

Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia

EFFECTOS DEL PLOMO SOBRE EL CRECIMIENTO  
Y METABOLISMO DE PLANTAS DE NICOTIANA RUS-  
TICA.

*Tesis para optar al grado de licenciado en  
farmacia presentada por Francisco Viladomat Meja*

*Dirigida por el Dr. Manuel Serrano Garcia y la Dna. Carmen Morales Pujol*

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701478306

*Expreso mi sincero agradecimiento al  
Dr. M. Serrano y a la Dra. C. Morales por  
su dirección y estímulo en el desarrollo  
del presente trabajo.*

*A la Dra. M<sup>te</sup> T. Piñal mi reconocimien-  
to por su orientación y ayuda.*

*El éxito de la investigación aplicada a problemas prácticos depende de una gran cantidad de conocimientos fundamentales.*

*Para muchos sabios de espíritu creador, el aspecto práctico es el que más les estimula; otros viven del ansia de explorar los secretos de la naturaleza, por el anhelo de hallar nuevas leyes naturales. Ambos grupos forman parte de lo que se llama "ciencia". La ciencia no es, como algunos la definirían, "una serie ordenada de conocimientos...". La ciencia no es una masa de conocimientos. Es pensamiento disciplinado, curiosidad, inventiva, lo son los sabios mismos y los métodos que utilizan. Es la esperanza de que haya orden en el universo; de que el hombre encontrará este orden; de que algún día será capaz de controlar cuanto le rodea y de lo que ahora es poco menos que un esclavo. Todo esto y mucho más constituye el conjunto dinámico, eternamente mudable, llamado "ciencia".*

*Pero la ciencia "no hará del mundo un sitio mejor donde vivir", ni tampoco "destruirá el mundo". Será el hombre quien lo haga. La ciencia le ha proporcionado los instrumentos para hacer una u otra cosa: la elección recae en la conciencia individual.*

W. J. Cromie

## INDICE

	<u>Pag</u>
- INTRODUCCION _____	8
- PLANIFICACION DEL TRABAJO _____	28
- Obtención de cultivos de <i>Nicotiana rustica</i> L. _____	29
- Transplante a vermiculita _____	29
- Tratamiento con plomo _____	32
- Toma de muestra y obtención del curso de crecimiento _____	34
- Investigación de las posibles acciones del plomo sobre el metabolismo de las plantas de <i>Nicotiana rustica</i> L. _____	35
- Análisis de pigmentos liposolubles _____	36
- Análisis de ácidos nucleicos _____	38
- Obtención de las curvas patrón de ADN y ARN. _____	42
- Análisis de proteínas _____	45

	<u>Pag.</u>
- Obtención de la curva patrón de proteínas -----	47
- Análisis de aminoácidos por cambio iónico -----	49
- Reconocimiento y determinación cuantitativa de los aminoácidos en el cromatograma -----	56
- Análisis de nicotina -----	58
- Obtención de la curva patrón de nicotina -----	61
- RESULTADOS Y SU DISCUSION -----	64
- Crecimiento -----	64
- Peso fresco y peso seco -----	65
- Pigmentos liposolubles -----	79
- Acidos nucleicos -----	90
- Proteínas -----	114
- Aminoácidos libres -----	127
- Nicotina -----	155

	<u>Pag</u>
- CONCLUSIONES Y COLETILLA FINAL	167
- BIBLIOGRAFIA	170

## INTRODUCCION

En el estudio del metabolismo de las plantas son muchos los factores externos que debemos tener en cuenta: humedad, luz, temperatura, composición de la atmósfera que las rodea, ph del suelo y elementos minerales que el suelo pone a su disposición.

Hasta hace relativamente pocos años, no existía para el hombre, en relación al cultivo vegetal, otra preocupación que el abonado conveniente. Pero en la actualidad la industria, nuestra manera de vivir, de curar las enfermedades y de evitar plagas han creado, y cada vez lo agudizan mas, el problema de la contaminación, ya sea atmosférica o del agua, y como consecuencia de todo ello la del suelo.

Nos proponemos en este trabajo, determinar el efecto del plomo sobre el metabolismo de Nicotiana rustica L. Para ello lo adicionamos a la solución nutritiva. El plomo tendrá que ser absorbido ( y translocado ) por la planta para ejercer influencia en ella.

A fin de situar el problema, iniciaremos la introducción de este trabajo con unas nociones básicas sobre la nutrición mineral y la absorción esencialmente de los metales pesados.

Si tomamos una planta, la secamos y calcinamos obtendremos un residuo mineral. DE SAUSSURE ( 1 ) fué el primero en reconocer la necesidad, por parte de la planta, de los elementos contenidos en el suelo, y demostró claramente que los elementos minerales inorgánicos contenidos en las cenizas de las plantas proceden del suelo, tomados a través del sistema absorbente de las raíces. A pesar de las importantes pruebas experimentales presentadas en el trabajo de DE SAUSSURE, la contribución de las sustancias inorgánicas de las cenizas de las plantas al funcionamiento general de estas no fué reconocida hasta que LIEBIG volvió a defenderla, ya a mediados del siglo pasado.

Para determinar los elementos minerales necesarios para las plantas se pueden seguir dos caminos: analizar las plantas (método analítico) o por medio de cultivos hidropónicos, iniciados por SACHS y KNOP en 1860 (método sintético). Estos autores lograron demostrar la existencia de elementos necesarios para las plantas, como C, H, O, N, P, K, Ca, S, Mg, Fe. Debido a que los métodos analíticos de aquellos tiempos eran poco precisos, no pudieron detectar las pequeñas cantidades de micronutrientes que también necesitan las plantas.

ARNON y STOUT ( 2 ) definieron las condiciones necesarias para establecer la esencialidad de los nutrientes. Según estos autores, un elemento es esencial cuando:

La planta no puede completar su ciclo reproductivo o vegetativo en ausencia de dicho elemento, produciéndose una enfermedad de carencia.



*El elemento debe ser irremplazable.*

*Actúan directamente sobre las funciones de la planta.*

*Además, deben ser susceptibles de detectar por los aparatos de medida.*

*Hasta el momento se han encontrado 15 elementos esenciales*

*C, H, O, N, S, P, K, Mg, Ca ( macronutrientes )*

*Cl, Fe, B, Mn, Cu, Zn ( micronutrientes )*

*Los micronutrientes se necesitan en pequeñas cantidades. A veces, estas necesidades son tan pequeñas que las semillas tienen ya suficiente cantidad para que la planta pueda completar un ciclo vegetativo, siendo necesario resembrarla dos veces, por lo menos, para demostrar la necesidad de tales micronutrientes.*

*Se ha demostrado también que hay otros elementos esenciales para el crecimiento normal de ciertas plantas, entre ellos se encuentran: Na, Al, Si, Cl. ( 3, 4 ).*

*Las células de las plantas tienen una composición compleja y necesitan estar en un medio complejo, completo y equilibrado, en cuanto a iones minerales se refiere.*

*Se ha comprobado que el agua destilada es tóxica para las plantas, y también lo es una solución de una sal pura. Cuando un elemento está en deficiencia y los demás en un nivel adecuado la planta reacciona de manera que toma mayor cantidad de los elementos en buen nivel y el desequilibrio de iones en su interior se acentúa.*

Todos los elementos esenciales deben hallarse dentro de unos límites. Fuera de ellos, un exceso produce toxicidad y un defecto enfermedad de carencia. Estos límites son mayores para los macronutrientes que para los micronutrientes.

Hay un grupo de elementos que son acumulados y metabolizados por las plantas, sin ser esenciales para algunas o todas las plantas ( 5 ). Estos elementos no cumplen enteramente con las reglas de ARNON. NICHOLAS ( 6 ) propone el término "nutrientes funcionales", en contraste con "nutrientes esenciales", para incluir algunos nutrientes minerales que desempeñan una función en algún aspecto metabólico, prescindiendo de si esta acción es completamente específica o indispensable.

---

Excepto el carbono que es absorbido por las partes verdes, y el hidrógeno y el oxígeno que forman parte del agua, los nutrientes son generalmente absorbidos por las plantas a través de sus raíces. Estos nutrientes para ser absorbidos deben estar en forma disponible. Esta disponibilidad la podemos conseguir de tres maneras:

Si los elementos están en solución en el medio acuoso del suelo.

Si están solubilizados en forma de quelatos.

O por intercambio iónico, si se hallan adsorbidos a las partículas

coloidales.

Los micronutrientes que con a la vez metales pesados acostumbran a ser bastante insolubles y tienen que solubilizarse en forma de quelatos. En el suelo existe una parte orgánica muy compleja ( humus ) capaz de quelatizar estos elementos, solubilizarlos, y así hacerlos asequibles a las plantas.

En la absorción consideraremos dos fases.

Pasiva ( reversible y rápida )

Activa ( irreversible y lenta )

En la fase pasiva, la rápida absorción inicial no se ve influida por la temperatura ni por las inhibiciones metabólicas, es decir, no es más que un proceso físico ( 7 ).

En la fase activa interviene la energía metabólica ligada a la fosforilación oxidativa; EPSTEIN en 1956 ( 8, 9 ) la explica mediante la teoría de los transportadores.

Por medio de la fase activa, los nutrientes llegan al xilema y al floema. Parece ser que circulan por el xilema, pero al estar el xilema y el floema en íntimo contacto puede haber una circulación horizontal de uno a otro, y a causa de ellos hacen difícil el reconocimiento de la verdadera vía de circulación ( 10 ).

---

*Dada la naturaleza de nuestro trabajo, nos referiremos previamente a la absorción y tolerancia de los metales pesados, particularmente del plomo.*

*Debemos tener en cuenta si realmente estos elementos son absorbidos y en que proporción, también debemos tener en cuenta si ejercen algún efecto sobre los vegetales o sobre los animales consumidores de estos vegetales.*

*Tal como ya hemos citado, las sales de los metales pesados son bastante insolubles y para que sean absorbidas deben solubilizarse en forma de quelatos. El humus del suelo puede quelatizarlos, y así solubilizarlos, y hacer en definitiva su incorporación a la planta.*

*BAYER y col ( 11 ) propugnaron que la especificidad y la estructura de los agentes orgánicos quelatizantes era muy notable. Demostraron que la selectiva ligazón del cobre con hemocianina depende de la disposición espacial de los grupos de cisteína, y posiblemente de los grupos imidazólicos de la histidina. Sintetizaron además ligandos orgánicos que mostraban gran especificidad para algunos metales como oro, cobre y uranio.*

*AUQUIER y col ( 12 ) establecieron el contenido de zinc, plomo, cobre y manganeso en Festuca comparando poblaciones que crecían en tierra contaminada con otras poblaciones que crecían en tierra no contaminada. Observaron un alto contenido de estos elementos en las raíces, lo que representa una evidente barrera a la contaminación. Si las plantas contaminadas por estos metales eran trasladadas a un cultivo normal, el nivel de los metales en las raíces descendía.*

LIEBHARDT y col ( 13 ), mediante la siembra de especies selectas de *Zea mays*, *Glicine max*, *Lolium perenne*, *Phaseolus vulgaris* en tierra, a la que se incorporaban distintas proporciones de humus ciclo-lite<sup>TM</sup>, que contenía plomo, observaron que el nivel de plomo en el ápice de crecimiento de las plantas crecidas en estos medios no era elevado, ni siquiera cuando el humus contenía 300 ppm de plomo. Se puede deducir que la absorción pasiva de los elementos pesados es relativamente fácil, en cambio la activa depende en gran manera del agente quelatizante.

La tolerancia de muchas especies vegetales a elevadas concentraciones de metales pesados nos permite reconocer el tipo de elemento mineral pesado que contiene el sustrato en que vive. Esta técnica a sido usada en prospecciones geobotánicas principalmente en la Unión Soviética ( 14, 15 ): Podemos seguir en este aspecto tres caminos distintos. a) Por la distribución de las especies más afectadas por los minerales buscados ( indicador planta ). b) Por la observación de cambios fisiológicos y morfológicos de las plantas. c) Por detección de diferencias en la composición de las plantas ( 14 ).

Las plantas indicadoras pueden ser universales o locales. Seran universales cuando las especies de referencia indican siempre la presencia de un elemento. Ejem: Ciertas especies de *Astragalus* para el selenio y uranio. Seran locales cuando estan mejor adaptadas y predominan en estos yacimientos. Ejem: Ciertas especies de *Alyssum* con el niquel ( 15, 16 ).

Las bases fisiológicas de la tolerancia de altas concentraciones de

algunos elementos en plantas indicadoras no han sido estudiadas, pero las plantas se desarrollan mejor si estos elementos se hallan en el suelo. Así, las cenizas de *Alissum bertolonii* contienen más de 10% de níquel.

La observación de cambios morfológicos en plantas causados por efectos tóxicos también pueden mostrar diferencias. Ejem: *Anemona pulsatilla*, cuando crece sobre níquel, muestra una reducción de las hojitas del desarrollo floral y una total desaparición de pétalos ( 11, 15 ).

La diferencia en la composición de las plantas. Existe una correlación entre la composición de las plantas y el soporte del medio. Por este camino se pueden detectar yacimientos de oro, berilio, etc.

En algunas plantas, el exceso de algunos metales, como manganeso, cromo, cobre, zinc, cobalto y níquel pueden inducir síntomas aparentemente idénticos a las deficiencias de hierro en forma oxidada. La relativa actividad de los metales en la inducción de clorosis parece ser el responsable de la estabilidad de los complejos organo-metálicos.

AUQUIER y col ( 12 ) demostraron que plantas que tenían en sus raíces altos niveles de zinc, plomo, cobre, manganeso y se transplantaban a un cultivo normal, al cabo de unos años tenían un contenido muy pequeño de estos elementos en sus raíces, aumentaban la vitalidad y revelaban una resistencia a los metales pesados y una ecofisiológica independencia a la presencia de metales pesados en el suelo.

Varias especies de *Agrostis* s. p. presentan considerables diferencias en la tolerancia al cobre, níquel, plomo, zinc, de acuerdo con el

origen de estos metales ( 17, 18, 19 ), esto sugirió la posibilidad de tolerancia a los metales pesados, incorporándose con quelatizaciones específicas de estos metales.

Se ha observado una rápida acumulación de varios metales pesados en esporas de varias especies de hongos. Cuando las esporas fueron desintegradas se encontraron grandes cantidades de isótopos principalmente en las partículas citoplasmáticas. La acción fungicida de estos iones parece ser debida a la inactivación enzimática ( 11 ).

Respecto a la tolerancia de los metales pesados por parte de las plantas podemos decir que hay una gran diversidad de efectos. Hay elementos que favorecen el desarrollo de determinadas plantas y lo inhiben en otras. Por otra parte, vemos que hay elementos que son tóxicos para determinadas plantas, pero esta toxicidad se muestra de distinta manera en las distintas plantas, desde el punto de vista morfológico, fisiológico y de composición. Además se puede producir una diferencia en la tolerancia según la forma del elemento. Incluso parece ser que se puede producir una adaptación.

---

El plomo no es esencial en el crecimiento de las plantas aunque algún investigador ha encontrado efectos beneficiosos aparentes en su presencia. BERRY en 1954 ( 20 ) comparó el nitrato de plomo con el nitrato potásico

como fuente de nitrógeno y encontró que eran iguales las dos fuentes en sus cualidades fertilizantes. Al aplicar mucho nitrato de plomo no se incrementaba el contenido de plomo en las plantas, lo que indicaba que quizá no fuese absorbido. También observó un incremento en la relación entre la nitrificación de los suelos y las sales de plomo.

