde el C3 y C5 presenta mayor susceptibilidad a un ataque nucleofílico con un valor de 0.105, para el ataque electrofílico el C7 presenta un valor de 0.106 y por radicales libres el C8 presenta un valor de 0.100. Los átomos de carbono mencionados se encuentran en la parte indólica y se comprueba mediante la figura 8.

Tabla 5

Reactividad del IAA aislado del cristal

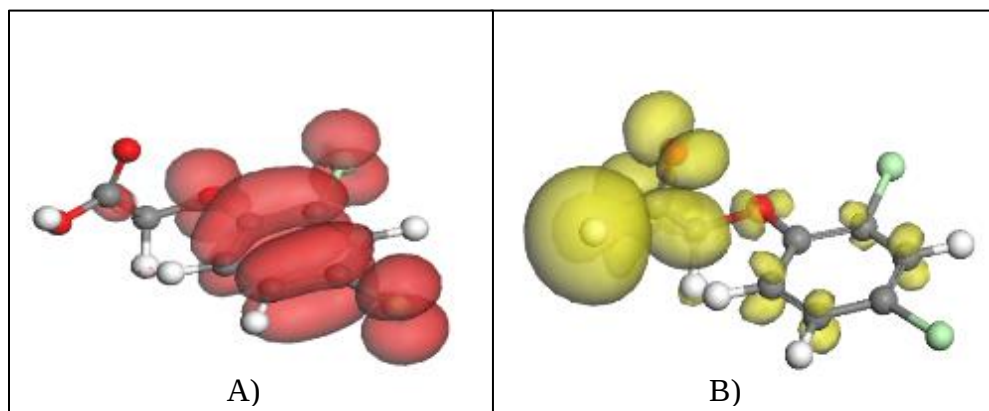
Átomo	C7	C8	C3	C5
f^+			0.105	0.105
f^-	0.106	0.098		
f^0		0.100	0.091	0.095

Se obtuvieron las orbitales fronteras del 2,4-D(M_{CP}) (figura 17), el HOMO se presenta de color rojo mientras que el LUMO es de color amarillos, se observa que el HOMO se encuentra concentrado en la región fenólica y en el O1 que pertenece al éter, mientras que el LUMO se ubica

principalmente en la región hidrofílica siendo el H terminal del carboxilo con mayor región del LUMO.

Figura 17

Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del 2,4-D extraída del complejo proteico TIR1-ASK1



La reactividad local mediante las Funciones de Fukui del 2,4-D(MCP) (figura 18), donde la “ f^+ ” presenta la misma región que esta presenta el LUMO teniendo mayor reactividad en el H3 que pertenece al grupo carboxílico, el ataque electrofílico “ f^- ” se encuentra en la región fenólica y en el Cl2 y tiene la misma región que el HOMO y el “ f^0 ” se presenta en la región fenólica en el Cl2 y en la parte hidrofílica. Se observa que los átomos más reactivos son el H3 y Cl2.

La tabla 6 se muestra los átomos que son susceptibles a ciertos ataques en el 2,4-D(MCP), donde el Cl2 presenta mayor susceptibilidad a un ataque electrofílico y por radicales libres con valores de 0.182 y 0.122 respectivamente mientras que por el ataque nucleofílico el H3 presenta un valor de 0.211. Los valores fueron bastantes altos en comparación con el 2,4-D extraído de la estructura cristalina y se puede deber a interacción del complejo proteico con el 2,4-D.

Figura 18

Funciones de Fukui del 2,4-D extraído del complejo proteico TIR1-ASK1 A) f^+ , B) f^- , C) f^0

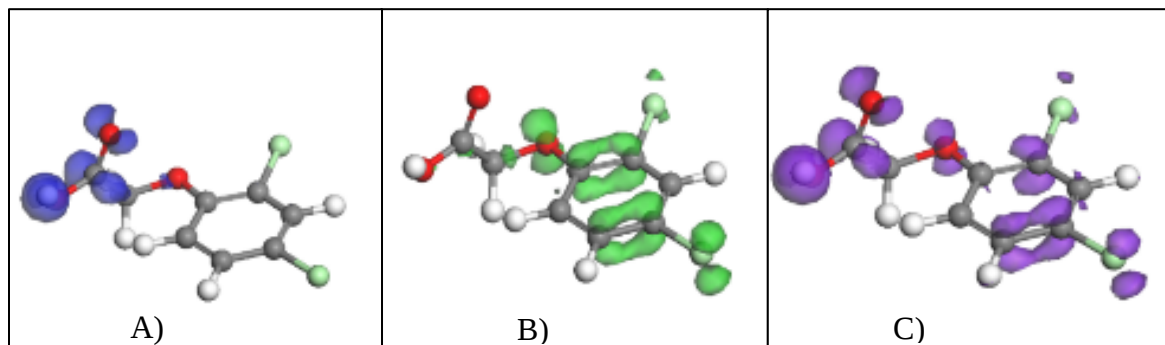


Tabla 6

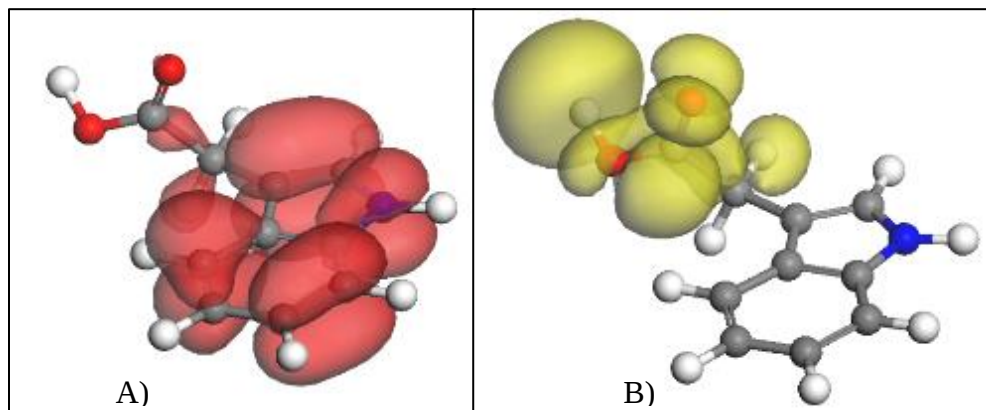
Reactividad del 2,4-D aislado del complejo proteico TIR1-ASK1

Átomo	Cl2	Cl1	H3
f^-	0.182	0.146	
f^+	0.062	0.058	0.211
f^0	0.122	0.102	0.118

Se obtuvieron las orbitales fronteras de la auxina natural IAA(M_{CP}) (figura 19), el HOMO se presenta de color rojo mientras que el LUMO es de color amarillo, se observa que el HOMO se encuentra esparcido por toda la región indólica, mientras que el LUMO se presenta en la parte hidrofílica de la auxina específicamente en el grupo carboxílico teniendo mayor región el H9.

Figura 19

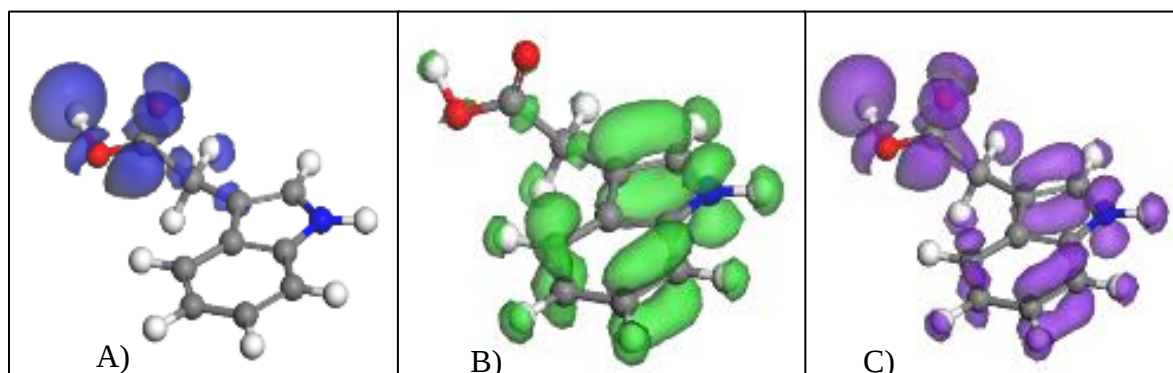
Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del IAA extraída del complejo proteico TIR1-ASK1



La reactividad local del IAA(M_{CP}) mediante las Funciones de Fukui (figura 20), donde “ f^+ ” presenta la misma región que el LUMO además que el H9 presenta mayor índice de un ataque nucleofílico, el ataque electrofílico “ f^- ” presenta la misma región que el HOMO ya que se encuentra en la parte indólica de la auxina y el “ f^0 ” se encuentra en la región indólica y en la parte hidrofílica. EL H9 tuvo mayor concentración de presentar un ataque nucleofílico y por radicales libres.

Figura 20

Funciones de Fukui del IAA extraído del complejo proteico TIR1-ASK1 A) f^+ , B) f^- , C) f^0



La tabla 7 presenta los átomos que son susceptibles a ciertos ataques en el IAA(M_{CP}) donde el H9 presenta mayor susceptibilidad a un ataque nucleofílico y por radicales libres con un valor de 0.341 y 0.184 respectivamente, para el ataque electrofílico el C7 presenta un valor de 0.091. El H9

presentó valores mayores para ataque nucleofílico y por radicales libres tal y como se mostró en la figura 20.

Tabla 7

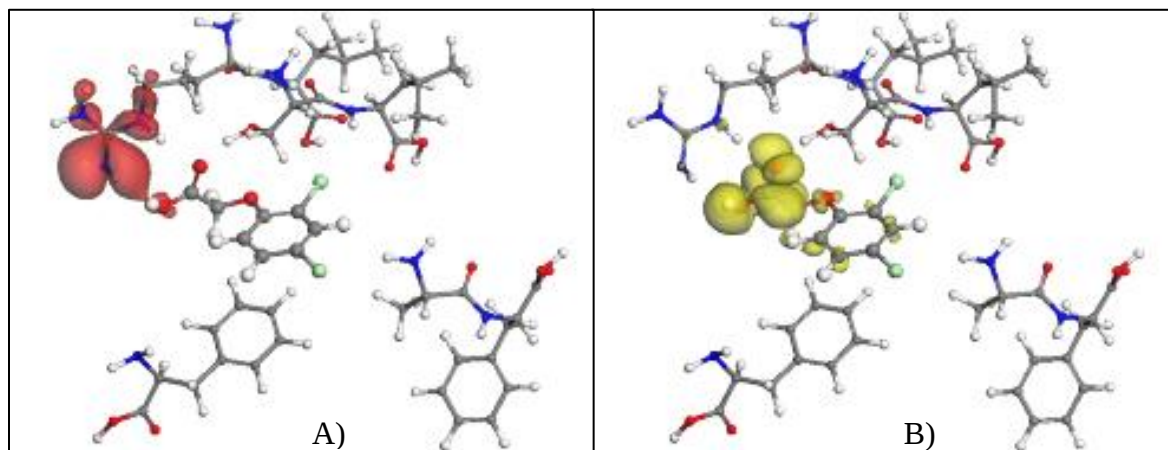
*Reactividad del IAA aislado del complejo proteico
TIR1-ASK1*

Átomo	C7	N1	C10	H9
f^+			0.125	0.341
f^-	0.091	0.070		
f^0		0.043	0.067	0.184

Se obtuvieron las orbitales fronteras del 2,4-D M-AA (figura 21), el HOMO se presenta de color rojo mientras que el LUMO es de color amarillo, se observa que el HOMO se encuentra en la arginina 403 específicamente en el grupo guanidinio ($\text{H-N}=(\text{NHR})\text{NH}_2$), mientras que el LUMO se ubica principalmente en la región hidrofílica siendo el H terminal del carboxilo con mayor región del LUMO.