Dos investigadores alemanes VON SCHARRER y SCHROPP, en 1936 ( 21 ), observaron efectos favorables sobre cebada, avena, maíz y trigo, aplicando soluciones de acetato de plomo. Solo concentraciones grandes (  $10^{-2}$  mg/25m ) eran dañinas para el maíz.

KEATON ( 22 ) en 1937 aplicó 7,19 libras de carbonato de plomo a suelos, y observó un estímulo en el crecimiento de la cebada. El contenido de plomo en los ápices incrementaba muy poco, pasaba de trazas a 3 ppm. En las raíces que contenían aproximadamente 1,475 ppm de óxido de plomo, el incremento era muy superior.

Sales de plomo añadidas a suelos ácidos parecen favorecer el crecimiento del pino, no ejercen efecto sobre el abeto rojo, y son dañinas para el roble y el abedul.

La toxicidad relativa del cloruro de plomo, arseniato de plomo y arseniato sódico fué estudiada por CHILDERS ( 21 ). El arseniato sódico se mostró más tóxico que el de plomo, mientras que grandes concentraciones de cloruro de plomo no causaban efectos adversos. 200 ppm de sales de plomo añadidas a soluciones de cultivo no ejercían efectos depresores sobre manzanas y uvas. El arseniato de plomo es la forma más utilizada como plagui-



cida, y su toxicidad podría deberse más al efecto del arsénico que al del plomo.

El resultado de estudios similares en la Universidad de California, indicaban que no se producían efectos significativos con 150 ppm de plomo, sobre el crecimiento de naranjas dulces.

PRAT en 1927 ( 23 ) con plomo  $10^{-4}$  M encontró que las plantas de semillero de *Vicia fava* absorbían el plomo en menos de tres días, pero creciendo muy poco. La proporción de la absorción disminuye separando los cotiledones de las plantas jóvenes.

HOOPER en 1937 ( 21 ) encontró que las judías francesas eran dañadas con soluciones de 30ppm de plomo en forma de sulfato u otras sales.

Las plantas rociadas con soluciones de sulfato de plomo no sufrían daño a menos que quedasen suficientes residuos de plomo sobre los estómagos.

Según BRADSHAW ( 24 ), si el *Agrostis tenuis* crecía en suelos con el 1% de plomo , poseía mejor adaptación a las bajas concentraciones de calcio y de fosfatos.

WILKINS en 1957 ( 25 ), al observar el crecimiento de *Festuca ovina* usando como fuente de nitrógeno soluciones de nitrato de plomo, encontró que el crecimiento de las raíces se retardaba con 10 ppm de plomo, se reducía marcadamente con 30 ppm y con 100 ppm se paraba el crecimiento.

TILLERS pudo distinguir tres grupos de plantas respecto a la tolerancia al plomo: Tolerantes, semitolerantes y no tolerantes. Estudios genéticos demostraron que la tolerancia del plomo es un carácter dominante.

HESSLER en 1975 ( 26 ) por su parte, trabajando con algas dice que no se produce un incremento apreciable de tipos mutagénicos superior a la frecuencia espontánea al ser tratadas con cloruro de plomo.

FIOSELLLO y col en 1973 ( 27 ), investigaron la toxicidad del nitrato de plomo sobre el crecimiento de varias especies de plántulas en capsulas de Petri. Usaron como control agua destilada con soluciones de nitrato potásico. Después de 21 días en la solución de nitrato de plomo  $10^{-4}$  M, se observó un descenso del 34% en el peso fresco, 23% en peso seco y 26% en el contenido de clorofilas, en comparación con los controles. El contenido en clorofila referido al peso seco estaba relacionado con la concentración de plomo.

Hemos de tener en cuenta que la mayoría de estos trabajos fueron realizados en cultivos experimentales, y que en suelos normales los resultados indican que el plomo es tenazmente fijado por los suelos húmicos. Esto puede llevarnos a la conclusión de que muchas de estas experiencias podrían variar en condiciones normales.

Además existen unas experiencias de CHOI E y col ( 28 ) realizadas con riñones de rata, pero sus efectos a nivel intracelular, pueden darnos una orientación sobre la acción general de este elemento. Estos autores aplicando inyecciones de 5  $\mu$ g/g de peso de acetato de plomo, indujeron cambios temporales en la síntesis de ADN. Inicialmente hubo un periodo presintético de unas 20 horas seguido por un gran aumento de la síntesis de ADN, que alcanzaba el máximo a las 33 horas. A la máxima síntesis de ADN le

seguía una oscilación en la mitosis. La actividad mitótica volvía a su ritmo normal después de 4 días. La inducción por el plomo de proliferación celular no es una respuesta regenerativa, ni es debida a las fluctuaciones circadianas.

Estos mismos autores siguiendo con sus experiencias ( 29 ), tras la inyección de 5  $\mu\text{g/g}$  de peso de acetato de plomo observaron que durante el periodo presintético aumentaba la síntesis de ARN y de proteínas, y al mismo tiempo aumentaban las relaciones ARN/ADN y Proteínas/ADN. Estos resultados revelan que la cantidad total de ARN y proteínas aumenta en relación con la síntesis de ADN. Llegaron también a la conclusión de que el plomo induce la replicación del ADN para estimular la transcripción al ARN y la síntesis de nuevas proteínas por un mecanismo normal, ya que si daban inhibidores de esta replicación, como Actinomicina D o Cicloheximida, después de la inyección de acetato de plomo, estos inhibidores bloqueaban el estímulo de la síntesis de ADN.

Otros autores han comprobado el efecto del plomo sobre los enzimas que actúan sobre el ac.  $\delta$ -amino levulínico, y hemos de tener en cuenta que este ácido forma parte del camino de síntesis de la clorofila.

---

Si ampliamos el tema a nivel ecológico, debemos considerar que el

crecimiento de las plantas puede ser limitado por su grado de adaptación al medio mineral. En el caso de que el medio mineral llegase a unos niveles elevados de contaminación por algún elemento, solo subsistirían las especies o tipos de plantas que lograsen un grado de adaptación. Esto supondría la pérdida de muchas especies; por otra parte, las especies que lograsen sobrevivir, pero con poca adaptación al medio, reducirían su producción. Esto supondría un desequilibrio ecológico tanto a nivel de producción primaria como a nivel de la cadena trófica, ya que las especies animales consumidoras de las especies vegetales desaparecidas o poco adaptadas no encontrarían alimento, y tendrían que adaptarse a otro régimen alimenticio o sucumbir.

Aún nos queda por referirnos a las plantas que lograrían adaptarse. Dicha adaptación puede consistir en que tales plantas tengan la habilidad de "saber" excluir a estos elementos, al no absorberlos o al retenerlos a nivel radicular; en este caso no tendría efecto directo sobre sus posteriores niveles tróficos.

También puede darse el caso de que esta adaptación permita que dichos elementos se acumulen en las plantas. Entonces, estas plantas serían agentes contaminantes de los posteriores niveles tróficos. Esto aumentaría los problemas de toxicidad animal al consumir forrajes crecidos bajo tales circunstancias, y de hecho se ha comprobado que estos forrajes pueden producir trastornos digestivos en los animales. Siguiendo el mismo razonamiento llegaríamos a los problemas de toxicidad para el hombre.

*Si tenemos en cuenta trabajos como los de CHOIE y col ( 28, 29 ), citados anteriormente, podemos especular con que la contaminación por plomo a nivel de toxicidad animal puede, entre otras cosas, inducir mitosis en ciertos tejidos, lo que representa que podría llegar a ser un agente cancerígeno.*

---

*No hemos escogido la toxicidad del plomo al azar sino porque realmente es uno de los elementos contaminantes que actualmente producen mayor preocupación.*

*Las principales fuentes de contaminación por plomo son: Los antidetonantes en los combustibles, las fundiciones de dicho metal, la industria química y los plaguicidas ( 30 ).*

*En el aspecto de contaminación atmosférica ( 31 ) la principal fuente la constituye el plomo que proviene de los vehículos de motor en donde este elemento se añade a la gasolina para impedir detonaciones ( en cada litro de gasolina puede haber hasta 1 gramo de derivados del plomo ). Solo en 1966 y en Estados Unidos los automóviles descargaron a la atmósfera unas 200000 toneladas de plomo. La O.M.S. en 1972 ( 32 ) estableció unos niveles de contaminación atmosférica. Dentro de estos niveles cada estado adopta unos determinados índices entre los que se puede citar por ejemplo*

Los de los Estados Unidos. En Estados Unidos se permite un máximo en un momento dado de  $0,002 \text{ mg/ m}^3$  de plomo y sus compuestos, y no se permite que la media en 24 horas sea superior a  $0,0007 \text{ mg/ m}^3$ .

Respecto a la contaminación de las aguas, podemos citar que el plomo suele estar presente en las aguas de bebida en proporciones de  $0,01$  a  $0,03 \text{ mg/ l}$  y su presencia puede ser debida a la utilización de cañerías de dicho metal. La O.M.S. en 1972 ( 32 ) fijó en las normas internacionales para el agua potable una concentración máxima de plomo de  $0,1 \text{ mg/l}$ .

Los plaguicidas, cuyo uso va en aumento de año en año, son los que actúan más directamente en nuestro problema ya que se rocían sobre las plantas, y parte de ellos ya cae directamente al suelo y la otra parte es arrastrada también al suelo por medio de la lluvia que lava las hojas. Una vez en el suelo pueden entrar en los ciclos biológicos o ser arrastrados por el agua. En este aspecto no debemos olvidar la contaminación atmosférica ya que el agua de lluvia puede arrastrar las partículas de plomo de la atmósfera al suelo.

Parece ser que las aguas continentales contienen mucho plomo que en su mayor parte acaba acumulado en los sedimentos marinos.

Como plaguicida el plomo se usa generalmente en forma de arseniatos de plomo. Los arseniatos de plomo actúan en los insectos por ingestión, y no producen su efecto a no ser que penetren en el tubo digestivo de los insectos. Estos mueren por envenenamiento al ingerir los vegetales tratados con insecticidas ( 33 ). Los arseniatos de plomo se aplican envenenando

Los órganos de las plantas a las que ataca el insecto por medio de pulverizaciones ( 34 ).

---

Hemos visto el problema desde un punto de vista general a nivel ecológico, pero nuestro problema se centra a nivel de las plantas verdes y deberíamos considerar la importancia de estas para la vida sobre la tierra.

La vida es un proceso dinámico, representa un ordenamiento de la materia y para mantener este ordenamiento se necesita energía, según el segundo principio de termodinámica. Esto supone que continuamente se están produciendo degradaciones que representan una pérdida de energía en forma de calor, que se cede a la atmósfera. Es necesario encontrar una fuente de energía para poder reponer todos estos procesos degradatorios. Si no existiese esta fuerza regeneradora, dentro de 15 ó 18 años no quedarían vestigios de vida sobre la tierra.

La energía para mantener la vida sobre la tierra procede de la luz solar. La historia de la vida empieza en el sol.

El reino animal no puede aprovechar directamente la energía luminosa para la vida. Según el primer principio de termodinámica la energía no se crea ni se destruye, solo se transforma. La vida la necesita almacenada en forma de determinados enlaces químicos. Esto requiere un mecanismo que

*transforma la energía luminosa en energía util para el metabolismo. Este mecanismo lo constituye la fotosíntesis, realizada por las plantas verdes.*

*Podríamos pensar en otras fuentes de energía distintas de la luz y en otros mecanismos de transformación para lograr esta energía util, incluso podríamos pensar en otro tipo de energía util para la vida terrestre u otros tipos de vida, pero realmente para nuestro planeta la luz es la única fuente de energía y la fotosíntesis el único mecanismo de transformación de esta energía.*

*La Fotosíntesis, en la cual, a partir de agua, anhídrido carbónico, sales minerales y energía solar consigue ser el motor de los ciclos biológicos sobre la tierra. El volumen de vida sobre la tierra depende del volumen de plantas verdes. Esto hay que tenerlo muy presente en todos los programas de supervivencia. Tampoco debemos olvidar que la fotosíntesis evita la contaminación de la atmósfera al consumir el anhídrido carbónico.*

*LE CORBUSIER dice:*

*"Las condiciones de la naturaleza están escritas en las tablas de la ley del urbanismo contemporáneo, sus tres materiales son: El aire puro, el sol y la vegetación".*

*En el campo político, la conferencia de Estocolmo de 1972 puso bien de manifiesto la estrecha relación entre el medio ambiente y los mecanismos económicos.*

*Deberíamos pensar en el futuro de la vida sobre la tierra y deberíamos saber ver la importancia a largo plazo de las cosas. Podríamos empezar*



por meditar sobre las predicciones del informe del M.I.T., encargado por el Club de Roma y publicado en 1972 ( 35 ), o sobre el Manifiesto para la supervivencia del *The Ecologist*.

MICHEL BOSQUET dice:

"La humanidad necesitó treinta siglos para tomar impulso; le quedan treinta años para frenar antes del abismo".

---

Para este trabajo hemos elegido como indicadores de los efectos del plomo sobre *Nicotiana rustica* L la determinación cuantitativa de pigmentos liposolubles, ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres y nicotina. Conviene que nos demos cuenta de la importancia para la vida de cada uno de estos componentes, y así comprender el porqué de esta elección.

Hemos visto que con la fotosíntesis se conseguía un almacenamiento de energía en forma de enlaces químicos. La fotosíntesis nos da hidratos de carbono y una serie de esqueletos carbonados. A partir de esto, por una serie de procesos bioquímicos más o menos complejos la planta forma toda su estructura y monta todos sus sistemas.

Las proteínas son importantes a nivel estructural y enzimático. Los aminoácidos son las unidades fundamentales de las proteínas. Los ácidos nucleicos encierran el código genético, dirigen la síntesis de proteínas

y la replicación celular. La clorofila y carotenoides son pigmentos que captan la energía luminosa.

Si disminuyen estos pigmentos disminuye también la proporción de fotosíntesis. Si aumenta el ADN aumentan las replications. Si aumenta el ARN aumenta la síntesis de proteínas, siempre que hayan aminoácidos libres. Si varía la proporción de proteínas, varía la proporción de los enzimas. Los enzimas son proteínas, pero cada enzima es único y específico para un determinado paso de un camino metabólico. Se puede variar la proporción de un determinado enzima, aún sin variar la proporción normal de proteínas, esto representa un cambio en un determinado camino metabólico y la variación en la proporción de muchos metabolitos.

---

En este estudio no olvidamos la importancia de los alcaloides en farmacia. Por ello hemos escogido una planta alcaloídica que nos permita vislumbrar el efecto que el plomo podría causar en los mecanismos del metabolismo secundario de las plantas que son en definitiva fuente inagotable de medicamentos.