Figura 21

Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del 2,4-D con los aminoácidos que interacciona en el complejo proteico TIR1-ASK1

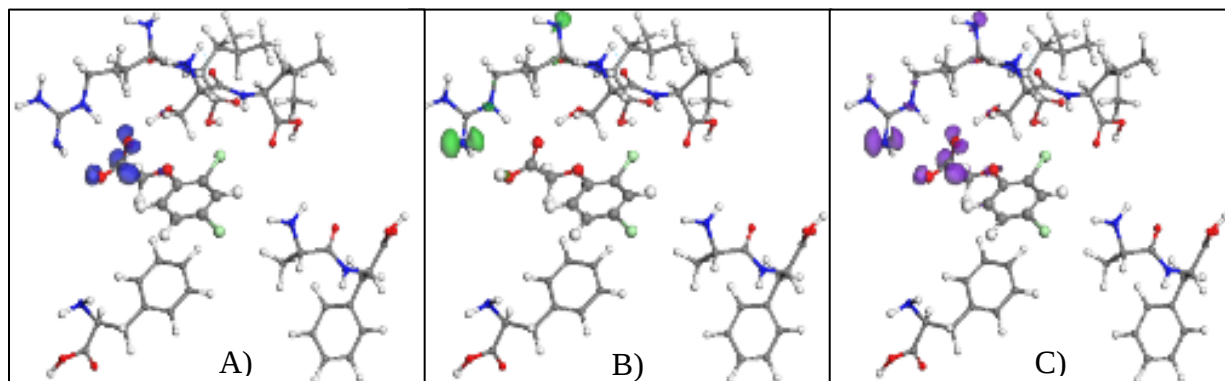


La reactividad local mediante las Funciones de Fukui del 2,4-D M-AA (figura 22), donde la “ f^+ ” presenta la misma región que esta presenta el LUMO teniendo mayor reactividad la región carboxílica, el ataque electrofílico “ f^- ” se encuentra en la arginina 403 tal y como se muestra en la región del HOMO y el “ f^0 ” se presenta en la arginina 403 y en la parte hidrofílica del 2,4-D.

Figura 22

Funciones de Fukui del 2,4-D con los aminoácidos que interacciona con el complejo proteico

TIR1-ASK1 A) f^+ , B) f^- , C) f^0



La tabla 8 muestra los átomos que son susceptibles a ciertos ataques en el 2,4-D M-AA, donde el C8 presenta mayor susceptibilidad a un ataque nucleofílico y por radicales libres con valores de 0.170 y 0.088 respectivamente mientras que por el ataque electrofílico el H3 presenta un valor de 0.029. El C8 presentó un mayor índice de un ataque nucleofílico ya que se encuentra deficiente en electrones por el O2 y al estar junto con átomos de nitrógeno de la arginina la hacen más susceptible a dicho ataque.

Tabla 8

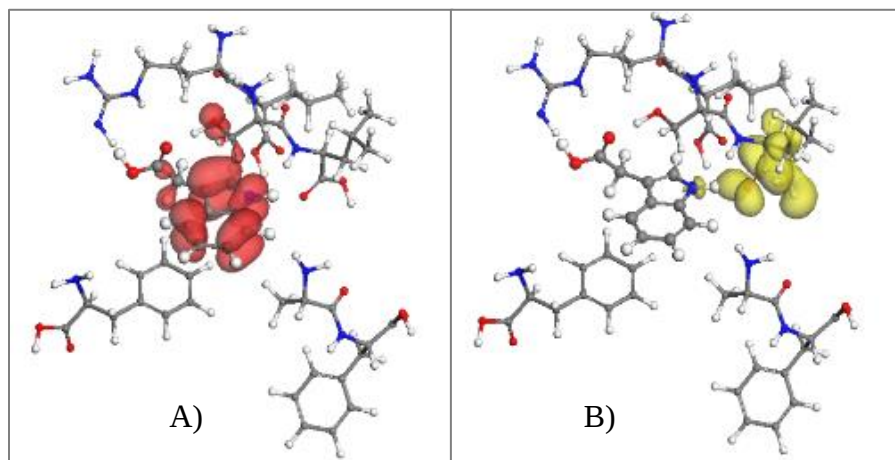
Reactividad del 2,4-D interaccionando con los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1.

Átomo	O2	C8	H3
f^-			0.029
f^+	0.127	0.170	
f^0		0.088	

Se obtuvieron las orbitales fronteras del IAA M-AA (figura 23), el HOMO se presenta de color rojo mientras que el LUMO es de color amarillo, se observa que el HOMO se encuentra en la región indólica y en el oxígeno terminal de la serina 438, mientras que el LUMO se ubica principalmente en la leucina 439 y en el nitrógeno de la auxina IAA.

Figura 23

Orbitales frontera A) HOMO y B) LUMO del IAA con los aminoácidos que interacciona en el complejo proteico TIR1-ASK1

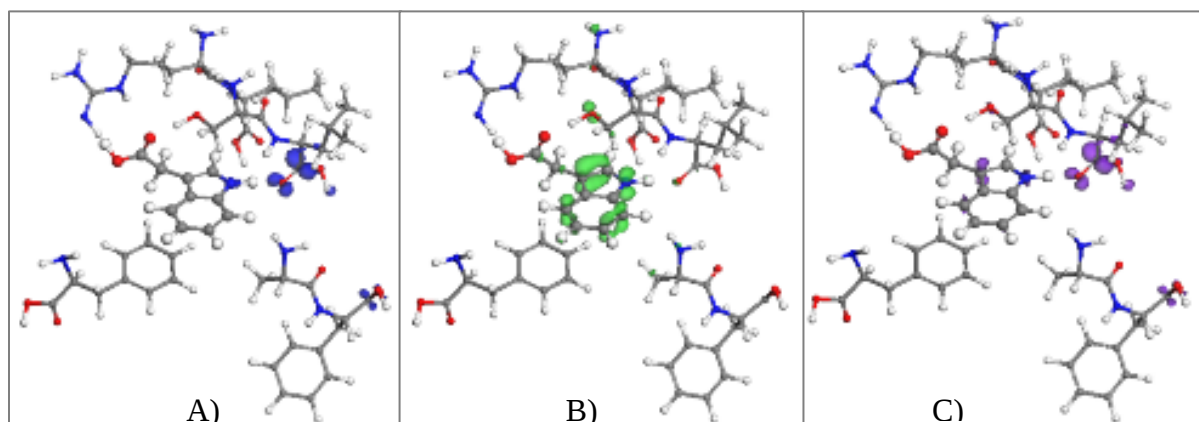


La reactividad local mediante las Funciones de Fukui de la auxina natural IAA M-AA (figura 24), donde la “ f^+ ” presenta la misma región que esta presenta el LUMO ubicado en la leucina 439, el ataque electrofílico “ f^- ” se encuentra en la región indólica tal y como se muestra en la región del HOMO y el “ f^0 ” se presenta en la leucina 439.

Figura 24

Funciones de Fukui del IAA con los aminoácidos que interacciona con el complejo proteico

TIR1-ASK1 A) f^+ , B) f^- , C) f^0



La tabla 9 muestra los átomos que son más susceptibles a ciertos ataques en el IAA M-AA, donde el C7 presenta mayor susceptibilidad a un ataque electrofílico y por radicales libres con valores de 0.074 y 0.041 respectivamente mientras que por el ataque nucleofílico el C1 presenta un valor de 0.012.

Tabla 9

Reactividad del IAA interaccionando con los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1

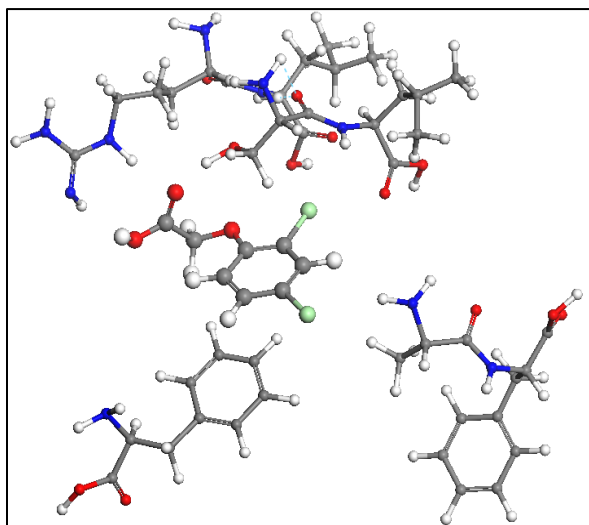
Átomo	C7	C5	C1
f^+		0.012	0.012
f^-	0.074	0.061	
f^0	0.041	0.036	

La representación esquemática de los aminoácidos que interaccionan con el 2,4-D (fig. 25) los cuales son la arginina 403, serina 438, leucina 439, fenilalanina 79, alanina 464 y leucina 404, los

aminoácidos polares como la arginina 403 y serina 438 interaccionan con la región hidrofílica del 2,4-D mientras que la fenilalanina 79 y alanina 464 al ser apolares interaccionan con la parte hidrofóbica que se encuentra en el anillo fenólico del 2,4-D.

Figura 25

La interacción de los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1 con el 2,4-D



La representación esquemática de los aminoácidos que interaccionan con el IAA (fig. 26) los cuales son la arginina 403, serina 438, leucina 439, fenilalanina 79, alanina 464 y leucina 404, los aminoácidos polares como la arginina 403 y serina 438 interaccionan con la región hidrofílica del IAA mientras que la fenilalanina 79 y alanina 464 al ser apolares interaccionan con la parte hidrofóbica que se encuentra en la región indólica del IAA.

Figura 26

La interacción de los aminoácidos del complejo proteico TIR1-ASK1 con el IAA

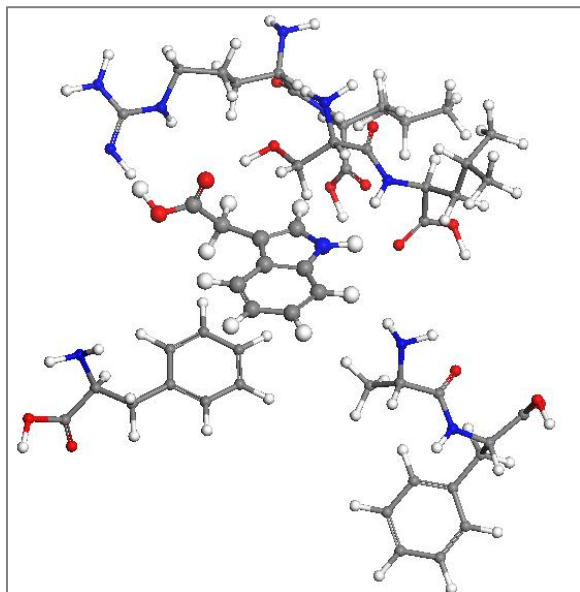


Tabla 10

Reactividad global del 2,4-D tomado del cristal, del complejo proteico y con la interacción con los aminoácidos del TIR1-ASK1. η (dureza absoluta) y S (Blandura)

2,4-D	E_{L-H}	EI	AE	η	S	μ	ω
2,4-D (M_{cris})	3.860	5.544	1.684	1.930	0.2591	-3.614	3.384
2,4-D (M_{CP})	3.407	5.55	2.143	1.7035	0.2935	-3.847	4.343
2,4D M-AA	1.769	4.353	2.584	0.8845	0.5653	-3.469	6.801

La diferencia de energía de los orbitales fronteras HOMO y LUMO de las tres estructuras son diferentes teniendo al 2,4-D M-AA el de menor diferencia de energía como se muestra en la tabla 10 con un valor de 1.769 lo que significa que es más reactivo, se puede confirmar con su dureza absoluta ya que presenta el menor valor con 0.8845 eso ocasiona que no tiene resistencia hacia los electrones para que sean transferidos. La blandura del 2,4-D M-AA se duplica con respecto a los dos sistemas afirmando que tiene la facilidad de presentar una mayor interacción con el complejo

proteico. La electrofilicidad en el tercer sistema muestra un valor alto ocasionando que sea más propensos a interaccionar de manera covalente (enlaces peptídicos) con especies nucleofílicas.

Tabla 11

Reactividad global del IAA tomado del cristal, del complejo proteico y con la interacción con los aminoácidos del TIR1-ASK1. η (dureza absoluta) y S (Blandura)

IAA	E_{L-H}	EI	AE	η	S	μ	ω
IAA (M_{cris})	3.813	4.865	1.052	1.907	0.2623	-2.9585	2.296
IAA (M_{CP})	2.929	4.807	1.878	1.465	0.3414	-3.3425	3.814
IAA M-AA	2.065	4.531	2.466	1.033	0.4843	-3.4985	5.927

En la tabla 11 se muestra la diferencia de energía de los orbitales fronteras HOMO y LUMO de las tres estructuras son diferentes teniendo al IAA M-AA el de menor diferencia de energía con un valor de 2.065 lo que significa que es más reactivo, se puede confirmar con su dureza absoluta ya que presenta el menor valor con 1.033 eso ocasiona que no tiene resistencia hacia los electrones para que sean transferidos. La blandura del IAA M-AA es mayor con respecto a los dos sistemas afirmando que tiene la facilidad de presentar una mayor interacción con el complejo proteico. La electrofilicidad en el tercer sistema muestra un valor alto con 5.927 ocasionando que sea más propensos a interaccionar de manera covalente (enlaces peptídicos) con especies nucleofílicas.