## PLANIFICACION DEL TRABAJO

*Para realizar nuestro trabajo son necesarios una serie de pasos:*

- 1- Realizar la siembra de semillas de Nicotiana rustica L sobre tierra de buena calidad, hasta que las plantas nacidas adquirieran suficiente crecimiento.*
- 2- Transplantarlas a vermiculita humedecida con solución nutritiva completa.*
- 3- Añadir a la solución nutritiva sales de plomo, y dejar un lote de plantas control que crezcan solamente en solución nutritiva.*
- 4- Observar el curso del crecimiento de las plantas y tomar muestras de ellas.*
- 5- Analizar en las muestras los contenidos de pigmentos liposolubles, ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres y nicotina, para investigar las posibles acciones del plomo sobre el metabolismo de las plantas estudiadas.*

## 1- Obtención de cultivos de *Nicotiana rustica*

Seleccionamos semillas de *Nicotiana rustica* L de la cosecha del año anterior, las cuales se lavaron cuidadosamente con agua para evitar la presencia de posibles inhibidores hidrosolubles y se sembraron en unas jardineras que contenían tierra tamizada de buena calidad.

La germinación de las semillas y posterior desarrollo de las plántulas se realizó en una cámara regulada a 24°C y 70% de humedad. Recibieron 14 horas diarias de luz blanca procedente de plafones con 12 tubos fluorescentes de 20 W, situados a 80 cm. Cada día se añadía el agua necesaria para mantener una humedad idónea.

Cuando la longitud de su parte aérea alcanzó de 10 a 12 cm, se procedió a transplantarlas a vermiculita humedecida con solución nutritiva.

## 2- Transplante a vermiculita

Para investigar la acción de cualquier elemento se debe recurrir al cultivo en solución nutritiva sobre sustrato inerte, ya que de esta manera sabemos exactamente la nutrición que reciben las plantas.

La principal función del sustrato será actuar como sostén mecánico de la planta, sin intervenir en sus funciones vitales, permitir el desa-

rrallo y progreso de las raíces entre sus partículas y la respiración de las mismas, lo cual supone un tamaño de partícula, una consistencia de las mismas, etc, una serie de propiedades físicas importantes a considerar.

Normalmente los cultivos se hacen sobre arena silicea lavada, pero tiene el inconveniente de no retener el agua, por lo que hay mucho peligro de desecación.

Por esta razón hemos efectuado los cultivos sobre vermiculita "Termita" N<sup>o</sup> 2 cuyos gránulos tienen un tamaño aproximado de 2-4 mm y su composición es:

Sílice	39,5 %
Alúmina	12,0 %
Bióxido de hierro	7,0 %
Bióxido de titanio	1,0 %
Oxido de magnesio	23,0 %
Oxido cálcico	1,5 %
Oxido potásico	2,0 %
Agua libre y combinada	12,0 %
Otros componentes	2,0 %

La vermiculita procedente de la industria fué lavada previamente con abundante cantidad de agua destilada, a fin de separar todos los componentes hidrosolubles, posteriormente se dejó secar para reducir de nuevo su contenido hídrico.

Con el sustrato lavado y seco se llenaron recipientes de polietileno

de 40 X 40 X 30 cm, y a continuación se humedecieron con solución nutritiva completa.

La solución nutritiva completa se preparó siguiendo la fórmula de HOAGLAND y ARNON ( 36 ), con algunas modificaciones.

	<u>g/l</u>	<u>moles</u>
$KNO_3$	1,02	0,01
$Ca(NO_3)_2$	0,492	0,003
$NH_4H_2PO_4$	0,230	0,002
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,49	0,002
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 %	-----	0,6 ml/l
Ac. tartárico 0,4 %	-----	0,6 ml/l
$H_3BO_3$	-----	2,86 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	-----	1,81 mg/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-----	0,08 mg/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-----	0,22 mg/l
$H_2MoO_4$	-----	0,09 mg/l

El Fe de esta solución fué sustituido por EDTA-Fe, obtenido según las normas dadas por STEINER y VAN WINDEN ( 37 ).

Para preparar una solución de EDTA-Fe se debe proceder como sigue:

A) Disolver 26,6 g de EDTA en 500 ml de agua a 70°C, que contiene 279,8 ml de hidróxido potásico N.

B) Disolver 24,9 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  en 300 ml de agua a 70°C, que contiene 4 ml de ácido clorhídrico.

C) mezclar A y B, y añadir agua hasta 950 ml, aireando durante 24 horas y llenar hasta 1000 ml.

D) Ajustar a pH 5,5.

Las plántulas procedentes de las jardineras fueron trasplantadas a este medio. Los cultivos así obtenidos se mantuvieron en la cámara de cultivo en las mismas condiciones que hemos citado para las jardineras.

Permanecieron en estas condiciones durante 21 días, tiempo necesario para que las plantas regenerasen sus raicillas que inevitablemente se habrían roto durante el trasplante y al mismo tiempo se adaptasen al nuevo sustrato. Durante estos 21 días se les añadió periódicamente solución nutritiva completa.

Periodicamente también se hicieron drenajes para mantener equilibrada la solución.

### 3- Tratamiento con plomo

Cuando los cultivos estuvieron bien enraizados y adaptados, se dividieron los recipientes en tres lotes.

A un lote se le continuó añadiendo solución nutritiva completa. Lote control ( C ).

Al segundo lote se le añadió solución nutritiva completa adicionada de 10 ppm de plomo en forma de EDTA-Pb durante 8 días. Al 9º día se aumentó la dosis a 20 ppm de plomo ( 1 ).

Al tercer lote se le añadió solución nutritiva completa adicionada de 20 ppm de plomo en forma de EDTA-Pb durante 8 días. Al 9º día se aumentó la dosis a 40 ppm de plomo ( 11 ).

La razón de este cambio de dosis no es otro que facilitar que las plantas adquirieran una cierta facilidad para resistir el tratamiento posterior más intenso, de cuya acción se midieron los efectos.

La solución de EDTA-Pb, que se añadió en distintas proporciones a la solución nutritiva completa, fué obtenida según las especificaciones de STEINER.

Partimos de subacetato de plomo  $(CH_3COO)_2Pb \cdot Pb(OH)_2$  que, se caracteriza porque es soluble en 16 partes de agua y en 4 partes de agua hirviente, con reacción alcalina. Debido a su insolubilidad tuvimos que modificar el proceso, en cierto modo.

A 157,5 ml de hidróxido potásico N se le añaden 11,79 g de EDTA y 7,61132 g de subacetato de plomo. Calentar hasta disolución completa. Añadir agua hasta 420 ml. Airear durante 24 horas. Completar el volumen hasta 450 ml. Ajustar el pH.

Es una fórmula para 450 ml de solución madre de EDTA-Pb.

Para conseguir las proporciones adecuadas de 10, 20 y 40 ppm de plomo tenemos que añadir para 5 litros de solución nutritiva completa respectivamente:

4,0399 ml de solución madre de EDTA-Pb	—————	10 ppm
8,0799 ml       "       "       "	—————	20 ppm



16,159 ml de solución madre de EDTA-Pb ——— 40 ppm

#### 4- Toma de muestras y observación del curso de crecimiento

A los 8 días de iniciar el tratamiento con plomo se procedió a sacar una muestra semanalmente de cada uno de los tres lotes.

Se procede a tomar una muestra que sea representativa del crecimiento medio de las plantas. Para ello se miden y observan cuidadosamente. Una planta completa se destina al análisis de pigmentos. A otra se le separa cuidadosamente la vermiculita adherida a las raíces, se lava y se deja 5 minutos sobre un papel de filtro para que éste absorba la humedad de las mismas. Se miden las longitudes de tallos y raíces y se cuenta el número de hojas por planta. Se separan raíces, tallos, hojas e inflorescencias cuando las hay. Se procede a obtener el peso fresco.

A continuación se estabiliza; para ello se toman cada una de las partes por separado, siguiendo el mismo procedimiento para todas ellas. Se trocean, se introducen en alcohol hirviente al 70 %, se mantienen a ebullición durante 5 minutos, se dejan enfriar y se guardan en cámara frigorífica durante 24 horas como mínimo antes de proceder a la homogeneización del material.

La homogeneización se realiza en un homogeneizador Servall Omni-mixer, tomando la precaución de introducir el recipiente en un baño de metanol, llevado a menos de  $-15^{\circ}\text{C}$  para evitar alteraciones en el material. El homo-

geneizado se lleva a un volumen conocido y se guarda en cámara frigorífica hasta el momento de los análisis.

A partir del homogeneizado se obtiene el peso seco. Se toma una parte del mismo, se coloca en un pesafiltros tarado previamente, se deja en estufa a 60°C durante 24 horas, se deja enfriar en desecador, y se pesa reiteradamente hasta obtener un peso constante.

#### 5- Investigación de las posibles acciones del plomo sobre el metabolismo de las plantas de *Nicotiana rustica*.

Para ello nos basamos en la determinación de los niveles de :

- A) Pigmentos liposolubles.
- B) Acidos nucleicos.
- C) Proteinas.
- D) Aminoácidos libres.
- E) Nicotina.

### A) Análisis de pigmentos liposolubles

En todo método analítico debemos considerar tres partes:

Obtención de la muestra

Conservación de la misma

Análisis propiamente dicho

Existen numerosos procedimientos para el análisis de estos pigmentos, algunos de ellos muy complicados en sus dos primeras partes. La razón de ello estriba en que si es necesario conservar la muestra debe procederse a una estabilización en condiciones en las que no se degraden las moléculas de clorofila ni sea posible la oxidación de los carotenoides.

Nosotros hemos simplificado mucho el proceso por haber realizado el análisis del material fresco, inmediatamente después de la toma de muestra, con lo cual se evita la estabilización y conservación de la misma.

Partimos de una planta para la determinación de pigmentos, tomamos sus hojas, las pesamos y procedemos a la extracción de los pigmentos. Para ello se tratan repetidamente con acetona del 80 % hasta total decoloración del residuo. Se llevan después a un volumen conocido.

Para el análisis se toma una parte alícuota de este volumen, se diluye convenientemente, y se lee en espectrofotómetro, según el método de ARNON y BRUSINNA ( 38 ).

Se han dado varias fórmulas para determinar las concentraciones de estos pigmentos, todas ellas basadas en las distintas absorciones de los mismos a 645, 663 y 450 nm. Las distintas fórmulas varían según el disolvente empleado. Para la acetona, ARNON llegó a unas fórmulas que fueron modificadas por MAC KINNEY ( 39 ).

Clorofila a ——— 12,7  $DO_{663}$  - 2,69  $DO_{645}$  ( mg/l )

Clorofila b ——— 22,9  $DO_{645}$  - 4,68  $DO_{663}$  ( mg/l )

Carotenoides ——— 4,07  $DO_{450}$  - 0,0435 Ca - 0,367 Cb ( mg/l )

Reactivos:

Acetona del 80 %

Aparatos:

Espectrofotómetro Zeiss, PMQ 11.

## B) Análisis de ácidos nucleicos

Primeramente nos hemos planteado el problema de la elección del método adecuado para la determinación de los ácidos nucleicos. Además de las dificultades que presentan, por sí solas, la extracción y separación del ADN y ARN, existen los derivados de una contaminación del extracto.

Son necesarias extracciones preliminares a fin de eliminar sustancias como coenzimas, mononucleótidos, fosfato inorgánico, carbohidratos y fosfolípidos, todos los cuales interferirían en la determinación final de los ácidos nucleicos.

Debe llevarse a cabo una estabilización del material, extracción de los materiales solubles en ácido frío y de los lípidos. La estabilización puede lograrse por ebullición del material en alcohol de 96° durante 5 minutos o por tratamiento con ácido tricloroacético al 10 % en frío durante 20 horas.

Como ácido frío extrayente, se utilizan el tricloroacético y el perclórico. Para la extracción de los lípidos se usa alcohol-éter o cloroformo, ya sea en frío o en caliente.

El proceso preliminar usado en nuestra experiencia fué el aconsejado por MAYER y POLJAKOFF MAYBER ( 40 ).

Al homogeneizado se le añade un volumen igual de ácido tricloroacé-

tico 2 M, de manera que la concentración final en tricloroacético sea 1 M. Se deja 20 horas a 2°C, se centrifuga y desecha el sobrenadante, el residuo se lava dos veces con alcohol del 70 %, en ambos casos se centrifuga y desecha el sobrenadante. A continuación se lava con perclórico 0,1 N-etanol del 70 % en la proporción 1:1, el precipitado se lava con una mezcla de etanol-éter 2:1, se repite otra vez el lavado, para arrastrar todos los lípidos y pigmentos. El residuo se lava dos veces con perclórico 0,2 M en frío.

El sedimento debería quedar listo para la extracción de los ácidos nucleicos. Sin embargo nuestra experiencia confirma los ensayos efectuados por HOLGATE y COOHN que encontraron que en el residuo quedaba material orcinol-positivo además del ADN y ARN. ( 43 )

Según parece, algún carbohidrato de las plantas es insoluble en ácido frío y se degrada en unidades más pequeñas cuando se somete al método usado para extraer el ADN y ARN y así enmascara el contenido en ARN. MILLIKAN y PICKETT propusieron una purificación del extracto pasándolo por carbón animal o bien por Dowex AG 1/8, pero no existe seguridad de no perder ADN y ARN.

Para la extracción del ARN se sigue el método indicado por INGLE y HAGEPANN ( 41, 42 ).

El residuo se suspende en KOH 0,4 N, 24 horas a 37°C. A continuación se lleva a pH 1 con ácido perclórico, de esta manera precipita el ADN. Se centrifuga y se separa el sobrenadante. El residuo se lava con un volumen igual de agua destilada. Se centrifuga de nuevo y se unen los dos sobrena-

dantes, en ellos se determina el ARN por absorción a 260 nm y comparación con una curva patrón efectuada con ARN puro, según la técnica descrita por OQUIR y ROSEN

El residuo de la centrifugación contiene el ADN.

Para su hidrólisis seguiremos de nuevo el método de MYER y POLJAKOFF MAYBER. Se hidroliza con ácido perclórico 2 N a 70°C media hora, se centrifuga y guarda el sobrenadante. El residuo se trata de nuevo con ácido perclórico 2 N a 70°C media hora. Se centrifuga y se unen los sobrenadantes.

Para la determinación del ADN se usa el método de SCHNEIDER modificado por BURTON ( 44, 45 ).

Un ml del extracto del ADN y 2 ml del reactivo de BURTON se dejan en la estufa a 37°C durante 20 horas, se lee la absorción a 600 nm usando como testigo un tubo con la mezcla de 1ml de perclórico y 2 ml de reactivo de BURTON. Los resultados se comparan con una curva patrón obtenida con ADN puro.

#### Reactivos:

Acido tricloroacético 2 M

Alcohol del 70 %

Acido perclórico 0,1 N

Eter etílico

Alcohol absoluto

Acido perclórico 0,2 M

Hidróxido potásico 0,4 N

*Acido perclórico*

*Acido perclórico 2 N*

*Reactivo de Burton:*

*1,5 g de difenilamina*

*100 ml de ácido acético*

*1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado*

*Los productos y reactivos utilizados deben ser de buena calidad. Nosotros hemos utilizado productos Merck.*

*Aparatos:*

*Centrifuga Kris, modelo "Omikron".*

*Espectrofotómetro Zeiss, PMQ/1*

*Estufa de cultivo Heraeus.*



### Obtención de las curvas patrón de ADN y ARN

Partimos de ARN procedente de levadura, se suspende en KOH 1N durante 24 horas a 37°C. A continuación se lleva a pH 1 con ácido perclórico 1,5 N. Se centrifuga y lava el residuo con agua destilada. Se centrifuga de nuevo y unen los sobrenadantes, en ellos se lee las densidades ópticas en espectrofotómetro a 260 nm. Como testigo se usa agua destilada.