Al comparar los dos sistemas de la tabla 10 y 11 se observa que los más reactivos son el 2,4-D M-AA y el IAA M-AA pero ahora al comparar entre ellos se observa que el 2,4-D M-AA es más reactivo respecto con el IAA M-AA ya que la diferencia de energía en el 2,4-D M-AA es de 1.769 mientras que el del IAA M-AA es de 2.065 teniendo una diferencia considerable con respecto a la electrofilicidad de igual manera que en el anterior caso el 2,4-D presenta un mayor valor con respecto al IAA con una diferencia de 0.873. Tiene mayor dureza el IAA que el 2,4-D en la blandura el 2,4-D presenta un mayor valor lo que significa que el 2,4-D con los aminoácidos es más propenso a reaccionar con respecto al IAA.

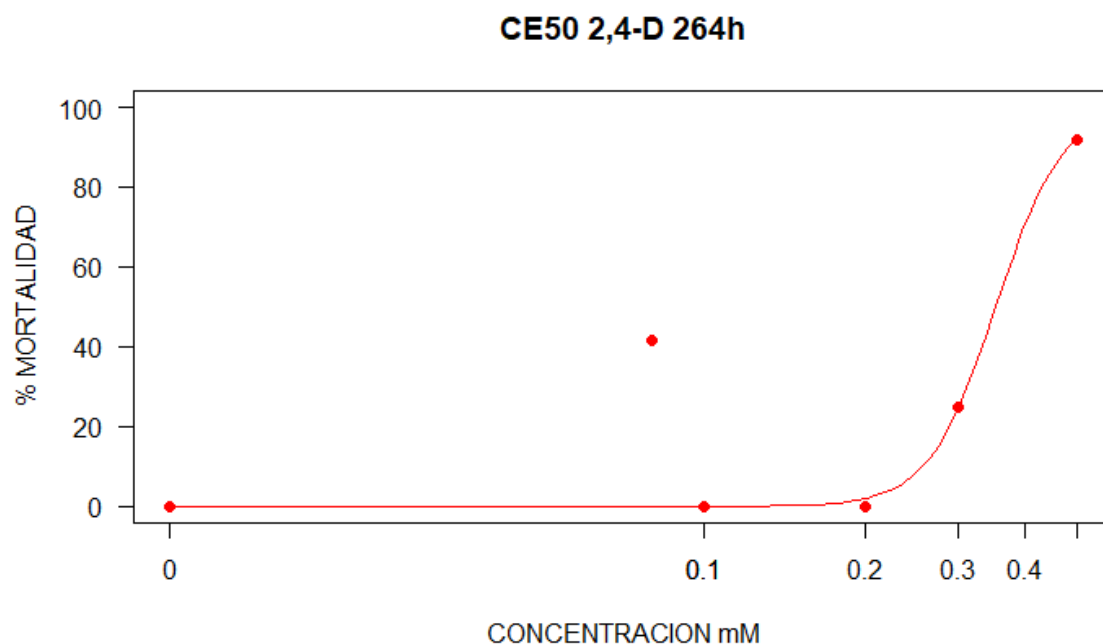
7.2 Evaluación de la capacidad inhibitoria del herbicida 2,4-D en *Arabidopsis thaliana*

7.2.1 Evaluación de la CE_{50} del 2,4-D de un herbicida comercial en *Arabidopsis thaliana*

Se ha visto en el modelo *Arabidopsis thaliana* el registro de la evaluación de la concentración efectiva media (CE_{50}) de varios compuestos, por lo que la insuficiente información sobre la CE_{50} en herbicidas como el 2,4-D provocó la realización de un experimento *in vitro* con *Arabidopsis thaliana* en medio MS con un herbicida 2,4-D comercial para evaluar la CE_{50} en un tiempo determinado.

Figura 27

Evaluación de la CE_{50} del 2,4-D de un herbicida comercial



El valor de la CE_{50} del 2,4-D de un herbicida comercial denominado Fitoamina 40 de la marca Dragón se evaluó a 264 h como se muestra en la figura 27 mediante el modelo probit en Rstudio, el intercepto representa la CE_{50} con un valor de 0.3521 mM obteniendo una p significativa ($p < 0.05$). Estudios previos de CE_{50} con 2,4-D en *Arabidopsis thaliana* se realizaron con una pureza de 99% (obtenida de Sigma Aldrich) observando cambios morfológicos en la plántula a una concentración 0.100 mM a 48 h (Salcedo *et al.*, 2021). La concentración obtenida por Salcedo es

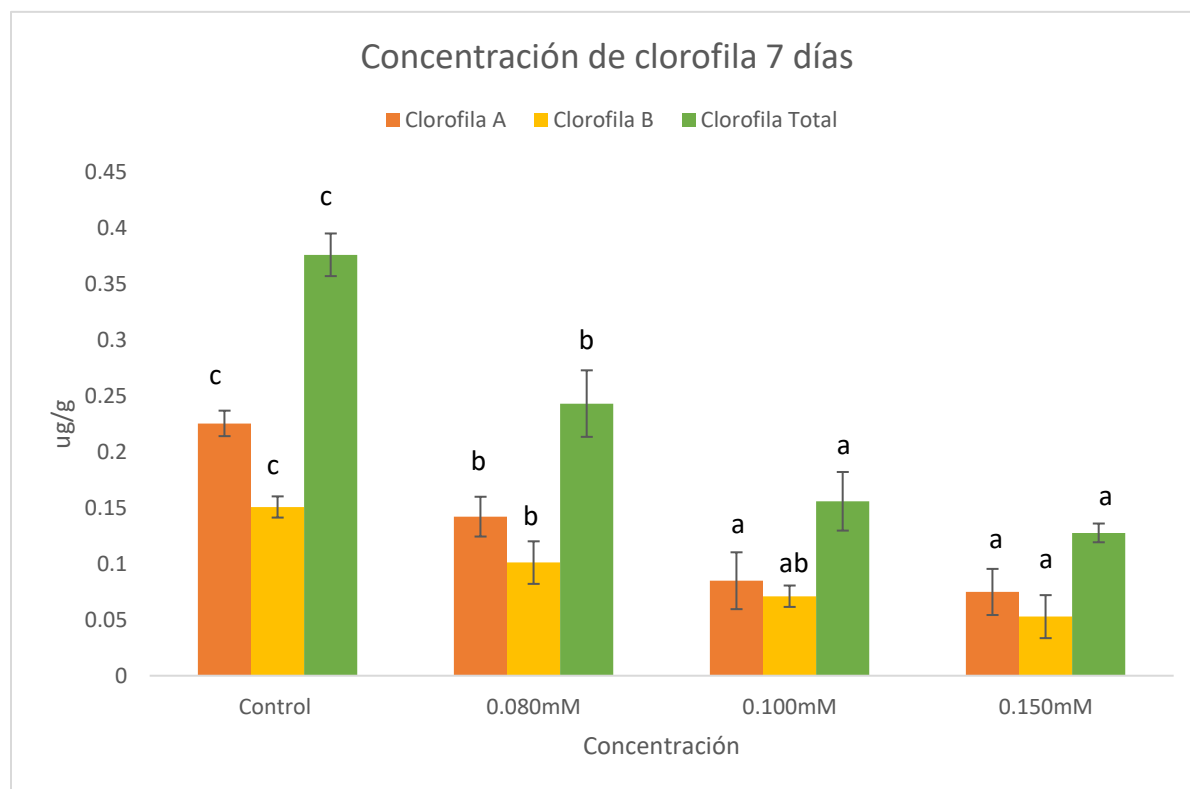
más tóxico con respecto a la concentración obtenida por el herbicida comercial, debido a que este contiene otros compuestos como agentes secuestrantes y el tipo de formulación que requiere para el transporte del 2,4-D hacia la plántula.

7.2.2 Determinación de la concentración de clorofila en *Arabidopsis thaliana*

El uso de biomarcadores es una herramienta útil para medir cuantitativamente cambios moleculares, bioquímicos o celulares dentro de los organismos en respuesta al estrés químico externo (Smit *et al.*, 2009). El biomarcador como el contenido de clorofila fue utilizada para determinar el estrés ocasionado a diferentes concentraciones menores de CE_{50} del herbicida 2,4-D durante 7, 14 y 21 días de tratamiento para tener el comportamiento diferentes lapsos de tiempo debido a que el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* es corto.

Figura 28

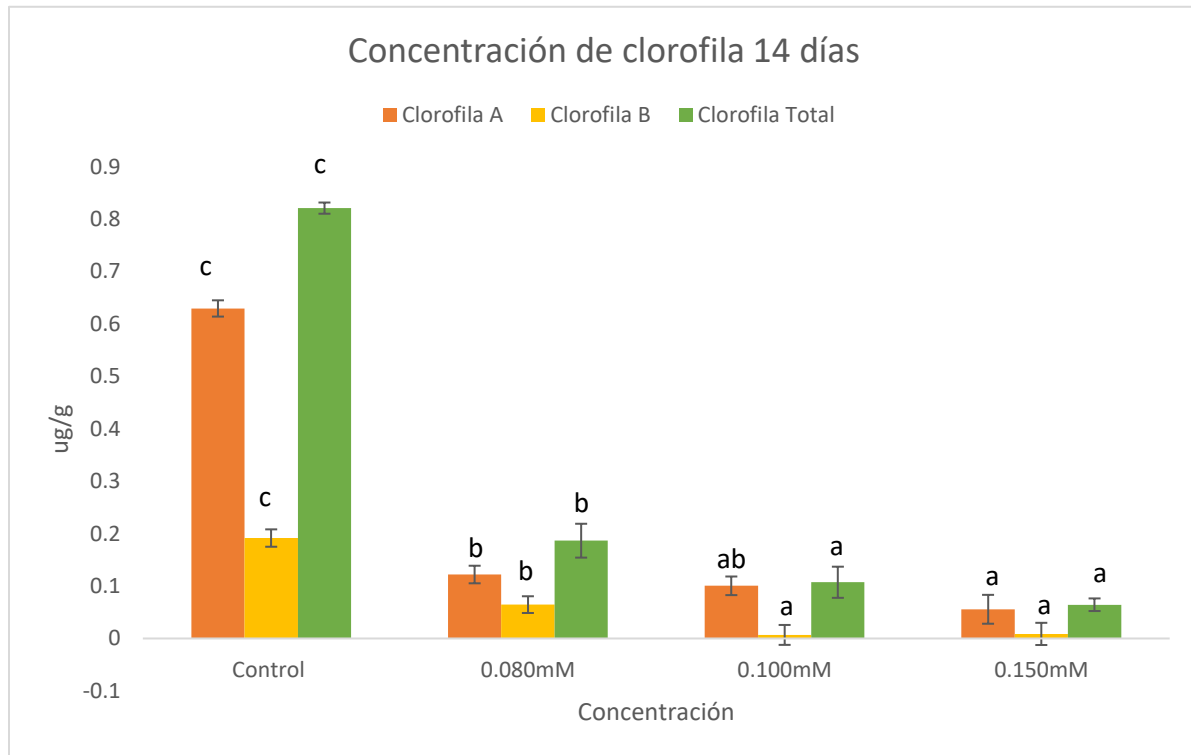
Contenido de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento



Las variaciones de la clorofila *a*, *b* y total mostradas en la Figura 28, que corresponden a las plántulas a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento. Se registró una disminución de contenido de clorofila *a* en un 37%, 62% y 66% a las concentraciones 0.080 mM, 0.100 mM y 0.150 mM respectivamente ($p < 0.05$) con respecto al control. Para el contenido de clorofila *b* se registró una disminución en un 32%, 52% y 65% a 0.080 mM, 0.100 mM y 0.150 mM respectivamente, ($p < 0.05$) en comparación con el control. Así mismo para el contenido de clorofila total, este disminuyó con respecto al control en un 35%, 58% y 66% a 0.080 mM, 0.100 mM y 0.150 mM respectivamente ($p < 0.05$). Se observa que la cantidad de clorofila *a* es mayor que la clorofila *b* ya que la molécula en mayor proporción es la clorofila *a*, que realiza la captación de los fotones de luz y en la conservación de la energía de los fotones absorbidos en energía química en la fotosíntesis oxigénica y la clorofila *b* se presenta en menor proporción porque su función únicamente es la de aumentar la capacidad de absorción de la luz para la clorofila *a*. La disminución del contenido de clorofila se debe a que el 2,4-D actúa como antagonista del fotosistema II de la cadena respiratoria, bloqueando el flujo de electrones y provocando inhibición de la fotosíntesis (Schuijt *et al.*, 2021). El análisis estadístico realizado fue ANOVA de un factor obteniendo una diferencia significativa, $p < 0.05$ prueba de Tukey.

Figura 29

Contenido de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento

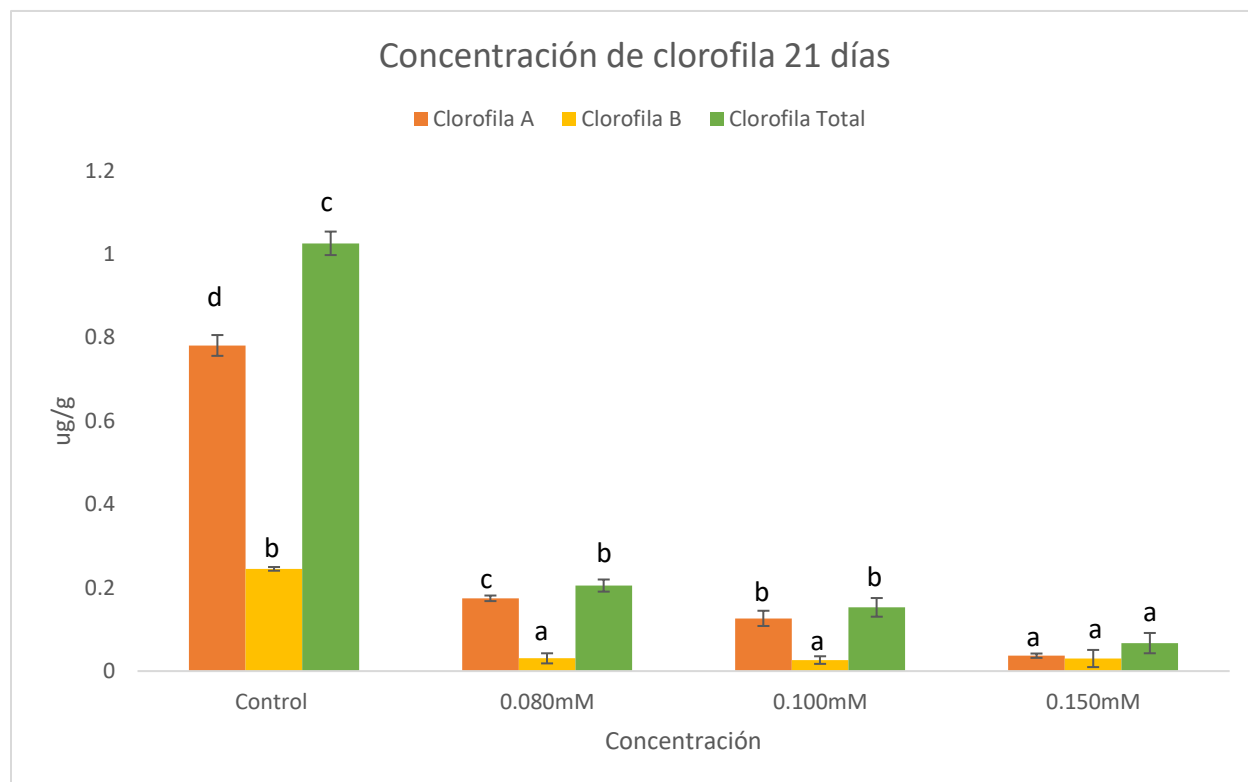


Los resultados de la Figura 29 corresponden a las variaciones de la cantidad de clorofila *a*, *b* y total en las plántulas a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento. Se observa que la cantidad de clorofila se incrementa en las plántulas control debido a su crecimiento, en el caso de clorofila *a*, el incremento resultó superior al doble en comparación al tratamiento de 7 días, así como respecto a clorofila *b* y total ($p < 0.05$). Para el contenido de clorofila *a* en las concentraciones 0.080 mM, 0.100 mM y 0.150 mM la disminución fue menor en comparación al contenido de clorofila *a* de 7 días de tratamiento. Se registro una mínima variación en la cantidad de clorofila *b* para la concentración 0.080 mM, sin embargo, a las concentraciones 0.100 mM y 0.150 mM tal parámetro disminuyó 10 veces más con respecto al contenido de clorofila *a* de 7 días de tratamiento. Así pues, la clorofila total presentó una considerable disminución en el tratamiento a 0.150 mM comparada con el tratamiento a 7 días.

De lo anterior se destaca el tiempo de exposición como un factor determinante en la disminución de la cantidad de clorofila, como se observó en los tratamientos de 7 y 14 días, un mayor tiempo de exposición de la plántula al herbicida 2,4-D ocasiona un estrés prolongado.

Figura 30

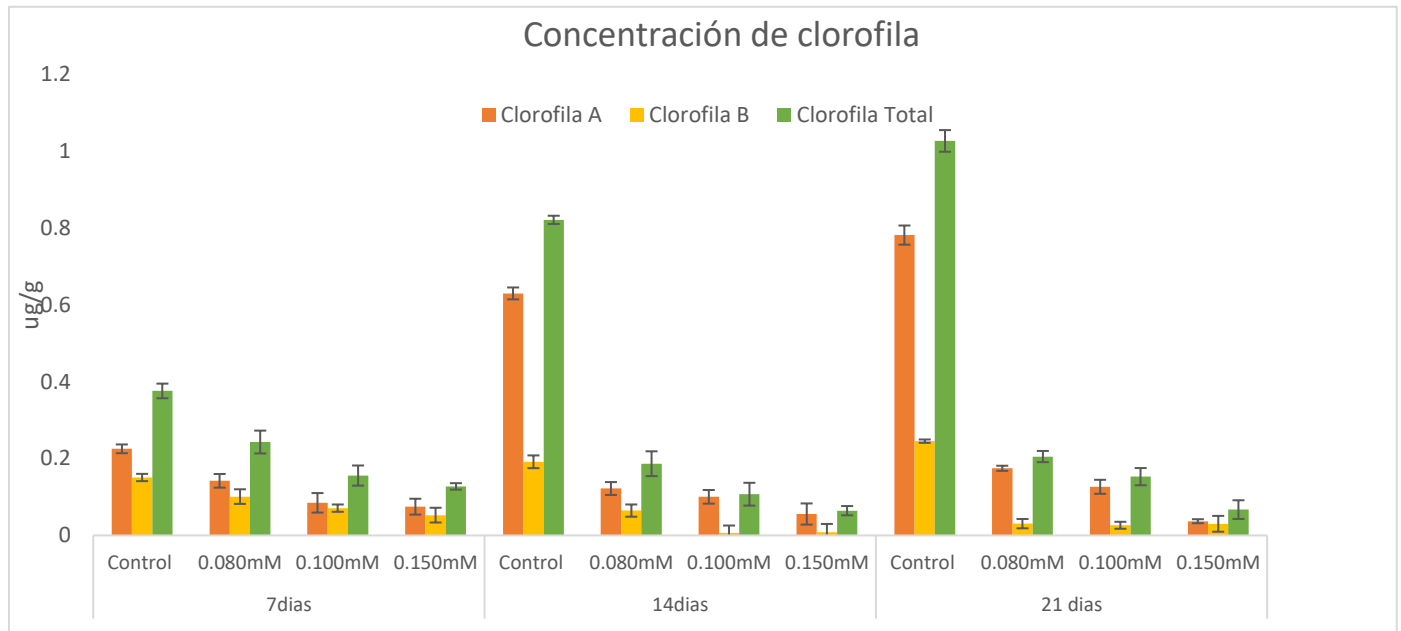
Contenido de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento



En la Figura 30, se destacan las variaciones en la concentración de clorofila *a*, *b* y total en las plántulas a distintas concentraciones del 2,4-D durante 21 días de tratamiento. Se observa que la cantidad de clorofila *a* se incrementa 3 veces en las plántulas control debido a su crecimiento; en el caso de clorofila *b*, no resultó un incremento rápido como lo hace la clorofila *a*. Para 0.080 mM el contenido de clorofila *a* presentó un ligero aumento en su contenido con respecto a 14 días de tratamiento. Las concentraciones 0.100 mM y 0.150 mM existe poca disminución para la clorofila *a*, *b* y total en comparación a los 14 días de tratamiento, pero a 7 días de tratamiento existe una alta disminución, demostrando que la exposición del herbicida 2,4-D a 21 días de tratamiento ocasiona un alto nivel de estrés.

Figura 31

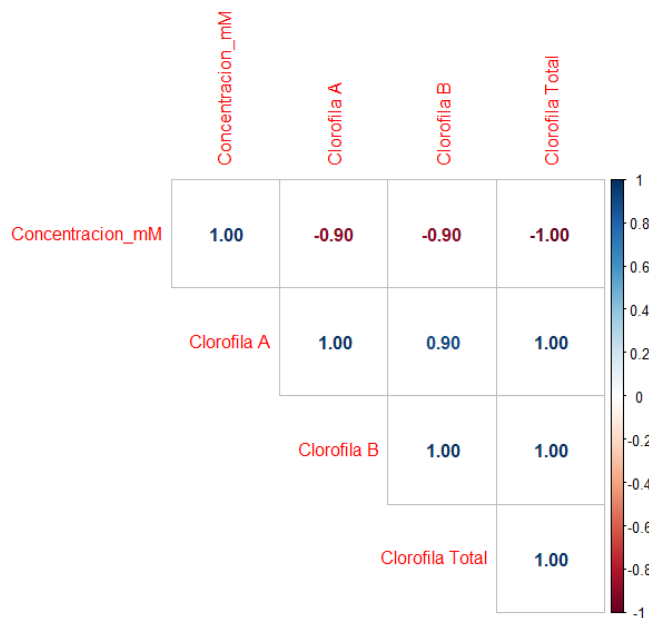
Determinación de la concentración de la clorofila a 7, 14 y 21 días a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D



Los resultados de la Figura 31 corresponden a las variaciones de la cantidad de clorofila *a*, *b* y total en las plántulas a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7, 14 y 21 días de tratamiento. El contenido de clorofila *a* se incrementó 3 veces en las plántulas control debido a su crecimiento, en el caso de clorofila *b* no se presentó aumento como sucedió con la clorofila *a*. Con la concentración 0.080 mM hubo poco incremento en la concentración de la clorofila *a* en los días 7, 14 y 21 días de tratamiento. En las concentraciones 0.100 mM y 0.150 mM disminuyó el contenido de clorofila *a*, *b* y total en comparación al contenido de 7 días de tratamiento. Por lo tanto, los resultados muestran que la plántula control presenta un crecimiento adecuado con el incremento de clorofila, las concentraciones 0.080 mM, 0.100 mM y 0.150 mM se observó una disminución en la clorofila con respecto a los días de tratamiento ($p < 0.05$).

Figura 32

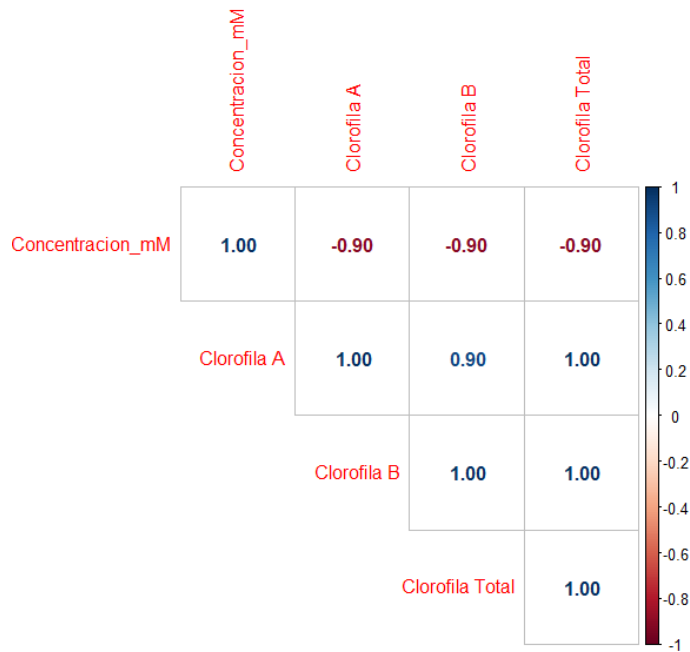
Matriz de correlación de forma gráfica de la concentración de la clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento



Los resultados que aparecen en la figura 32 muestran la matriz de correlación de la cantidad de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento. Esta correlación mide el grado de relación lineal entre las variables, es decir, la relación que existe entre la concentración del herbicida 2,4-D con la cantidad de clorofila. De acuerdo con estos análisis, se observa que existe una relación lineal negativa de -0.90 para la clorofila *a* y *b* en relación con la concentración, en otras palabras, existe una disminución de clorofila *a* y *b* con el aumento de la concentración del herbicida 2,4-D. La relación lineal entre la clorofila total y la concentración del herbicida de 2,4-D es negativa de -1.00.