Por otra parte se opera con ADN procedente de esperma, se hidroliza con ácido perclórico 2 N a 70°C media hora, se centrifuga y se repite la operación con el residuo.

Se realizan varias diluciones con ácido perclórico 2 N y 1 ml de cada dilución se mezcla con 2 ml de reactivo de Burton. Los tubos se dejan en una estufa a 37°C durante 20 horas, y se leen en un espectrofotómetro a 600 nm, usando como testigo 1 ml de ácido perclórico y 2 ml de reactivo Burton tratados de idéntica manera que las diluciones.

#### Productos y reactivos:

ARN de levadura de la firma Fluka AG

Hidróxido potásico 1N

Acido perclórico 1,5 N

ADN de esperma de la firma Light Co. LH Colnbrook

Acido perclórico 2 N

Reactivo de Burton.

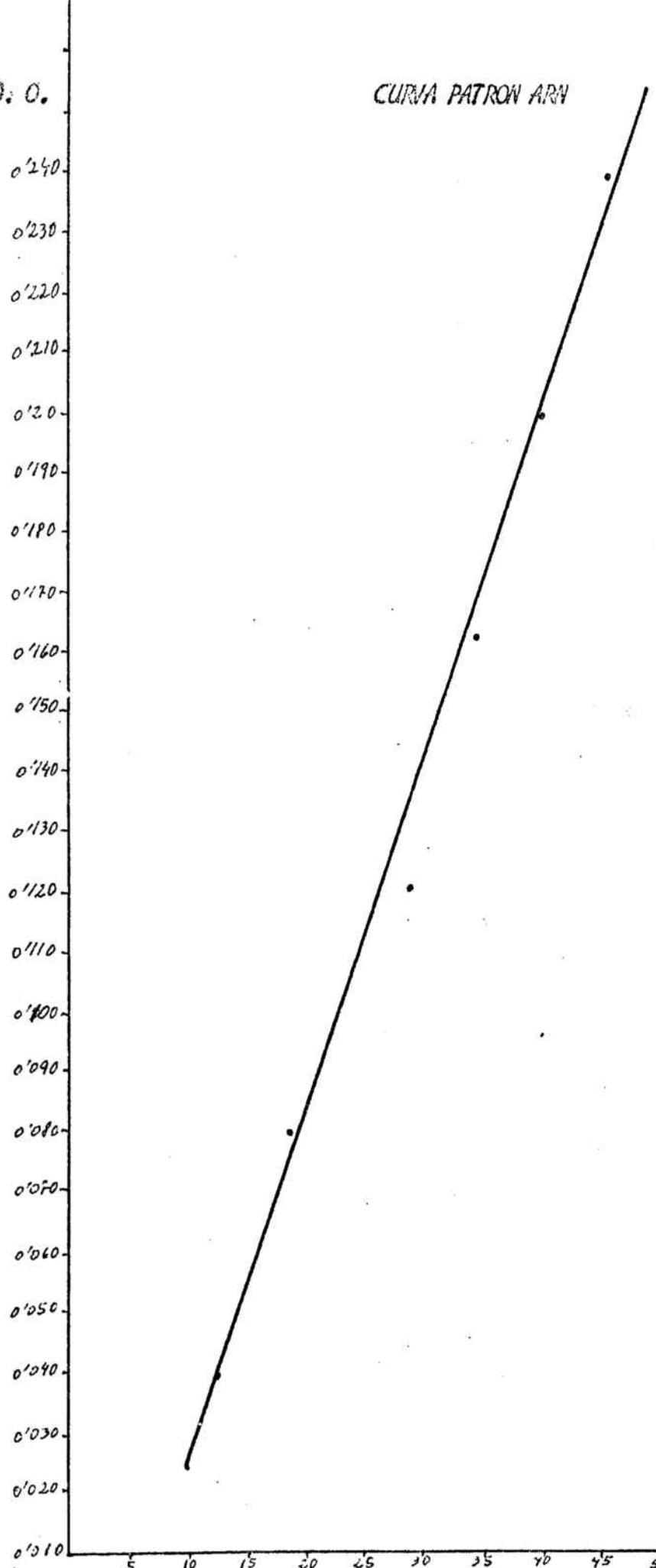
D. O.

CURVA PATRON ARN

0'240  
0'230  
0'220  
0'210  
0'200  
0'190  
0'180  
0'170  
0'160  
0'150  
0'140  
0'130  
0'120  
0'110  
0'100  
0'090  
0'080  
0'070  
0'060  
0'050  
0'040  
0'030  
0'020  
0'010

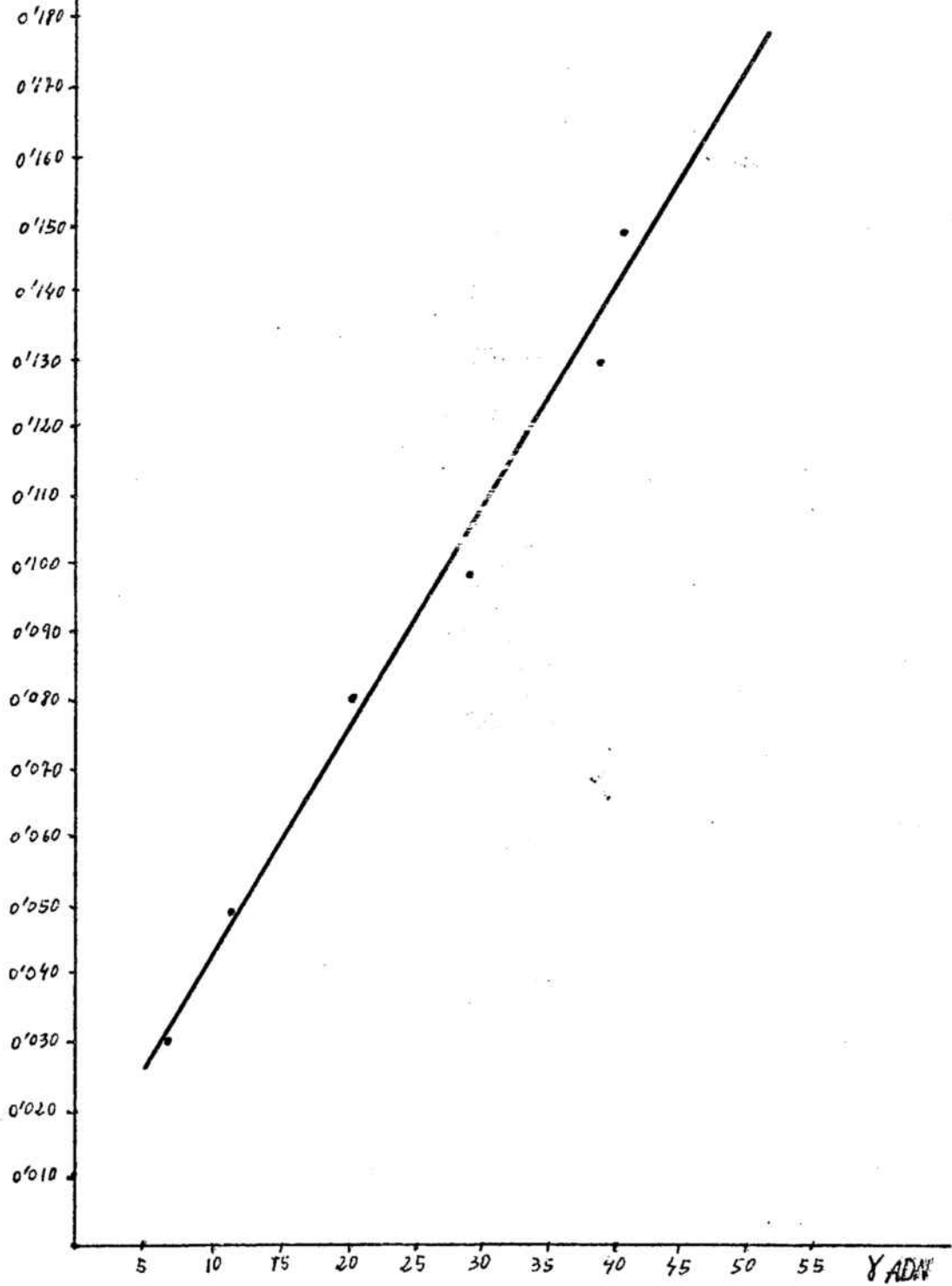
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50

γ ARN



D. O.

CURVA PATRON ADN



### C) Análisis de proteínas

Existen varios métodos para la determinación de proteínas.

*Determinación del nitrógeno.*- Se determina la cantidad de nitrógeno por el método de KJELDAHL, modificado por VICKERY ( 46 ). El contenido en nitrógeno se multiplica por 6,25 y nos expresa cuantitativamente la proteína existente. En el caso de proteínas vegetales se multiplica por 6.

*Reacción de la ninhidrina.*- Este método se usa después de efectuar una hidrólisis de la proteína.

*Métodos físicos.*- La concentración de proteína de una solución diluida puede determinarse por sus propiedades físicas, índice de refracción y coeficiente de absorción.

*Determinación del enlace peptídico.*- La reacción del biuret es el mejor ejemplo de ello.

*Método adoptado:*

Para la extracción de la proteína se siguen las indicaciones de BELHANAÏ y COLLET, INGLE y PILET ( 47 ).

El material procedente del homogeneizado se mezcla con 6 ml de ácido tricloroacético-acetona. Se deja 17 horas en nevera a 0°C. Se centrifuga durante 15 minutos y se elimina el sobrenadante. El ácido tricloroacético-acetona ( 48 ) tiene la ventaja sobre el tratamiento normal con ácido tri-

cloroscético de que extrae los pigmentos y lípidos, esto evita posteriores extracciones con alcohol-éter.

El precipitado obtenido se lava con 6 ml de ácido tricloroacético-acetona. Se centrifuga como antes. Las proteínas del residuo se solubilizan de nuevo con 2 ml de NaOH 0,1N, se dejan en contacto durante 24 horas a la temperatura ambiente y se valoran por el método de LOWRY.

#### *Análisis colorimétrico. Método de LOWRY*

En un tubo de ensayo ponemos la muestra que contiene de 5 a 100  $\mu$ g de proteína en 0,4 ml. Se le adicionan 2 ml del reactivo C. Se mezcla bien y se deja durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionan 0,2 ml del reactivo D y se mezcla con rapidez.

Transcurridos 30 minutos se lee en espectrofotómetro a 500 nm. Para concentraciones de proteína de 5 a 25  $\mu$ g por ml de volumen final es aconsejable efectuar las lecturas a 750 nm.

Las lecturas obtenidas se llevan a una curva patrón obtenida con albúmina de huevo.

#### *Reactivos:*

##### *Tricloroacético-acetona*

*5 g de ácido tricloroacético*

*47,5 ml de agua*

*47,5 ml de acetona*

*Hidróxido sódico 0,1N*

*Reactivo A: 2 % de carbonato sódico en hidróxido sódico 0,1N.*

Reactivo B: 0,5 % de sulfato de cobre pentahidratado en tartrato sódico al 1 %.

Reactivo C: 50 ml de reactivo A se mezclan con 1 ml de reactivo B.

Reactivo D: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido a la mitad con agua destilada.

Aparatos:

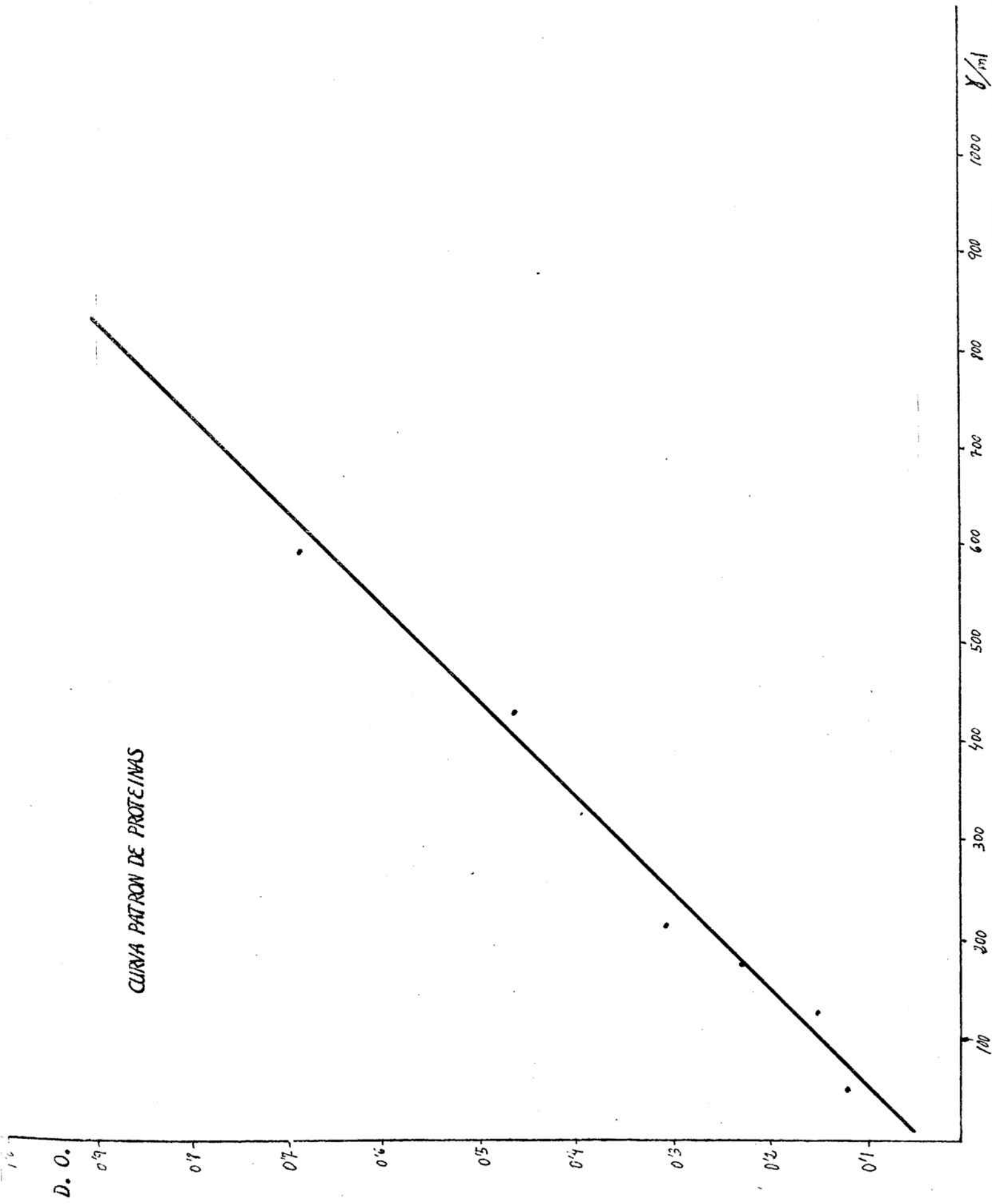
Centrifuga Kris, modelo "Omikron"

Espectrofotómetro Zeiss, PMQ11

#### Obtención de la curva patrón de proteínas

Se parte de albúmina de huevo pura. Se pesa una cierta cantidad y se hacen una serie de diluciones con NaOH 0,1N, de manera que el contenido final en proteínas esté comprendido entre 5 y 100  $\mu$ g por 0,4 ml. A 0,4 ml de cada dilución se les aplica el método colorimétrico de LOWRY, citado anteriormente. Después de leer en espectrofotómetro a 500 nm obtenemos una curva patrón.