Figura 33

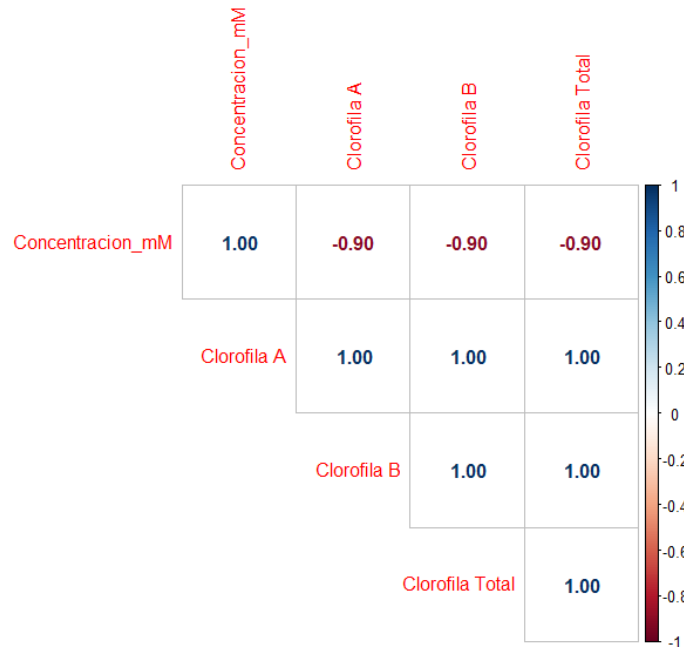
Matriz de correlación de forma gráfica de la concentración de la clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento



En la figura 33 muestran la matriz de correlación de la concentración de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento, se observa una relación lineal negativa con valor de -0.90 para clorofila *a*, *b* y total con respecto a la concentración del 2,4-D, por lo que se interpreta que existe una disminución de la cantidad de clorofila *a*, *b* y total con el aumento de la concentración del herbicida 2,4-D, lo que ocasiona la inhibición de la fotosíntesis provocado por el estrés inducido en la plántula.

Figura 34

Matriz de correlación de forma gráfica de la concentración de la clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento



La figura 34 muestran la matriz de correlación de la concentración de clorofila a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento. Se observa una relación lineal negativa de -0.90 entre la clorofila *a*, *b* y total con la concentración del 2,4-D como también se observó durante 14 días de tratamiento, por lo que existe la disminución de clorofila *a*, *b* y total con el aumento de la concentración del herbicida 2,4-D.

Las respuestas fisiológicas y morfológicas son de vital importancia para el estudio de los efectos provocados por una sustancia química presente en un organismo de estudio, por lo que se realizó un análisis para el comportamiento de la morfología de la plántula que se compone de hoja, tallo y raíz en presencia del herbicida 2,4-D en 7, 14 y 21 días de tratamiento.

Figura 35

Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en Arabidopsis thaliana durante 7 días de tratamiento obtenidas con Cooling Tech



Plántulas control 1A) hoja, 1B) tallo, 1C) raíz. Tratamiento 0.080 mM 2A) hoja, 2B) tallo, 2C) raíz. Tratamiento 0.100 mM 3A) hoja, 3B) tallo, 3C) raíz. Tratamiento 0.150 mM 4A) hoja, 4B) tallo, 4C) raíz. (Las fotografías fueron tomadas a 2X con un microscopio digital Cooling Tech).

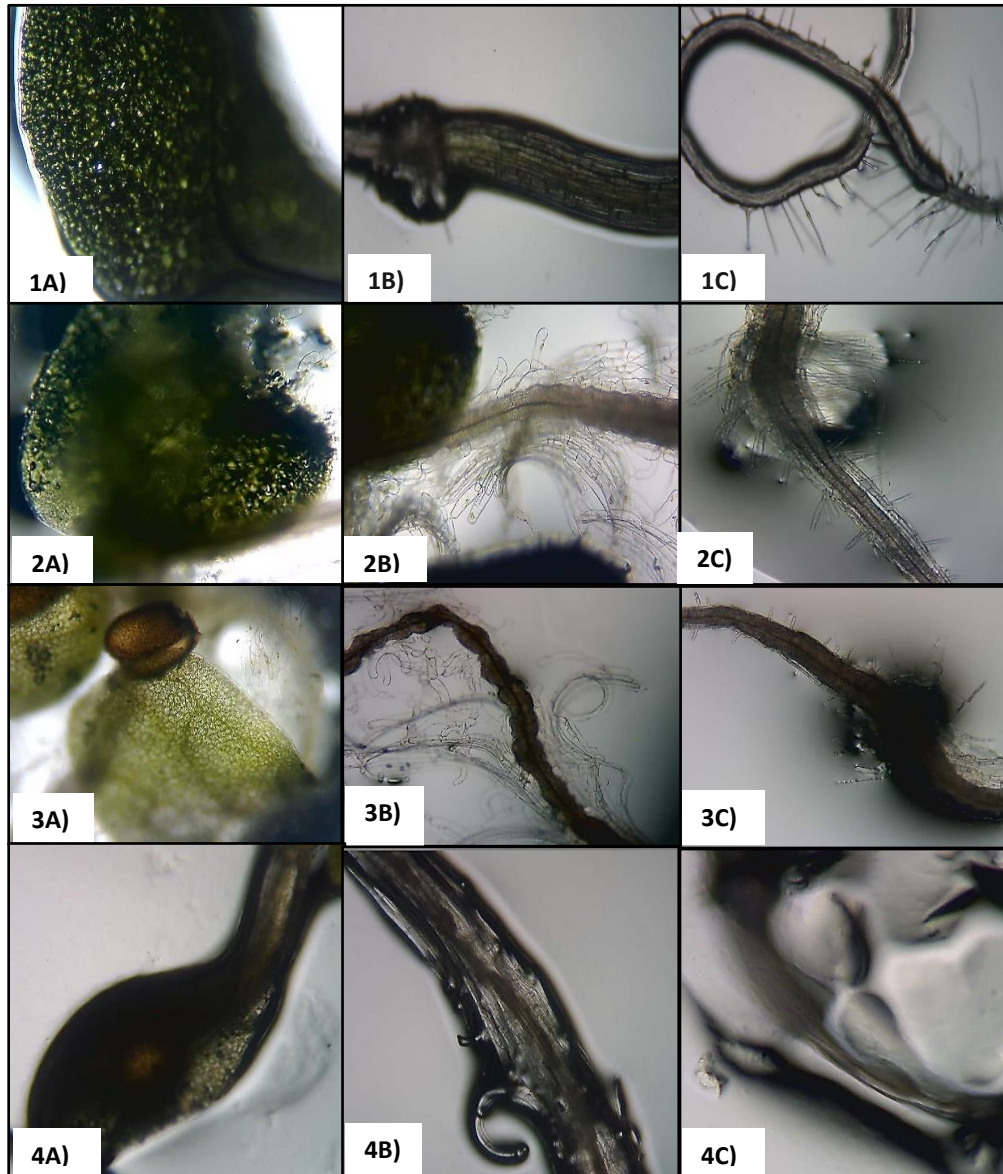
En la figura 35 se muestran los efectos provocados en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D durante 7 días de tratamiento. La plántula control presenta en 1A) un crecimiento normal de la hoja, en 1B) tallo con una estructura firme y 1C) presencia de pelos radiculares. La concentración 0.080 mM presenta varios efectos en la morfología de la plántula en 2A) existe una epinastia en las hojas con una disminución en el color verde, indicativo de una disminución de

clorofila, 2B) elongación del tallo y 2C) disminución en el grosor de la raíz. La concentración 0.100 mM se observa efectos morfológicos en la plántula en 3A) presenta una epinastia notoria en las hojas, 3B) pérdida de firmeza y color del tallo y 3C) un decrecimiento en el grosor de la raíz. Para la concentración 0.150 mM se observa efectos morfológicos considerables en la plántula donde 4A) exhibe una curvatura notoria alta en las hojas , 4B) pérdida de firmeza y color del tallo como se mostró a 0.100 mM y 4C) un alto decrecimiento en el grosor de la raíz con respecto a la plántula control, por lo que, el herbicida 2,4-D induce varios defectos en el crecimiento de la plántula por ejemplo la epinastia de las hojas, la inhibición del crecimiento de raíces y brotes, y una disminución en el área foliar (Teixeira *et al.*, 2007).

Figura 36

Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en Arabidopsis thaliana

durante 7 días de tratamiento obtenidas con Primo Star



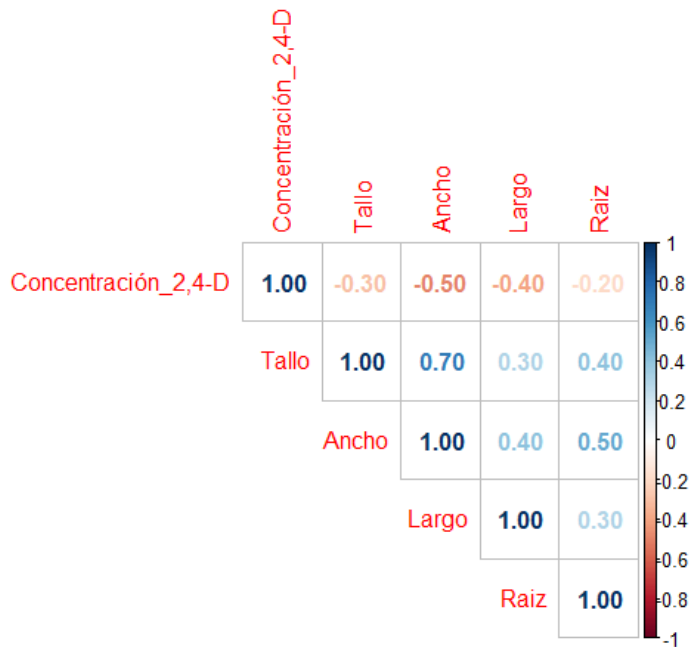
Plántulas control 1A) hoja, 1B) tallo, 1C) raíz. Tratamiento 0.080 mM 2A) hoja, 2B) tallo, 2C) raíz. Tratamiento 0.100 mM 3A) hoja, 3B) tallo, 3C) raíz. Tratamiento 0.150 mM 4A) hoja, 4B) tallo, 4C) raíz. (Las fotografías fueron tomadas a 4X con un microscopio Primo Star marca Zeiss).

En la figura 36 se muestran los efectos provocados en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D durante 7 días de tratamiento. La plántula control presenta en 1A) un crecimiento normal de la hoja reflejado en la coloración verdosa, en 1B) tallo con una estructura firme y 1C) presencia de pelos radicales en lo largo de la raíz. La concentración 0.080 mM presenta efectos en la

morfología de la plántula en 2A) existe disminución de color verde en la hoja, indicativo de una disminución de clorofila, 2B) ruptura de los tejidos del tallo y 2C) disminución de pelos radicales. La concentración 0.100 mM se observa efectos morfológicos en la plántula en 3A) presenta una coloración verde claro en la hoja, indicativo de una disminución de clorofila 3B) alta ruptura de los tejidos del tallo y 3C) disminución de la cantidad de pelos radicales, así como su longitud. Para la concentración 0.150 mM se observa efectos morfológicos considerables en la plántula donde 4A) exhibe una coloración oscura en la hoja, ocasionando una alta disminución de clorofila 4B) ruptura del tejido del tallo como se mostró en 0.080mM y 0.100 mM y 4C) pérdida total de pelos radicales en la raíz con respecto a la plántula control, por lo que, el herbicida 2,4-D induce varios defectos en el crecimiento de la plántula por ejemplo la inhibición del crecimiento de raíces y brotes (Teixeira et al., 2007). Una relación interesante es sobre la disminución de los pelos radicales con la cantidad de clorofila presentes en las hojas, los pelos radicales absorben los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de las plántulas, así como iones fundamentales, por lo que la disminución del crecimiento de los pelos radicales disminuye la absorción de iones como el Mg^{2+} , catión fundamental en la constitución de la molécula de la clorofila responsable de la producción de la fotosíntesis.