CURVA PATRON DE PROTEINAS



D) Análisis de aminoácidos por cambio iónico

La muestra ( 10 ó 15 ml de homogeneizado ) se centrifugan 20 minutos a 17000 rpm en una ultracentrífuga. Se separa el sobrenadante y se lava el residuo con alcohol. Se vuelve a centrifugar 10 minutos a las mismas rpm. Los aminoácidos libres que pretendemos determinar se hallaran en el sobrenadante. Se reúnen los sobrenadantes y son despigmentados por reiterados lavados con eter de petroleo, utilizando para ello una ampolla de separación. El eter de petroleo se lava con agua acidulada para recuperar posibles aminoácidos que hubieran quedado en él. El residuo hidroalcohólico, que contiene los aminoácidos libres, se evapora a sequedad en una estufa de vacio, seguidamente se disuelve en tampón de citrato sódico de ph 2,2, quedando en condiciones de inyectarlo en las columnas, para su análisis.

Las lecturas espectrofotométricas para medir las absorbancias dadas por la reacción de los aminoácidos y el tampón con ninhidrina, se hacen en tres longitudes de onda seleccionadas ( 440, 570 y 640 nm ). La máxima absorción la dan todos los aminoácidos a la longitud de onda de 570 nm, excepto la prolina que la dá a 440 nm.



Cuadro resumen de las condiciones para el método analítico  
de 2 horas de duración

	Columna 500 X 9 mm	Columna 100 X 9 mm
Muestra de análisis	Aminoácidos A y N ( 14 componentes )	Aminoácidos B ( 4 componentes )
Resina cambiadora de iones	Resina esférica nº 2612	Resina esférica nº 2611
Tiempo de análisis	1 hora y 40 min.	30 min. aprox.
Velocidad del paso del tampón	120 ml por hora	120 ml por hora
Velocidad del paso de ninhidrina	60 ml por hora	60 ml por hora
Tiempo de reacción	54 segundos a 105°C	54 segundos a 105°C
Temperatura de la columna	55° ± 0,5°C	55° ± 0,5°C
Tampón, ph	3,25 - 4,25	5,28
Presión bomba tampón	15 - 25 Kg/cm <sup>2</sup>	4 - 10 Kg/cm <sup>2</sup>
Presión bomba ninhidrina	1,5 - 4 Kg/cm <sup>2</sup>	1 - 3 Kg/cm <sup>2</sup>
Tiempo cambio tampón en el programador	35 ± 10 min.	
Regeneración	1- Tampón regenerador 30 min. 2,5 Kg/cm <sup>2</sup>  2- Tampón ph 3,25 durante 30 min.	

*Productos y reactivos:*

*Acetato sódico, p. a. Merck*

*Acido acético glacial, p. a. Merck*

*Acido clorhídrico de 37 %, p. a. Merck*

*Alcohol bencílico, p. a. Merck*

*Alcohol etílico, p. a. Merck*

*BR/35, p. a. Merck*

*Citrato sódico, p. a. Merck*

*Cloruro estagnoso, p. a. Merck*

*Eter de petróleo Fluca*

*Fenol, p. a. Merck*

*Hidróxido sódico, p. a. Merck*

*Metilcelosolve Pierce*

*Ninhidrina Pierce*

*Nitrógeno seco, de pureza 99,9 %, Abelló-Oxígeno-Linde.*

*Patrón de aminoácidos Takara Kosan. Contiene  $2,5 \pm 0,004$  moles/ml*

*de los siguientes aminoácidos y amonio:*

*L-lisina*

*L-histidina*

*Amonio*

*L-arginina*

*Acido L-aspártico*

*L-treonina*

*L-serina*

*Acido L-glutámico*

*L-prolina ( 5,000 moles )*

*Glicina*

*L-alanina*

*L-cistina*

*L-valina*

*L-metionina*

*L-isoleucina*

*L-leucina*

*L-tirosina*

*L-fenilalanina*

*Resinas al sodio Hitachi números 2.611 y 2.612*

*Triodiglicol, p. a. Merck*

*Acido clorhídrico 6 N. Se prepara por dilución del Cl H del 37 %  
p. a. Merck.*

*Reactivo de ninhidrina. Características y preparación del tam-  
pón de acetato para el reactivo de ninhidrina:*

<i>Normalidad del acetato sódico ( N )</i>	<i>4</i>
<i>Ph</i>	<i>5,51 <sup>+</sup> 0,03 <sub>-</sub></i>
<i>Agua destilada</i>	<i>600 ml</i>
<i>Acetato sódico anhidro</i>	<i>328 g</i>
<i>Calentar ( 50°C ) hasta disolución; enfriar</i>	

Acido acético glacial	100 ml
Llevar a volumen final a	1000 ml
Ajustar el ph con ácido acético glacial.	

Para la preparación del reactivo de la ninhidrina:

Concentración de ninhidrina	2 %
Volumen final	3000 ml
Metilcelosolve	2250 ml
Tampón de acetato	750 ml
Ninhidrina	60 g

Paso de nitrógeno

La solución se puede utilizar a las 24 horas de preparada.

Solución regeneradora. Utilizada para la regeneración de la columna para los aminoácidos, ácidos y neutros. Su composición está indicada en el cuadro correspondiente.

Tampones:

Tampón de citrato sódico de  $\text{ph } 2,2 \pm 0,1$ . Se utiliza como diluyente simple.

Tampones de citrato sódico de  $\text{ph } 3,25 \pm 0,01$  y  $4,25 \pm 0,01$ . Utilizados como eluyentes de aminoácidos, ácidos y neutros.

Tampón de citrato sódico de  $\text{ph } 5,28 \pm 0,02$ . Utilizado como eluyente de aminoácidos básicos.

Cuadro de la composición de los tampones de citrato y de la  
solución regeneradora

Ph	3,25 ± 0,01 - 0,01	4,25 ± 0,01 - 0,01	5,28 ± 0,02 - 0,02		2,2 ± 0,1 - 0,1
Concentración Na ( N )	0,20	0,20	0,35	0,2	0,2
Citrato sódico 2 H <sub>2</sub> O. g	197	197	343		19,7
Ac. clorhídrico con. ml	132	84	75		16,5
Fenol, g	10	10	10		1
Triodiglicol, ml	50	50			20
Alcohol etílico, ml	800				
Alcohol bencílico, ml			50		
Hidróxido sódico, g				40	
BRJ-35, ml	40	40	40	20	4
Volumen total, l	10	10	10	5	1
Usos	Elu- yente A y N	Elu- yente A y N	Elu- yente B	Rege- nera- ción Colum- na.	Dilu- yente.

*Aparatos y material especial:*

*Cromatógrafo líquido Hitachi Perkin-Elmer, modelo 034.*

*Estufa de vacío Heraeus.*

*Medidor de pH Beckman de investigación.*

*Rotavapor "Büchi".*

*Ultracentrífuga Kris, modelo "Omikron".*

Reconocimiento y determinación cuantitativa de los aminoácidos en el cromatograma.

Primeramente debemos determinar el área de los picos del cromatograma correspondiente a los aminoácidos componentes de la muestra y del patrón.

Para el cálculo del área hemos seguido el método H. W ( altura. anchura ). Es necesario efectuar las siguientes lecturas:

Hb- Línea de base

Ho- Altura determinada por el punto más alto en el pico del cromatograma.

H- Altura neta. Calculada de la fórmula  $H = Ho - Hb$

W- Anchura. Trazar una línea recta fina a través del pico, a la altura equivalente a  $1/2 H + Hb$ . La longitud de esta línea representa la anchura ( W ) del pico; su determinación puede efectuarse por conteo de los puntos, que determinan el pico más alto, por encima de la línea fina.

Una vez determinada el área correspondiente a cada pico, debemos determinar el valor en  $\mu$  moles de cada área, para ello hay que relacionar el área de cada aminoácido problema con el área desarrollada por el mismo aminoácido en el cromatograma patrón.

Si Ch W es el área correspondiente al aminoácido del patrón, la fórmula para el cálculo de los  $\mu$  moles de aminoácido en la muestra problema será la siguiente:

$$\mu \text{ moles} = \frac{H. W}{Ch. W} \cdot a$$

a- Concentración en moles del aminoácido presente en el volumen del patrón utilizado.

El cromatograma patrón debe obtenerse cada vez que se prepara reactivo de ninhidrina o tampón eluyente.



### E) Análisis de nicotina

El análisis de nicotina ha sido muy estudiado, pero ofrece dificultades tanto en su extracción como en su determinación. En su extracción hay que evitar la contaminación por grupos afines y en su determinación no hay una completa especificidad de sus reacciones.

Para la extracción se pueden seguir dos procedimientos

1- Destilación en corriente de vapor de agua, previa liberación del alcaloide con un álcali. Se utiliza cuando la muestra es muy abundante.

2- Destilación directa a  $180^{\circ}\text{C}$  de la nicotina. Es más cuidadoso. Para ello se usa un baño de parafina o de arena. Se utiliza cuando la muestra a analizar es muy pequeña.

Para la determinación pueden usarse métodos gravimétricos o colorimétricos.

1- Gravimétricos- Precipitación del alcaloide por medio de un ion pesado como ( ácido silícico-wolfrámico, ácido pícrico ). Se deseca y pesa.

El método gravimétrico fué perfeccionado por HAMMERLEY y WEBER ( 49 ) Utilizaron ácido silícico-wolfrámico que da con la nicotina un precipitado amorfo que cristaliza rápidamente al calentarlo a  $85^{\circ}\text{C}$ . Este método necesita una muestra abundante, pero los resultados que se obtienen son buenos.

2- Colorimétricos- Se basa en que los derivados de la piridina como la nicotina dan compuestos coloreados con el bromuro de cianógeno y aminoras

aromáticas como la anilina.

En este caso nos dará un color amarillo, inestable, que cumplirá la ley de Lambert-beer, siendo lineal dentro de unos límites con poca concentración

La máxima coloración se produce cuando el ph de la solución de anilina es de 6,1, la solución de bromuro de cianógeno es de una concentración del 10 %. La lectura máxima se da entre 7 y 14 minutos y a 460 nm ( 50 ).

Es necesario obtener previamente una curva patrón con nicotina pura.

Cada vez que se usan reactivos nuevos se debe realizar una curva patrón nueva.

Hemos usado para la extracción el método de destilación directa a 180 °C en baño de parafina y para la determinación el método colorimétrico.

Partimos de materia seca procedente de la determinación del peso seco, de la cual pesamos una pequeña cantidad.

Metodo:

Se procede con baño de parafina regulado a 180°C.

En un matraz de destilación se pone: Una pequeña cantidad de piedra pomez para evitar sobrebulliciones, la muestra a analizar y 15 ml de carbonato sódico al 5 % saturado de Cl Na para elevar el punto de ebullición y alcalinizar el medio para liberar el alcaloide.

En una probeta graduada de 10 ml se ponen 2 ml de solución de anilina al 1 % en tampón de fosfatos.

Se procede a la destilación y el líquido destilado se recoge sobre la

probeta hasta 9 ml.

Se añade 1 ml de bromuro de cianógeno sobre los 9 de la probeta, se agita y se lee en espectrofotómetro a 460 nm hasta obtener la lectura mas alta. Entre 7 y 14 minutos.

La lectura se traslada a la curva patrón y en ella se lee el equivalente a nicotina.

#### Productos y reactivos:

Piedra pomez

Carbonato sódico al 5 % saturado de Cl Na.

Solución de anilina al 1 % en tampón de fosfato a ph 6,1

( Conservarse en nevera )

Solución de bromuro de cianógeno al 10 %

( Conservarse en nevera un máximo de 2 meses )

La preparación del tampón de fosfatos a ph 6,1 se efectua:

A-  $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$  (9,072 g) para 1000 ml de agua M/15

B-  $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{Na}$  (11,86 g) para 1000 ml de agua M/15

Se mezclan A y B en la proporción de 850 ml de A con 150 ml de B.

#### Aparatos:

Destilador en baño de parafina

Espectrofotómetro Zeiss, PMR/11

### Obtención de la curva patrón de nicotina

Los resultados del método colorimétrico deben referirse a una curva patrón obtenida con nicotina pura, y realizada con los mismos reactivos usados en el proceso analítico. Cada vez que cambiamos de reactivos, debemos repetir la curva patrón.

Primeramente necesitamos nicotina pura, pero debemos considerar que aún la nicotina conservada herméticamente cerrada y a baja temperatura, se altera con el tiempo dando productos de oxidación pardos en cantidad considerable, este color enmascararía la reacción coloreada que vamos a realizar.

Para tener nicotina pura debemos proceder a su destilación a 240°C.

En un matraz de destilación pondremos piedra pomez y nicotina. Recogemos en un erlenmeyer. Redestilamos en sucesivos matraces limpios. Repetimos la destilación sucesivamente hasta que el producto resultante sea incoloro. Esto se consigue normalmente después de la cuarta o quinta destilación.

Para determinar si la nicotina es pura diluimos convenientemente una pequeña cantidad de la misma y medimos la absorción a 259 nm. Procedemos a una nueva destilación y con una pequeña parte del destilado diluido de la misma forma medimos de nuevo la absorción a 259 nm. Las absorciones

deben ser idénticas.

*Método:*

A partir del último destilado hacemos diluciones con Cl H 0,05N, obteniendo así distintas concentraciones de nicotina.

Preparamos una serie de tubos en los que ponemos:

2 ml de solución de anilina al 1 ‰ en tampón de fosfatos

7 ml de las distintas diluciones

1 ml de bromuro de cianógeno al 10 ‰

Se lee en espectrofotómetro a 460 nm hasta obtener la lectura más alta.

Se lleva a una gráfica.

La reacción es lineal desde 1  $\mu$ g hasta 20  $\mu$ g de nicotina por ml.