Figura 37

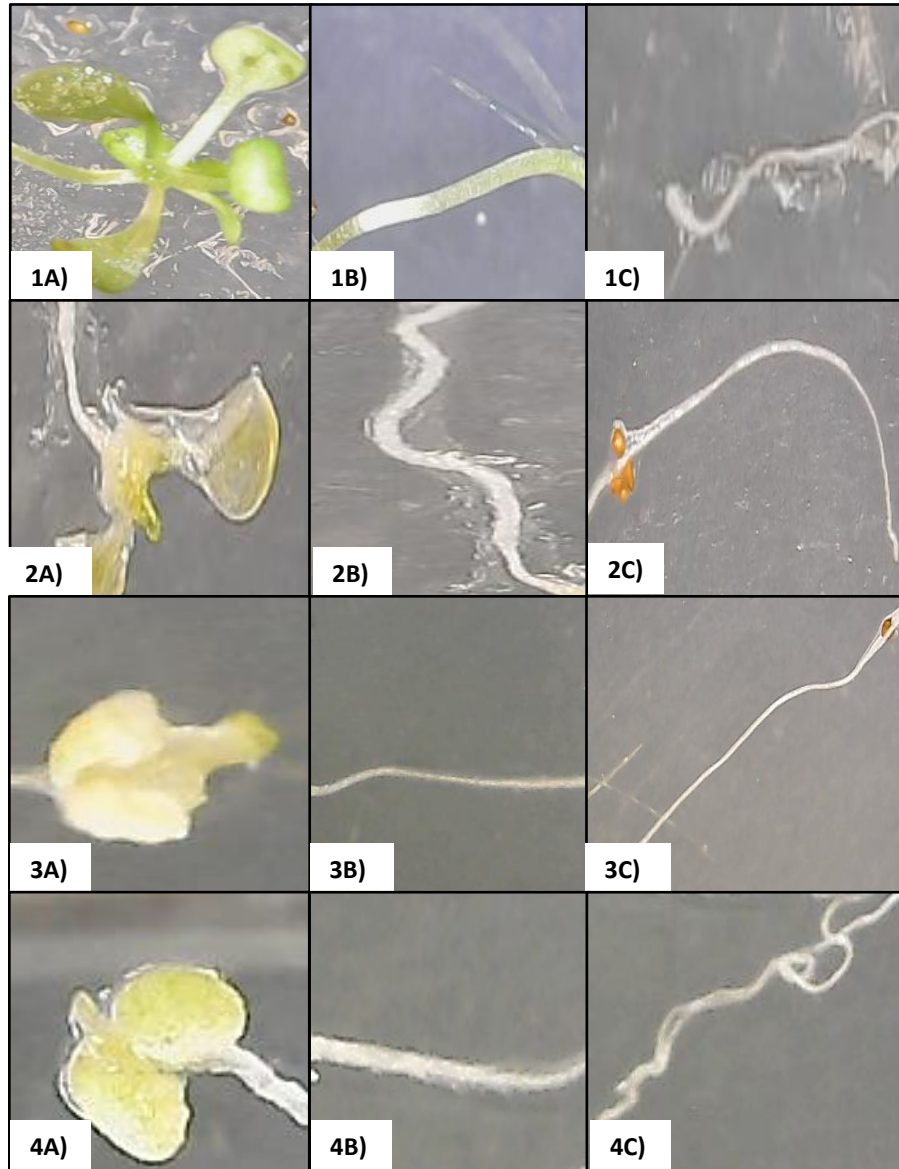
Matriz de correlación de forma gráfica de parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento



En la figura 37 muestra la matriz de correlación de los parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 7 días de tratamiento, se observa una relación negativa del ancho de la hoja con valor de -0.50 con respecto a la concentración del herbicida 2,4-D ($p < 0.05$), es decir existe una inhibición en el crecimiento de la anchura de la hoja conforme se aumenta la concentración del 2,4-D, tanto como tallo, raíz y largo de la hoja no presento una buena relación negativa con forme el aumento de la concentración ($p > 0.05$), no presentó una alta inhibición en el crecimiento provocando poca resistencia al herbicida 2,4-D.

Figura 38

Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en Arabidopsis thaliana durante 14 días de tratamiento obtenidas con Cooling Tech

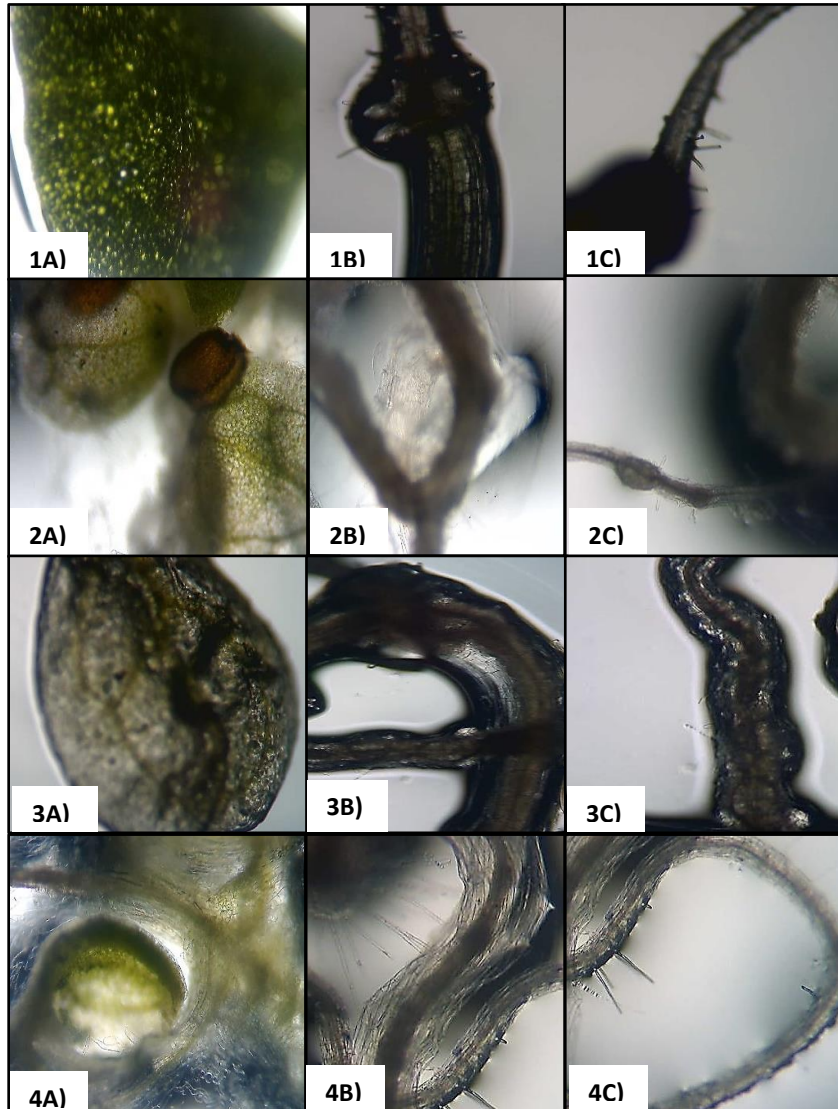


Plántulas control 1A) hoja, 1B) tallo, 1C) raíz. Tratamiento 0.080 mM 2A) hoja, 2B) tallo, 2C) raíz. Tratamiento 0.100 mM de 3A) hoja, 3B) tallo, 3C) raíz. Tratamiento 0.150 mM de 4A) hoja, 4B) tallo, 4C) raíz. (Las fotografías fueron tomadas a 2X con un microscopio digital Cooling Tech).

En la figura 38 se muestran los efectos provocados en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D durante 14 días de tratamiento. La plántula control presenta en 1A) un crecimiento normal de la hoja, en 1B) tallo con una estructura firme y 1C) presencia de pelos radiculares. La concentración 0.080 mM presenta varios efectos en la morfología de la plántula en 2A) existe una epinastia en las hojas con un color verde-amarilloso, indicativo de una disminución de clorofila, 2B) elongación y pérdida de firmeza del tallo y 2C) disminución en el grosor de la raíz. La concentración 0.100 mM se observa efectos morfológicos en la plántula en 3A) presenta una epinastia notoria en las hojas y una coloración amarillosa, 3B) disminución del grosor y color del tallo y 3C) un decrecimiento en el grosor de la raíz. Para la concentración 0.150 mM se observa efectos morfológicos considerables en la plántula donde 4A) exhibe una curvatura notoria alta en las hojas, 4B) pérdida de firmeza y color del tallo y 4C) un alto decrecimiento en el grosor de la raíz con respecto a la plántula control, por lo que, el herbicida 2,4-D induce varios defectos en el crecimiento de la plántula por ejemplo la epinastia de las hojas, la inhibición del crecimiento de raíces y brotes, y una disminución en el área foliar (Teixeira *et al.*, 2007). Con respecto a la comparación de los 7 y 14 días de tratamiento se destaca el tiempo de exposición como un factor determinante en los efectos morfológicos observados, como la disminución de la coloración verdosa característica de las hojas, la reducción de la firmeza del tallo, la disminución del grosor de la raíz. Por lo que un mayor tiempo de exposición de la plántula al herbicida 2,4-D ocasiona un estrés prolongado.

Figura 39

Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en Arabidopsis thaliana durante 14 días de tratamiento obtenidas con Primo Star



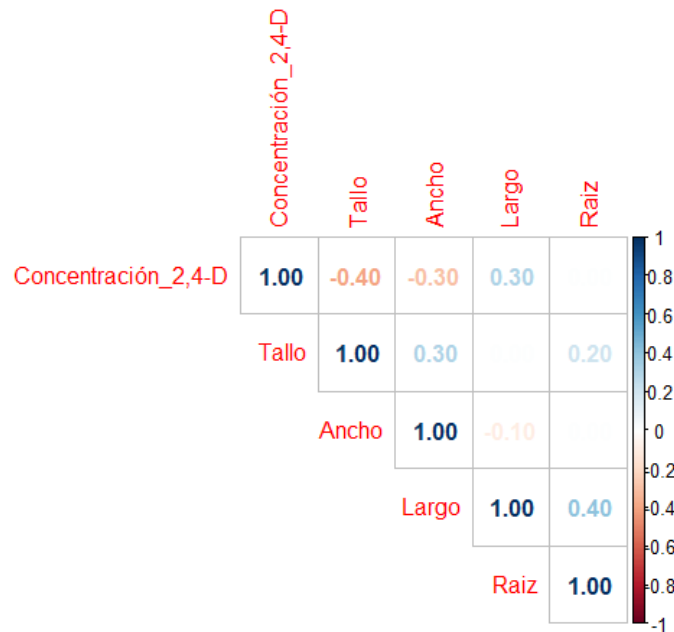
Plántulas control 1A) hoja, 1B) tallo, 1C) raíz. Tratamiento 0.080 mM de 2A) hoja, 2B) tallo, 2C) raíz. Tratamiento 0.100 mM de 3A) hoja, 3B) tallo, 3C) raíz. Tratamiento 0.150 mM de 4A) hoja, 4B) tallo, 4C) raíz. (Las fotografías fueron tomadas a 4X con un microscopio Primo Star marca Zeiss).

En la figura 39 se muestran los efectos provocados en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D durante 14 días de tratamiento. La plántula control presenta en 1A) un crecimiento

normal de la hoja reflejado en la coloración verdosa, en 1B) tallo con una estructura firme y 1C) presencia de pelos radiculares en lo largo de la raíz. La concentración 0.080 mM presenta efectos en la morfología de la plántula en 2A) existe una disminución de color verde en la hoja, indicativo de una disminución de clorofila, 2B) ruptura de los tejidos del tallo y adelgazamiento y 2C) disminución de pelos radiculares. La concentración 0.100 mM se observa efectos morfológicos en la plántula en 3A) presenta una coloración oscura en la hoja, 3B) ruptura de los tejidos del tallo y 3C) disminución de la cantidad de pelos radiculares, así como su longitud. Para la concentración 0.150 mM se observa efectos morfológicos considerables en la plántula donde 4A) exhibe una coloración blanquecina en la hoja, ocasionando una inhibición de fotosíntesis 4B) ruptura del tejido del tallo como se mostró en 0.080mM y 0.100 mM, así como pérdida de coloración comparado con plántula control 4C) pérdida total de pelos radiculares en la raíz con respecto a la plántula control. Existe una relación entre la disminución de los pelos radiculares con la cantidad de clorofila presentes en las hojas, los pelos radiculares absorben los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de las plántulas, así como iones fundamentales, por lo que la disminución del crecimiento de los pelos radiculares disminuye la absorción de iones como el Mg^{2+} , catión fundamental en la constitución de la molécula de la clorofila responsable de la producción de la fotosíntesis reflejado en la coloración de las hojas de la plántula.