*Productos y reactivos:*

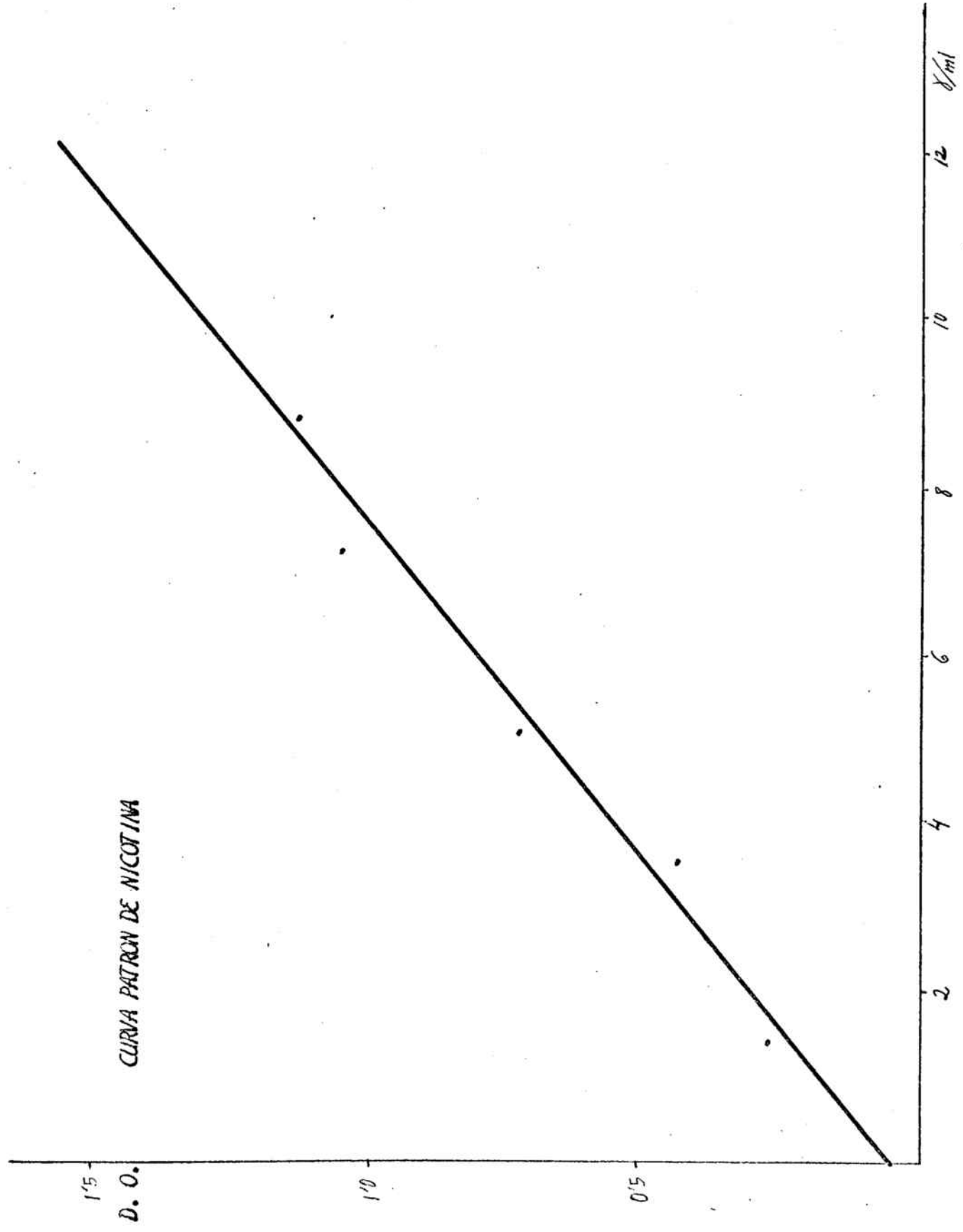
Nicotina de la firma Fluka.

Acido clorhídrico 0,05 N

Solución de anilina al 1 ‰ en tampón de fosfatos a ph 6,1

Solución de bromuro de cianógeno al 10 ‰.

CURVA PATRON DE NICOTINA



## RESULTADOS Y SU DISCUSION

### Crecimiento

El crecimiento lineal y el desarrollo de las plantas control y tratadas con las dosis I y II de plomo, están representados numérica y gráficamente en la tabla I y en las gráficas 1, 2 y 3.

El tratamiento con plomo influye en el ciclo vital de las plantas de Nicotiana rustica L., adelantando la floración y fructificación, con respecto a las plantas control. Las plantas Pb II inician la floración en la segunda muestra, mientras que las Pb I y las control la inician en la tercera, aunque visiblemente estimulada en las Pb I. Es decir, la adición de este elemento parece acortar el ciclo vegetativo, y los demás procesos de crecimiento quedan afectados por este fenómeno, ya que la senescencia de hojas, tallos y raíces en las plantas anuales está genéticamente controlada y condicionada por la floración y fructificación. Así, al comparar las muestras correspondientes a los ensayos Control, I y II, es necesario tener en cuenta su estado vegetativo, y consecuentemente las plantas tratadas con plomo han adelantado el tiempo correspondiente a una muestra ( 7 días ) su ciclo evolutivo, respecto a las plantas control.

Siguiendo este criterio, las plantas control manifiestan en su parte

aerea un curso de crecimiento continuamente ascendente y superior al de las plantas tratadas con plomo.

En cuanto al crecimiento de las raices, en las plantas control es ascendente hasta la cuarta muestra ( floración ), para descender en la quinta ( primeros frutos ), mientras que en las raices de las plantas tratadas con dosis de plomo I y II siguen un curso de crecimiento continuamente ascendente y ligeramente inferior a las control.

#### Peso fresco y peso seco

En cuanto al peso fresco ( tabla 2 y gráficos 4, 5, y 6 ) concierne, las plantas control siguen un curso ascendente tanto en la parte aerea como en la raiz hasta la cuarta muestra, para descender en la quinta.

Excepto en tallos control, 5<sup>a</sup> muestra, y hojas y raices Pb II, 5<sup>a</sup> muestra, el peso seco de las plantas ( tablas 3 y 4 y gráficos 7, 8 y 9 ) es continuamente ascendente y superior en las plantas control que en las tratadas con plomo. Este resultado podría parecer poco claro en las inflorescencias, ya que, el peso de la inflorescencia control, 5<sup>a</sup> muestra, es muy inferior al de la Pb II, 4<sup>a</sup> muestra, pero el número de frutos es también menor e influye considerablemente en el peso.

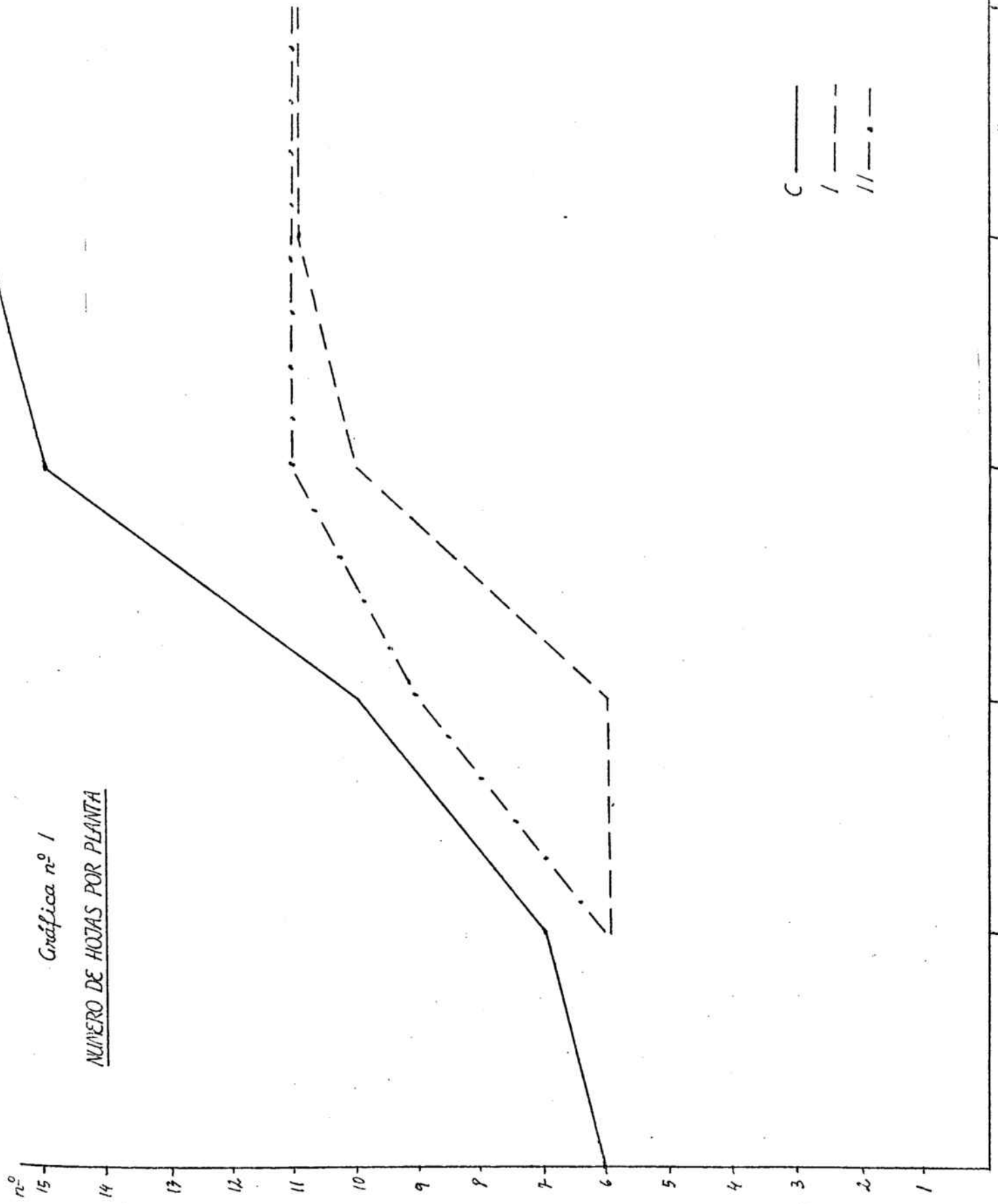


Tabla nº 1

ESTADO VEGETATIVO Y MEDIDAS

Muestras	C						I						II						
	Nº de Tallo cm	Raiz cm	Inflo- rescen- cia	Nº de hojas	Tallo cm	Raiz cm	Inflo- rescen- cia	Nº de hojas	Tallo cm	Raiz cm	Inflo- rescen- cia	Nº de hojas	Tallo cm	Raiz cm	Inflo- rescen- cia	Nº de hojas	Tallo cm	Raiz cm	Inflo- rescen- cia
1	6	21	9	-	6	26,4	12,5	6	27	9	-	6	27	9	-	6	27	9	-
2	7	27,5	10	-	6	32	8,5	6	33,6	10,5	-	9	33,6	10,5	Flores	9	33,6	10,5	Flores
3	10	44,5	13,5	Inicial	10	45	14,5	10	44,5	14	Flores	11	44,5	14	2 Frutos	11	44,5	14	2 Frutos
4	15	60	18,5	Flores	11	51,5	14	11	57,5	14,5	9 Frutos	11	57,5	14,5	9 Frutos	11	57,5	14,5	9 Frutos
5	16	62	12,5	12 Frutos	11	59	14,5	11	67	15	15 Frutos	11	67	15	25 Frutos	11	67	15	25 Frutos

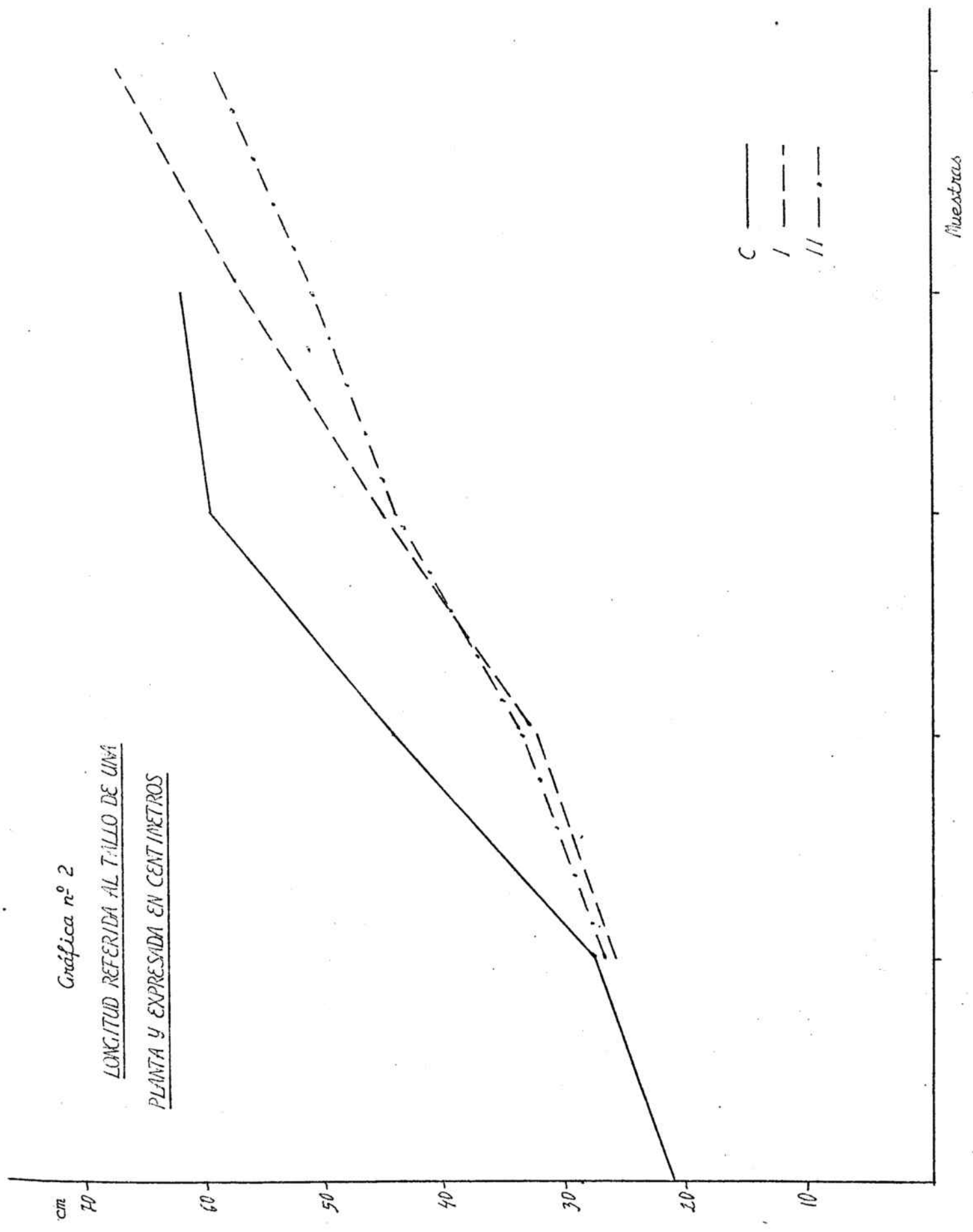
*Gráfica n.º 1*  
NUMERO DE HOJAS POR PLANTA