Figura 40

Matriz de correlación de forma gráfica de parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento

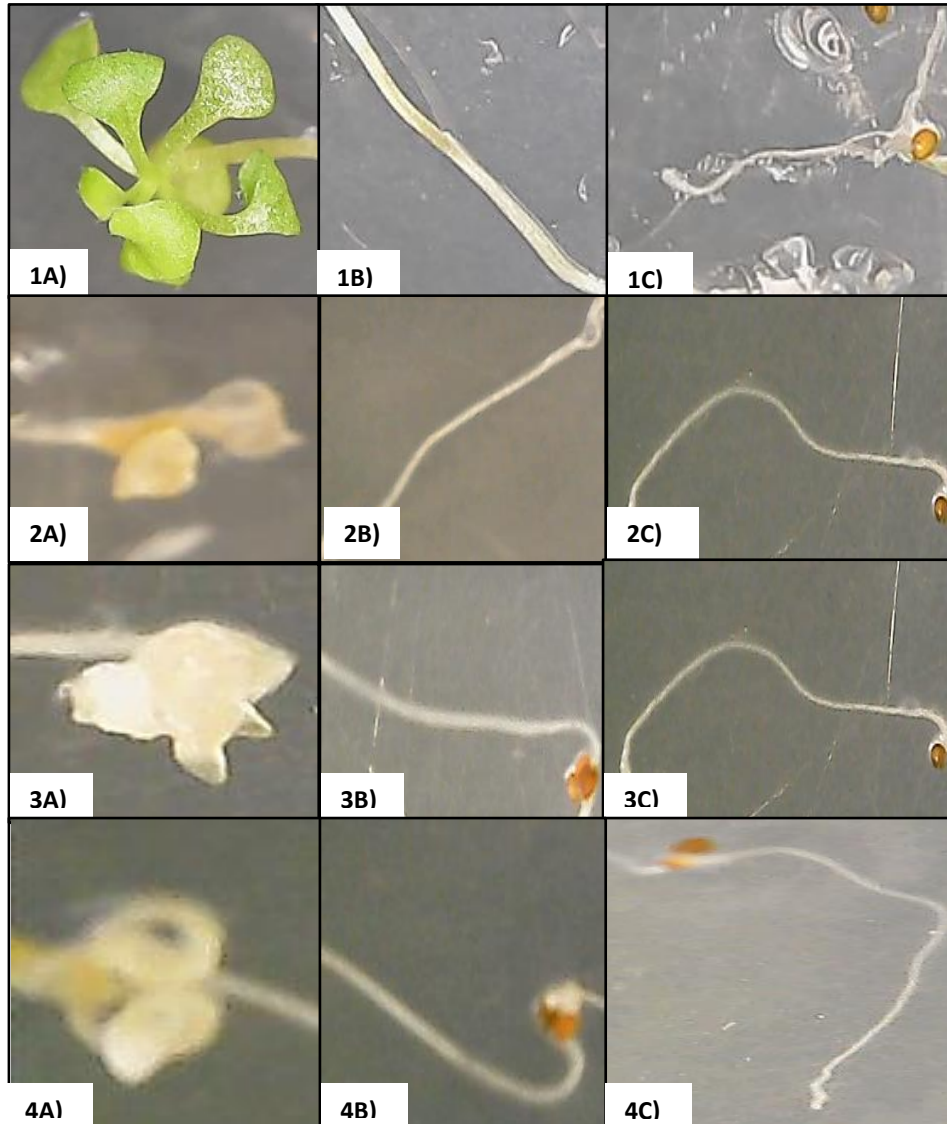


En la figura 40 muestra la matriz de correlación de los parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 14 días de tratamiento, se observa una relación negativa de la longitud del tallo con valor de -0.40 con respecto a la concentración del herbicida 2,4-D ($p < 0.05$), es decir existe una inhibición en el crecimiento de la longitud del tallo conforme se aumenta la concentración del 2,4-D, tanto como raíz, largo y ancho de la hoja no presentó una buena relación negativa con forme el aumento de la concentración ($p > 0.05$), por lo que no presentó una alta inhibición en el crecimiento provocando poca resistencia al herbicida 2,4-D.

Figura 41

Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en Arabidopsis thaliana

durante 21 días de tratamiento obtenidas con Cooling Tech



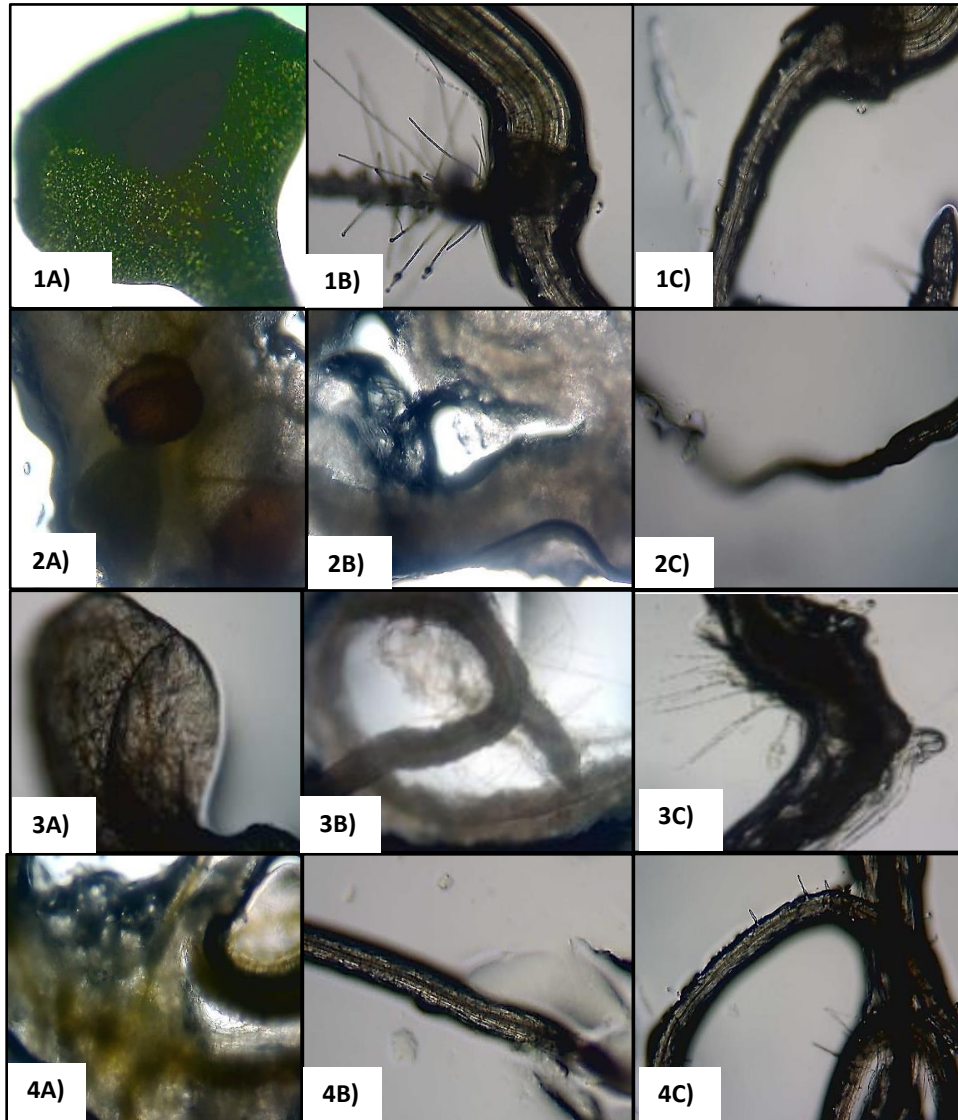
Plántulas control 1A) hoja, 1B) tallo, 1C) raíz. Tratamiento 0.080 mM 2A) hoja, 2B) tallo, 2C) raíz. Tratamiento 0.100 mM de 3A) hoja, 3B) tallo, 3C) raíz. Tratamiento 0.150 mM de 4A) hoja, 4B) tallo, 4C) raíz. (Las fotografías fueron tomadas a 2X con un microscopio digital Cooling Tech).

En la figura 41 se muestran los efectos provocados en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D durante 21 días de tratamiento. La plántula control presenta en 1A) un crecimiento

normal de la hoja, presentando una variación de hojas en 1B) tallo con una estructura firme y 1C) presencia de pelos radiculares. La concentración 0.080 mM presenta varios efectos en la morfología de la plántula en 2A) existe una epinastia en las hojas con un color amarilloso, indicativo de una disminución de clorofila, 2B) elongación y pérdida de firmeza del tallo y 2C) disminución en el grosor de la raíz. La concentración 0.100 mM se observa efectos morfológicos en la plántula en 3A) presenta una epinastia notoria en las hojas y una coloración amarillosa, 3B) disminución del grosor y color del tallo y 3C) un decrecimiento en el grosor de la raíz. Para la concentración 0.150 mM se observa efectos morfológicos considerables en la plántula donde 4A) exhibe una curvatura notoria alta en las hojas, 4B) pérdida de firmeza y color del tallo y 4C) un alto decrecimiento en el grosor de la raíz con respecto a la plántula control. Con respecto a la comparación de los 7, 14 y 21 días de tratamiento se destaca el tiempo de exposición como un factor determinante en los efectos morfológicos observados, como la disminución de la coloración verdosa característica de las hojas, inhibición del crecimiento de otras hojas como se presenta en plántula control, la reducción de la firmeza del tallo, la disminución del grosor de la raíz. Por lo que un mayor tiempo de exposición de la plántula al herbicida 2,4-D ocasiona un estrés prolongado.

Figura 42

Efectos en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D en Arabidopsis thaliana durante 21 días de tratamiento obtenidas con Primo Star



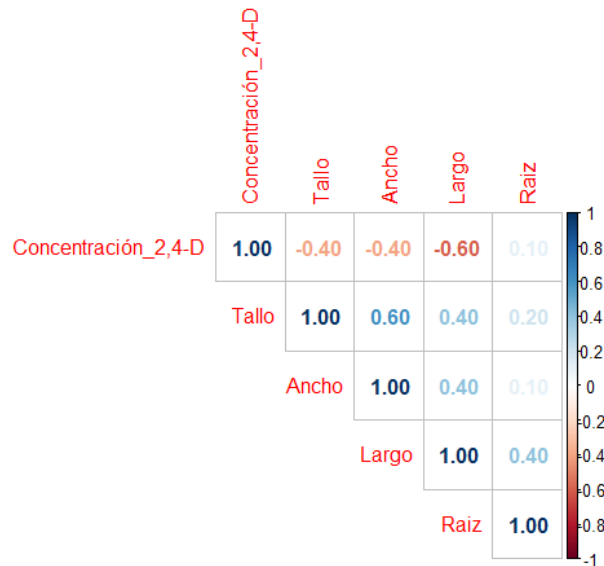
Plántulas control 1A) hoja, 1B) tallo, 1C) raíz. Tratamiento 0.080 mM 2A) hoja, 2B) tallo, 2C) raíz. Tratamiento 0.100 mM de 3A) hoja, 3B) tallo, 3C) raíz. Tratamiento 0.150 mM 4A) hoja, 4B) tallo, 4C) raíz. (Las fotografías fueron tomadas a 4X con un microscopio Primo Star marca Zeiss).

En la figura 39 se muestran los efectos provocados en hoja, tallo y raíz a diferentes concentraciones del 2,4-D durante 14 días de tratamiento. La plántula control presenta en 1A) un crecimiento

normal de la hoja reflejado en la coloración verdosa, en 1B) tallo con una estructura firme y 1C) presencia de pelos radiculares en lo largo de la raíz. La concentración 0.080 mM presenta efectos en la morfología de la plántula en 2A) existe una disminución de color oscura en la hoja, indicativo de una alta disminución de clorofila, 2B) ruptura de los tejidos del tallo y 2C) disminución de pelos radiculares, así como grosor de la raíz. La concentración 0.100 mM se observa efectos morfológicos en la plántula en 3A) presenta una coloración oscura en la hoja, 3B) ruptura de los tejidos del tallo y 3C) disminución de la cantidad de pelos radiculares, así como su longitud. Para la concentración 0.150 mM se observa efectos morfológicos considerables en la plántula donde 4A) exhibe una coloración oscura en la hoja, ocasionando una inhibición de fotosíntesis 4B) ruptura del tejido del tallo como se mostró en 0.080mM y 0.100 mM, así como pérdida de coloración comparado con plántula control 4C) pérdida total de pelos radiculares en la raíz con respecto a la plántula control. Existe una relación entre la disminución de los pelos radiculares con la cantidad de clorofila presentes en las hojas, los pelos radiculares absorben los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de las plántulas, así como iones fundamentales, por lo que la disminución del crecimiento de los pelos radiculares disminuye la absorción de iones como el Mg^{2+} , catión fundamental en la constitución de la molécula de la clorofila responsable de la producción de la fotosíntesis reflejado en la coloración de las hojas de la plántula.

Figura 43

Matriz de correlación de forma gráfica de parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento



En la figura 43 muestra la matriz de correlación de los parámetros fisiológicos a diferentes concentraciones del herbicida 2,4-D durante 21 días de tratamiento, se observa una relación negativa de la longitud del largo de la hoja con valor de -0.60 con respecto a la concentración del herbicida 2,4-D, también la anchura de la hoja y la longitud del tallo con un valor de -0.40 ($p < 0.05$), es decir existe una inhibición en el crecimiento de la longitud del largo de la hoja, así como la anchura de la hoja y la longitud del tallo conforme se aumenta la concentración del 2,4-D, la raíz, no presentó una buena relación negativa con forme el aumento de la concentración ($p > 0.05$), por lo que no presentó una inhibición adecuada en el crecimiento de la raíz provocando poca resistencia al herbicida 2,4-D.