Muestras

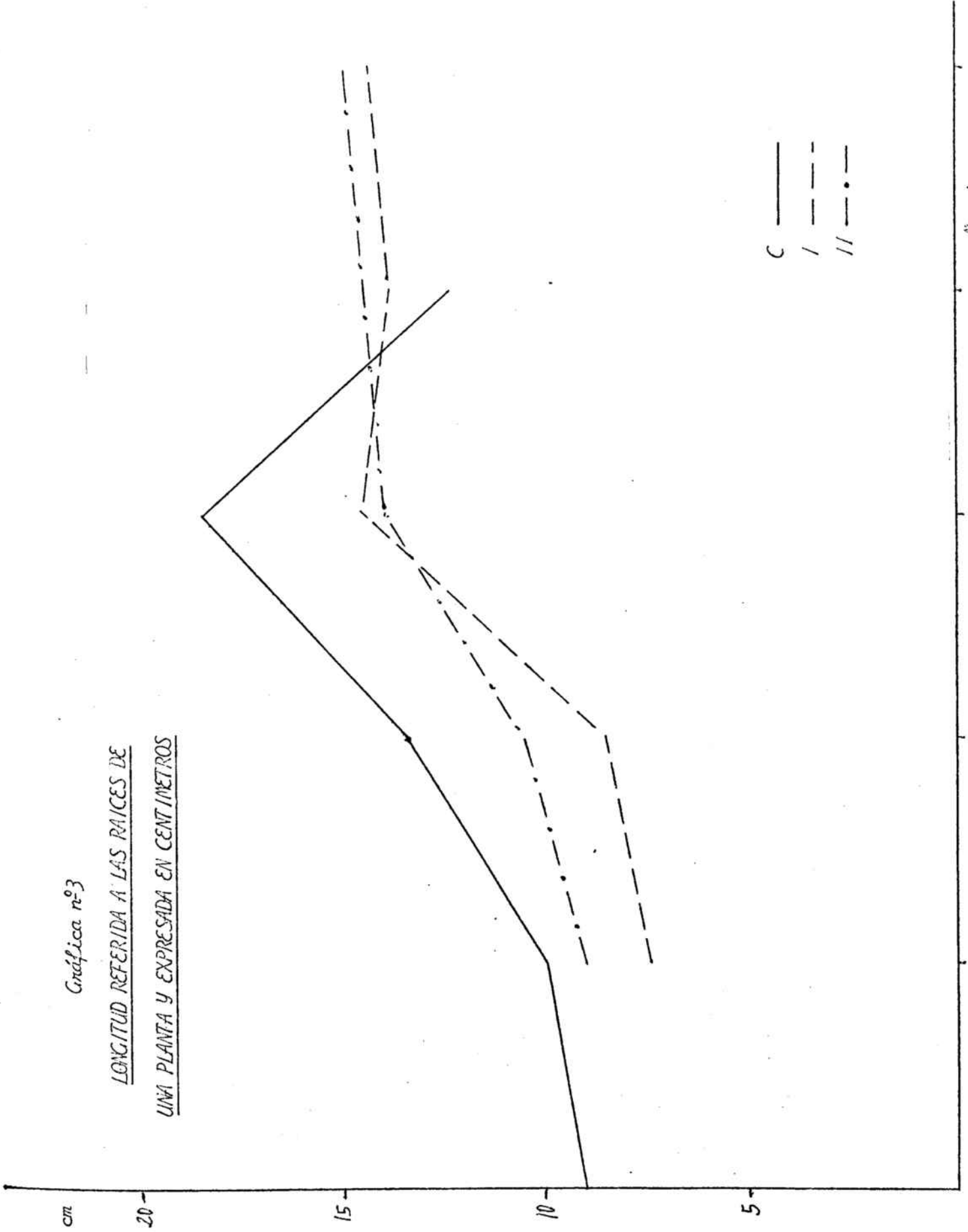
Gráfica n.º 2

LONGITUD REFERIDA AL TALLO DE UVA  
PLANTA Y EXPRESADA EN CENTIMETROS



Gráfica n°3

LONGITUD REFERIDA A LAS RAICES DE  
UNA PLANTA Y EXPRESADA EN CENTIMETROS



C ———  
I - - - -  
II - · - -

días

Tabla n.º 2

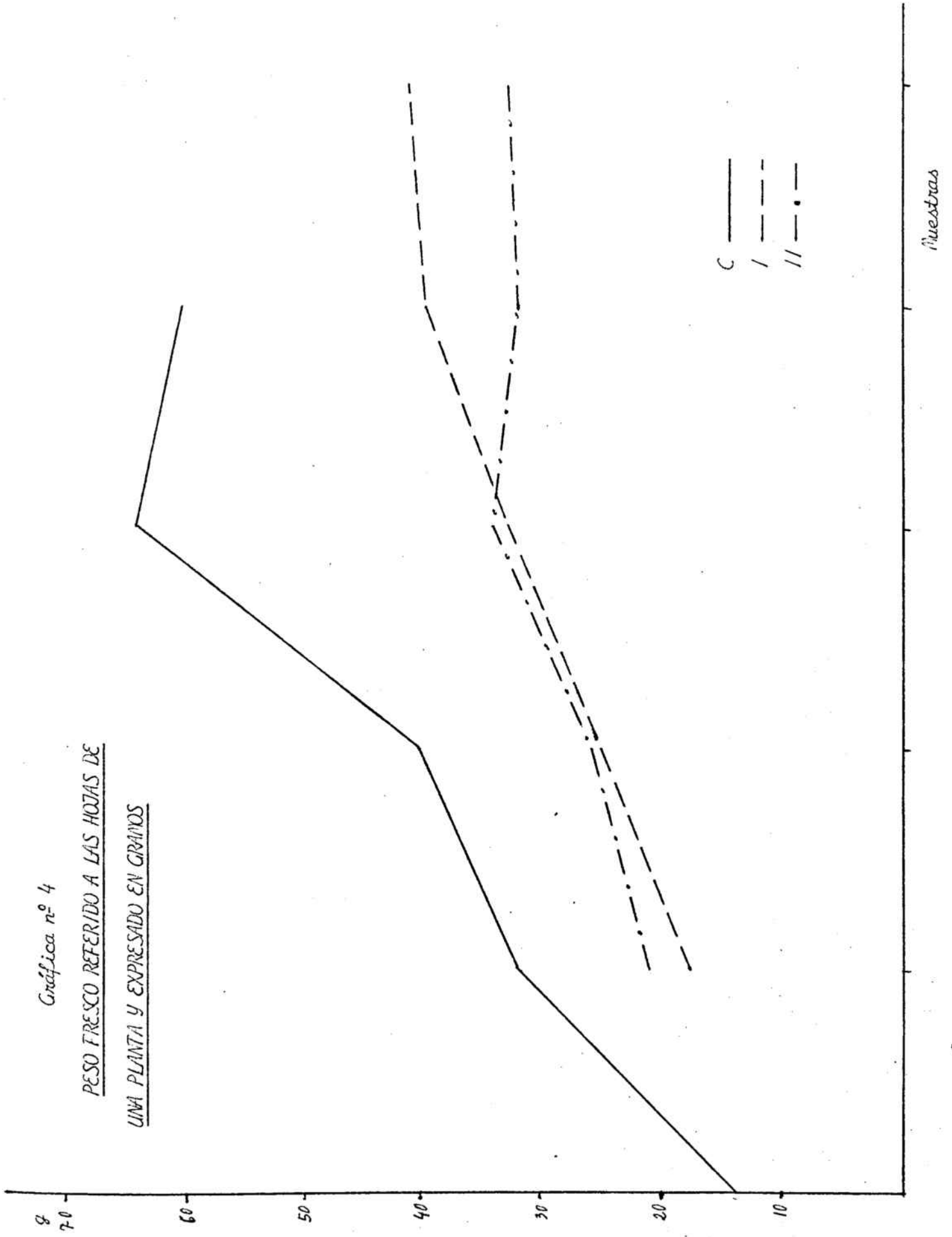
PESO FRESCO EXPRESADO EN GRANOS

Muestras	C					I					II				
	H	T	R	I	-	H	T	R	I	-	H	T	R	I	-
1	13,7	7,3	1,3	-	-	17,9	9,9	1,5	-	-	21	11,2	2,0	-	-
2	32,4	14,1	2,1	-	-	25,1	13,7	2,4	-	-	25,5	14,2	2,6	-	-
3	40,6	20	5,5	-	-	32,9	11,5	4,9	1	1	34	15,5	5,5	5,1	-
4	64,1	35,8	9,7	4,1	4,1	39,9	12,8	7,2	1,4	1,4	32	33	11,9	10	-
5	60,3	33,1	10,5	5,9	5,9	40,7	19	11,1	11,4	11,4	32,5	30	10,5	11,3	-

Gráfica n.º 4

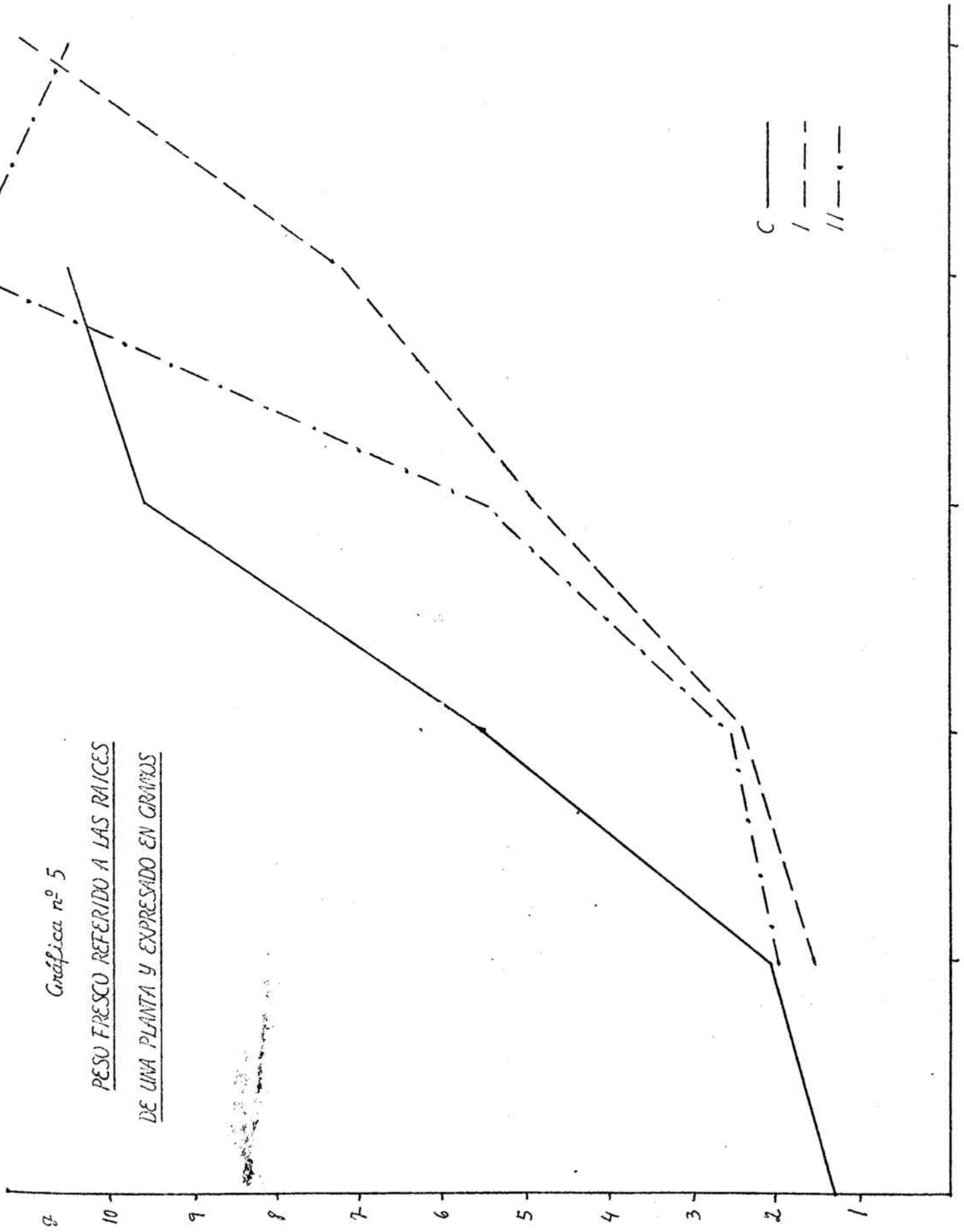
PESO FRESCO REFERIDO A LAS HOJAS DE

UNA PLANTA Y EXPRESADO EN GRANOS



Gráfica n° 5

PESO FRESCO REFERIDO A LAS RAICES  
DE UNA PLANTA Y EXPRESADO EN GRAMOS



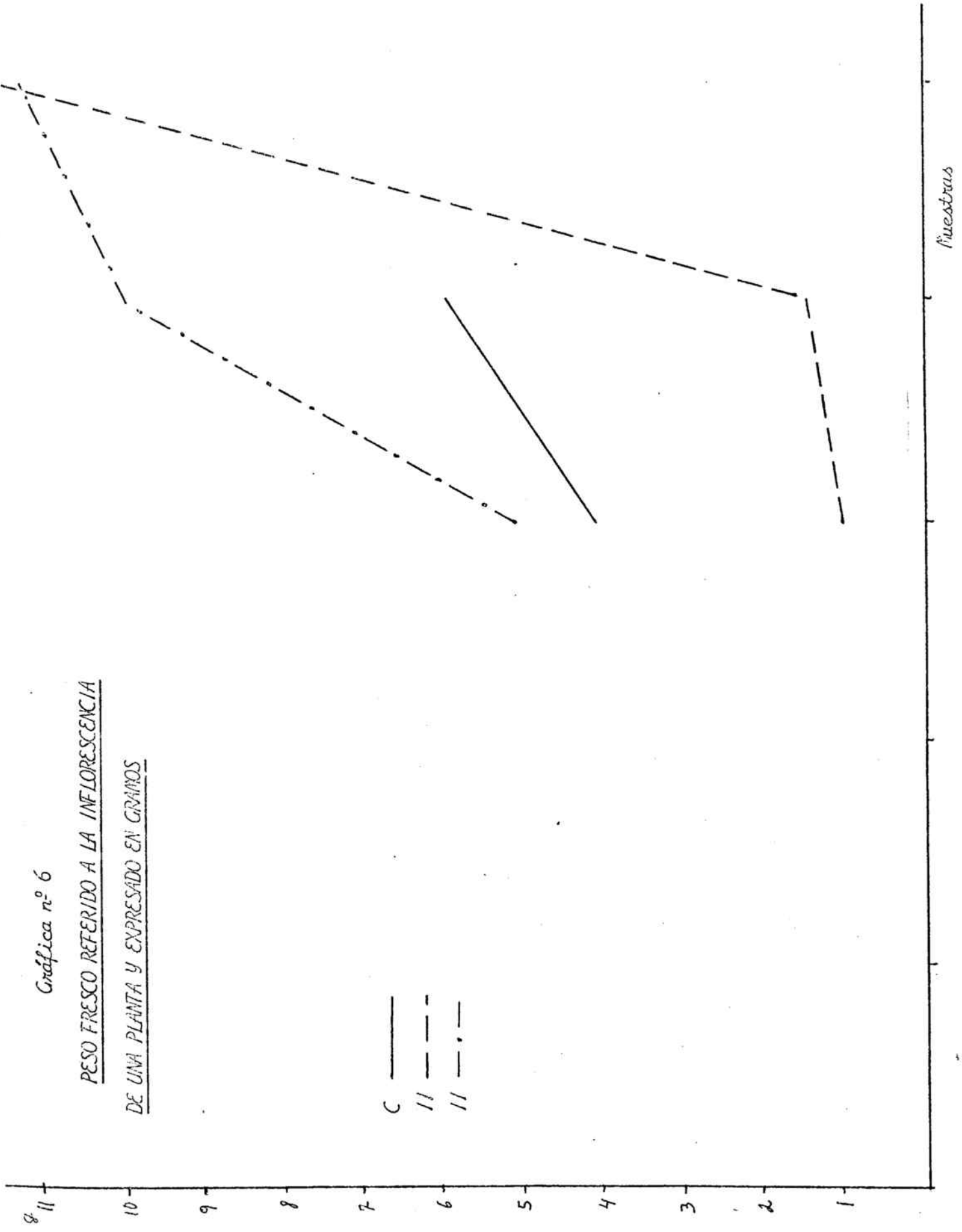
Muestras

Gráfica n° 6

PESO FRESCO REFERIDO A LA INFLORESCENCIA

DE UNA PLANTA Y EXPRESADO EN GRAMOS

C ———  
II - - -  
II - · - ·



Muestras



Tabla nº 3

PESO SECO EXPRESADO EN MILIGRAMOS

Muestras	C										I			II		
	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	H	T	R	I	
1	835	300	118	-	1215	466	120	-	1360	400	154	-	-	-	-	
2	1525	497	190	-	1560	630	194	-	1570	605	198	-	-	-	-	
3	1845	915	414	-	1853	707	394	116	1850	893	386	616	-	-	-	
4	3138	1758	727	604	1963	865	600	174	2130	1399	922	1445	-	-	-	
5	3235	1464	851	760	2370	927	842	1436	1956	2005	800	2228	-	-	-	