8. CONCLUSIONES

Los cálculos teóricos demostraron que la estructura de la molécula del 2,4-D tomada del sistema cristalino presenta una similitud de 98.02% con respecto a la molécula tomada del complejo proteico TIR1-ASK1. Mientras en el caso del IAA presenta una similitud el 99.03% entre la que fue tomada del sistema cristalino y la que se encuentra en el complejo proteico.

Los estudios teóricos demostraron que la reactividad local de la molécula del 2,4-D aislado, del sistema cristalino presentó una mayor preferencia en los átomos de cloro del anillo fenólico para los ataques electrofílico, nucleofílico y por radicales libres. Los ataques electrofílicos del 2,4-D extraído de la proteína TIR1-ASK1 se ubica en el C12, mientras que los ataques nucleofílicos y por radicales libres se ubican en el H3 por lo que estos sitios se encuentran más localizados.

También se demostró que la reactividad local de la molécula IAA tomada del sistema cristalino presento una distribución en la parte indólica de la molécula teniendo mayor preferencia en el C3 y C5 para un ataque nucleofílico, el C7 para un ataque electrofílico y C8 para un ataque por radicales libres. Mientras que el IAA extraído de la proteína TIR1-ASK1 los sitios reactivos son más localizados teniendo al ataque nucleofílico y por radicales libres en H9 y el ataque electrofílico en C7.

La reactividad global es mayor cuando la molécula de 2,4-D interacciona con los aminoácidos del complejo proteico que con respecto al 2,4-D tomado del sistema cristalino, esto se debe a que presenta una mayor blandura y menor dureza lo que indica una mayor reactividad. Así como para el IAA su reactividad global es mejor cuando esta interaccionando con el complejo proteico que con el IAA tomado del sistema cristalino y del complejo proteico.

El estudio teórico demostró que el 2,4-D es más reactivo que la auxina natural IAA tanto en la reactividad global como local, por lo que el compuesto es más afín a los receptores por su alta afinidad con respecto a la auxina natural y se comprobó de manera experimental el efecto del 2,4-D con las plántulas *Arabidopsis thaliana* donde hubo cambios morfológicos en la longitud de la raíz, tallo, largo y ancho de la hoja, así como en la disminución de la cantidad de clorofila en presencia del herbicida 2,4-D.

El análisis estadístico demuestra que el aumento de la concentración del herbicida 2,4-D disminuye la concentración de la clorofila presente en la *Arabidopsis thaliana* durante 7, 14 y 21 días de tratamiento, esto debido a que se encuentra en una mayor concentración y tiempo prolongado de un agente químico, provocando en la plántula un mayor tiempo de estrés.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adamowski, M., & Friml, J. (2015). PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution. *The Plant Cell*, 27(1), 20–32. <https://doi.org/10.1105/TPC.114.134874>
- Anie, D., & Ar No N, L. I. (1949). COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS. *Plant Physiology*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.1104/PP.24.1.1>
- Ayers, P. W., & Parr, R. G. (2008). Local hardness equalization: Exploiting the ambiguity. *The Journal of Chemical Physics*, 128(18), 184108. <https://doi.org/10.1063/1.2918731>
- Benning, C. (1986). Evidence supporting a model of voltage-dependent uptake of auxin into Cucurbita vesicles. *Planta*, 169, 228–237.
- BIOVIA. (2016). *DMOL3 GUIDE*.
- Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship, R. E., & Govindjee. (2009). A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynthesis Research*, 99(2), 85–98. <https://doi.org/10.1007/S11120-008-9395-X/FIGURES/6>
- Carmen, M. (2015). *Análisis de emisión de volátiles en Arabidopsis thaliana. Efecto de la sobreexpresión del gen CrDOF*.
- Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z. L., Neilan, B. A., & Scheer, H. (2010). A red-shifted chlorophyll. *Science*, 329(5997), 1318–1319. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1191127/SUPPL_FILE/CHENM.SOM.PDF
- Cruz López, S. (2022). *GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS PARA ESTUDIAR LA RESPUESTA HIPERSENSIBLE EN Arabidopsis thaliana*.
- De, H., De, C., de Titulación, T., & Gallegos, J. C. (2019). *Evaluación del crecimiento y la susceptibilidad a patógenos después de la aplicación de dosis mínimas de glifosato en Arabidopsis thaliana*.
- Delley, B. (1990). An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *The Journal of Chemical Physics*, 92(1), 508–517. <https://doi.org/10.1063/1.458452>
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 84–98. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620200108>

- Dindas, J., Scherzer, S., Rob, M., Roelfsema, G., von Meyer, K., Müller, H. M., Al-Rasheid, K. A. S., Palme, K., Dietrich, P., Becker, D., Bennett, M. J., & Hedrich, R. (2018). *AUX1-mediated root hair auxin influx governs SCF TIR1/AFB-type Ca²⁺ signaling*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03582-5>
- Fendrych, M., Akhmanova, M., Merrin, J., Glanc, M., Hagihara, S., Takahashi, K., Uchida, N., Torii, K. U., & Friml, J. (2018). Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signalling. *Nature Plants* 2018 4:7, 4(7), 453–459. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0190-1>
- Fukui, K. (1982). Role of frontier orbitals in chemical reactions. *Science*, 218(4574), 747–754. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.218.4574.747/ASSET/B9BD09F7-1601-4DAF-A19F-C5E58CF6CA9A/ASSETS/SCIENCE.218.4574.747.FP.PNG>
- Fukui, K., & Fujimoto, H. (1997). *Frontier Orbitals and Reaction Paths*. 7. <https://doi.org/10.1142/2731>
- Gaultier, J., Farenhorst, A., Cathcart, J., & Goddard, T. (2008). Degradation of [carboxyl-¹⁴C] 2,4-D and [ring-U-¹⁴C] 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 217–227. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2007.08.003>
- Hertel, R., Lomax, T. L., & Briggs, W. R. (1983). Auxin transport in membrane vesicles from *Cucurbita pepo* L.*. In *Planta* (Vol. 157). Springer-Verlag.
- Hiscox A N, J. D., & Israelstam, D. G. F. (1979). *A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration*. www.nrcresearchpress.com
- Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S. S., Xu, L., Zhu, J., Zhao, M., Muños, S., Li, Q. X., & Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. In *Environment International* (pp. 332–351). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>
- Juan, V. F., Núñez Fré, F. R., Saint-André, H. M., & Fernández, R. R. (2021). Responses of 2,4-D resistant *Brassica rapa* L. biotype to various 2,4-D formulations and other auxinic herbicides. *Crop Protection*, 145, 105621. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2021.105621>
- Kasprzewska, A., Carter, R., Swarup, R., Bennett, M., Monk, N., Hobbs, J. K., & Fleming, A. (2015). Auxin influx importers modulate serration along the leaf margin. *The Plant Journal*, 83(4), 705–718. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12921>
- Koopmans, T. (1934). Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. *Physica*, 1(1–6), 104–113. [https://doi.org/10.1016/S0031-8914\(34\)90011-2](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(34)90011-2)
- Mula, J. A. (2022). *¿Cuáles son los mejores herbicidas para tu cultivo? - Agromática*. <https://www.agromatica.es/herbicidas-usados-la-agricultura/>

- Munro, I. C., Carloi, G. L., Orr, J. C., SUNDt, K. G., Wilson, R. M., Kennepohl, E., Lynch, B. S., JABLINSKEt, M., & Lee, N. L. (1992). Kansas State University; Saxon Graham. In *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF TOXICOLOGY* (Vol. 11, Issue 5). American Health Foundation.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
<https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X>
- Nigović, B., Antolić, S., Kojić-Prodić, B., Kiralj, R., Magnus, V., & Salopek-Sondi, B. (2000). Correlation of structural and physico-chemical parameters with the bioactivity of alkylated derivatives of indole-3-acetic acid, a phytohormone (auxin). *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 56(1), 94–111.
<https://doi.org/10.1107/S0108768199006199/HA01817-ME-IAASUP7.SFT>
- O., D. S. (1996). Herbicide-resistant crops-Background and perspectives. *Herbicide-Resistant Crops-Agricultural, Environmental, Economic,Regulatory, and Technical Aspects*, 1–10.
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1574231874223494656.bib?lang=ja>
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C., & Bennett, M. J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1. *Plant Journal*, 25(4), 399–406. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2001.00970.X>
- Pattanasupong, A., Nagase, H., Inoue, M., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., & Miyamoto, K. (2004). Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 517–522.
<http://www.env.go.jp/chemi/end/ref4/>
- Pearson, R. G. (1986). Ionization Potentials and Electron Affinities in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society*, 108(20), 6109–6114.
https://doi.org/10.1021/JA00280A002/ASSET/JA00280A002.FP.PNG_V03
- Pearson, R. G. (2005). Chemical hardness and density functional theory. In *J. Chem. Sci* (Vol. 117, Issue 5).
- Pearson, R. G., & Songstad, J. (1967). Application of the Principle of Hard and Soft Acids and Bases to Organic Chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 89(8), 1827–1836.
https://doi.org/10.1021/JA00984A014/ASSET/JA00984A014.FP.PNG_V03
- Perdew, J. P., Burke, K., & Ernzerhof, M. (1996). Generalizado Gradiente Aproximación Hecho Simple. *Physical Review Letters*, 77(18), 3865.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>
- Salcedo, M. F., Mansilla, A. Y., Colman, S. L., Iglesias, M. J., Alvarez, V. A., & Casalongué, C. A. (2021). Efficacy of an organically modified bentonite to adsorb 2,4-

- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and prevent its phytotoxicity. *Journal of Environmental Management*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113427>
- Sandalio, L. M., Rodríguez-Serrano, M., & Romero-Puertas, M. C. (2016). Leaf epinasty and auxin: A biochemical and molecular overview. *Plant Science*, 253, 187–193. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2016.10.002>
- Schuijt, L. M., Peng, F. J., van den Berg, S. J. P., Dingemans, M. M. L., & van den Brink, P. J. (2021). (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. *Science of the Total Environment*, 795. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148776>
- Sheldrake, A. R. (1974). Carrier-mediated Auxin Transport*. *Planta (Berl.)*, 118, 101–121.
- Sieró, L., Kobylecka, J., & Turek, A. (2011). Crystal Packing and Supramolecular Motifs in Four Phenoxyalkanoic Acid Herbicides-Low-Temperature Redeterminations. *Organic Chemistry International*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/608165>
- Singh, G., Retzer, K., Vosolsobě, S., & Napier, R. (2018). Advances in Understanding the Mechanism of Action of the Auxin Permease AUX1. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 3391, 19(11), 3391. <https://doi.org/10.3390/IJMS19113391>
- Smit, M. G. D., Bechmann, R. K., Hendriks, A. J., Skadsheim, A., Larsen, B. K., Baussant, T., Bamber, S., & Sannei, S. (2009). Relating biomarkers to whole-organism effects using species sensitivity distributions: A pilot study for marine species exposed to oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(5), 1104–1109. <https://doi.org/10.1897/08-464.1>
- Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(2), 106–113. <https://doi.org/10.1111/JIPB.12131>
- Stephanos, J. J., & Addison, A. W. (2017). *Electrons, Atoms, and Molecules in Inorganic Chemistry: A Worked Examples ... - Joseph J. Stephanos, Anthony W. Addison - Google Libros*. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=vRITDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Joseph+J.+Stephanos,+Anthony+W.+Addison,+Chapter+6+-+Molecular+Orbital+Theory,+Editor\(s\):+Joseph+J.+Stephanos,+Anthony+W.+Addison,+Electrons,+Atoms,+and+Molecules+in+Inorganic+Chemistry,+Academic+Press,+2017&ots=2ZnbH4X_jJ&sig=yoCOwrwmaasiKw8yX1WwYutteVo#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=vRITDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Joseph+J.+Stephanos,+Anthony+W.+Addison,+Chapter+6+-+Molecular+Orbital+Theory,+Editor(s):+Joseph+J.+Stephanos,+Anthony+W.+Addison,+Electrons,+Atoms,+and+Molecules+in+Inorganic+Chemistry,+Academic+Press,+2017&ots=2ZnbH4X_jJ&sig=yoCOwrwmaasiKw8yX1WwYutteVo#v=onepage&q&f=false)
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I. A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. v., Estelle, M., & Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 2007 446:7136, 446(7136), 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature05731>

- Teixeira, M. C., Duque, P., & Sá-Correia, I. (2007). Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 25, Issue 8, pp. 363–370). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.06.002>
- Zafra-Lemos, L., Cusioli, L. F., Bergamasco, R., Borin-Carvalho, L. A., & Portela-Castro, A. L. de B. (2021). Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae) and the potential for its removal from contaminated water using a biosorbent. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 865. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2021.503335>