Tabla nº 4

PORCENTAJE DE PESO SECO

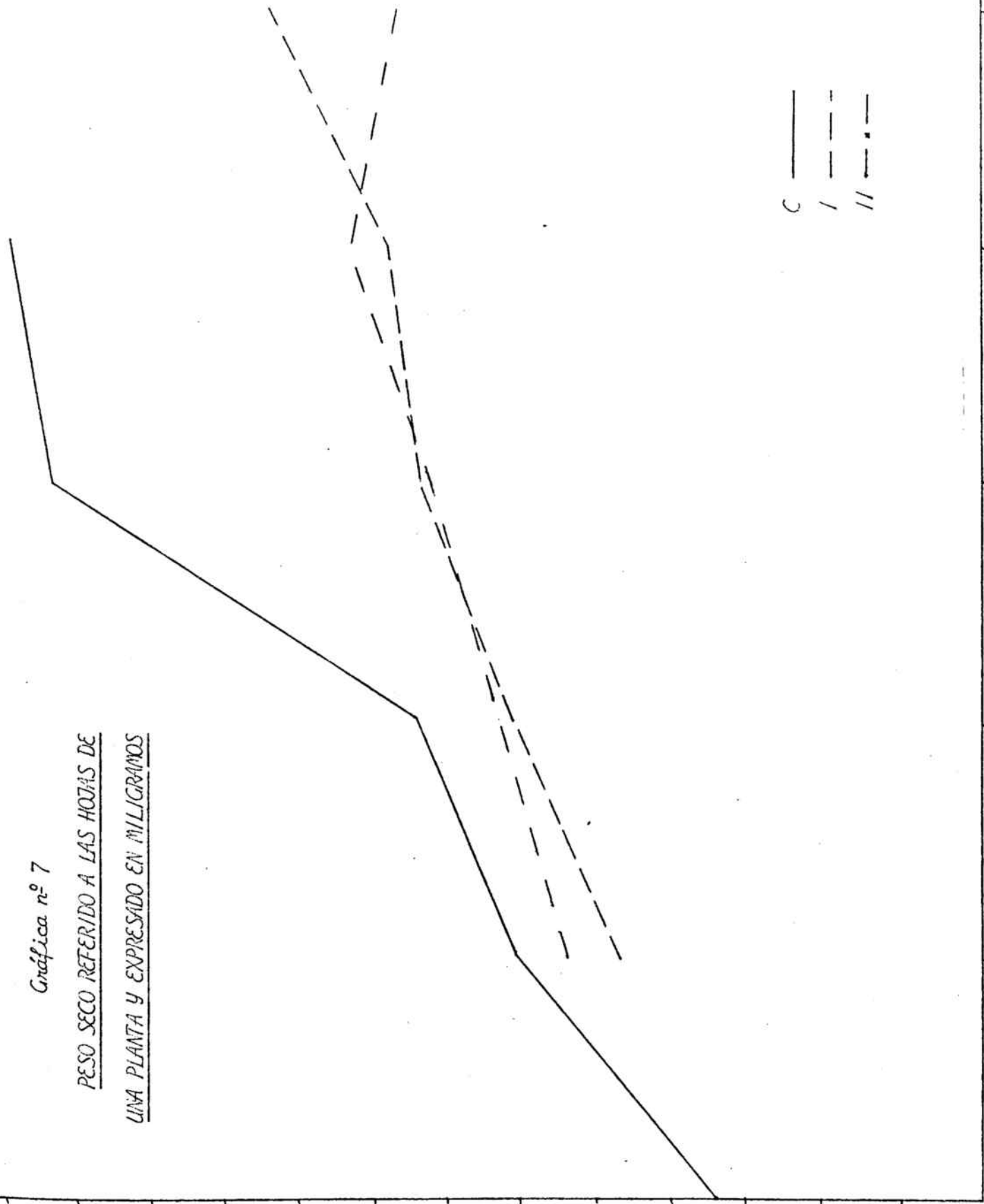
Muestras	C										I					II								
	H		T		R		I		H		T		R		I		H		T		R		I	
1	6,18	4,10	9,07	-	6,78	4,70	7,66	-	6,47	3,57	7,47	-	6,47	3,57	7,47	-	6,47	3,57	7,47	-	6,47	3,57	7,47	-
2	4,70	3,52	9,04	-	6,21	4,61	7,94	-	6,15	4,26	7,61	-	6,15	4,26	7,61	-	6,15	4,26	7,61	-	6,15	4,26	7,61	-
3	4,54	4,57	7,52	-	5,63	6,15	8,04	11,60	5,44	5,76	7,00	12,07	5,44	5,76	7,00	12,07	5,44	5,76	7,00	12,07	5,44	5,76	7,00	12,07
4	4,89	4,91	7,50	14,73	4,92	6,75	8,33	12,42	6,65	6,08	7,74	14,45	6,65	6,08	7,74	14,45	6,65	6,08	7,74	14,45	6,65	6,08	7,74	14,45
5	5,36	4,42	8,04	12,88	5,82	4,88	7,58	12,59	6,02	6,68	7,57	19,71	6,02	6,68	7,57	19,71	6,02	6,68	7,57	19,71	6,02	6,68	7,57	19,71

Gráfica nº 7

PESO SECO REFERIDO A LAS HOJAS DE

UNA PLANTA Y EXPRESADO EN MILIGRAMOS

3250  
mg  
3000  
2750  
2500  
2250  
2000  
1750  
1500  
1250  
1000  
750  
500  
250

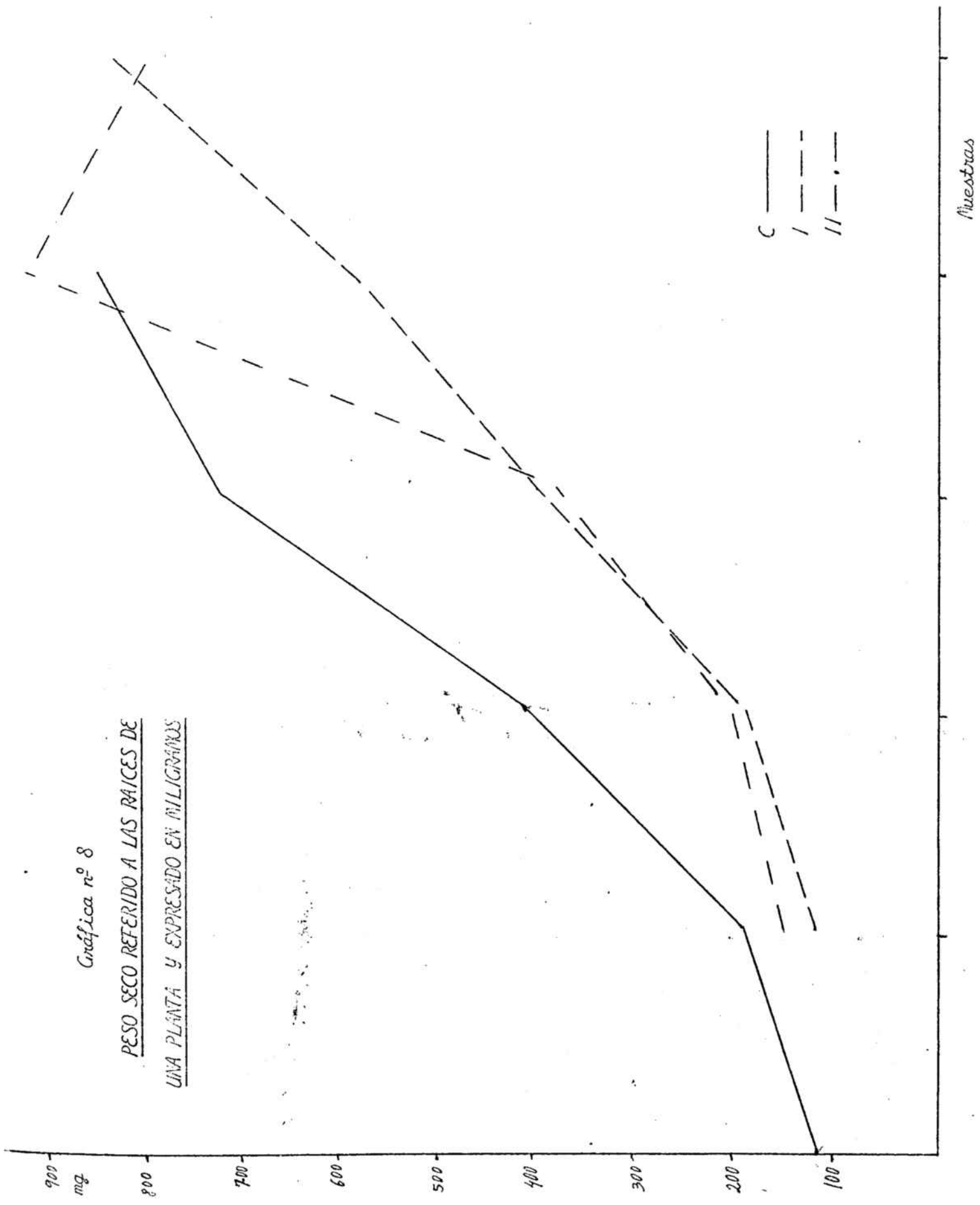


C —  
I - -  
II - · -

Muestras

Gráfica nº 8

PESO SECO REFERIDO A LAS RAICES DE  
UNA PLANTA Y EXPRESADO EN MILIGRAMOS



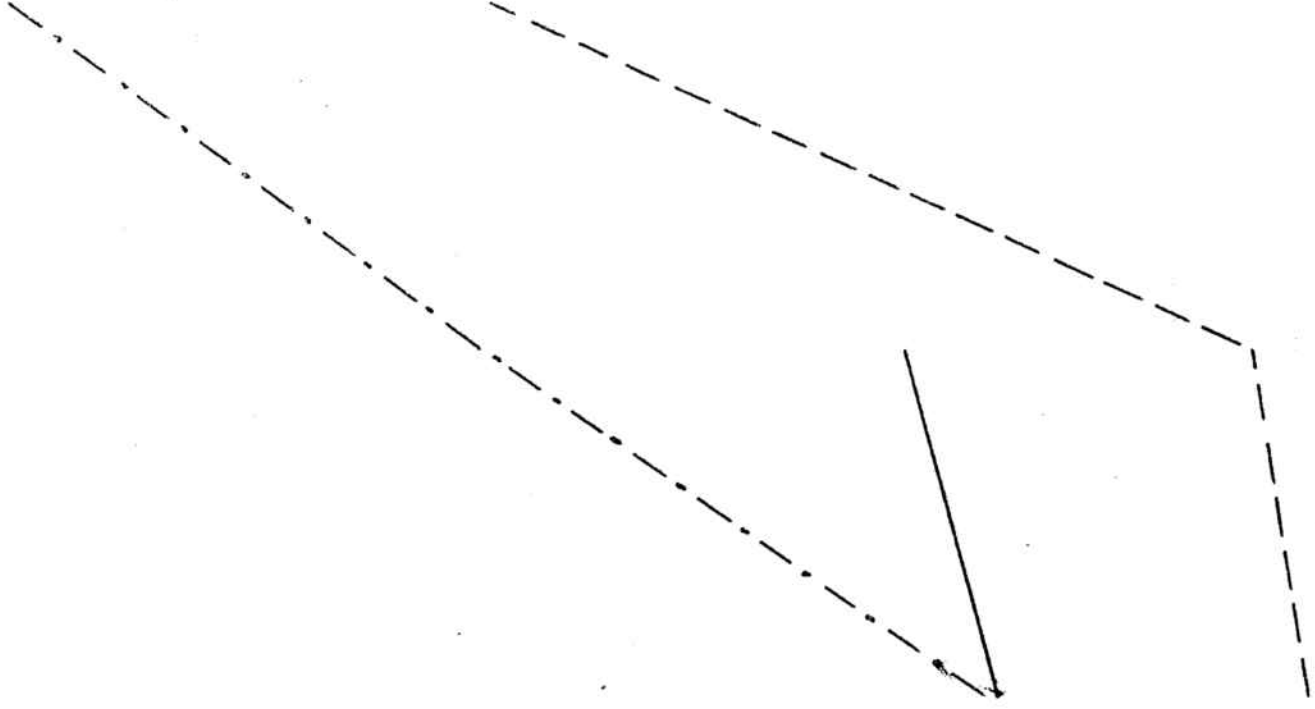
Gráfica nº 9

PESO SECO REFERIDO A LA INFLORESCENCIA  
DE UNA PLANTA Y EXPRESADO EN MILEGRAMOS

C ———  
/ - - -  
// - · -

2.200  
mg  
2.000  
1.800  
1.600  
1.400  
1.200  
1.000  
800  
600  
400  
200

Muestras



### Pigmentos liposolubles

Aplicando los métodos anteriormente descritos, hemos llegado a los resultados de las tablas 5 y 6 y de las gráficas 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

Se observa que el contenido en clorofila a y b en las plantas control y Pb 1, es ascendente hasta la 4ª muestra para descender notablemente en la 5ª muestra, debido sin duda a los fenómenos de senescencia que implican rotura de las clorofilas. Sin embargo, las plantas Pb 11 llevan un curso de clorofila a y b continuamente ascendente a pesar de que su ciclo vegetativo está considerablemente adelantado con respecto a las plantas control, tal como ya hemos comentado. Este hecho lo podríamos interpretar como una inhibición de la degradación de las clorofilas por la presencia de una alta dosis de plomo, o bien como una formación de complejos de los productos de degradación de las clorofilas con el ion plomo, que daría unas bandas de absorción tales que enmascararían la pérdida de clorofila, ya que según se ha comentado en la introducción, se ha encontrado una gran estabilidad en los complejos organo-metálicos que se forman en las plantas.

Si comparamos los contenidos en clorofilas en las plantas control, Pb 1 y Pb 11 podemos observar que en el estado prefloral los contenidos son muy similares, pero desde el momento de la floración son muy superiores en las plantas control. Podríamos explicar este fenómeno como una

inhibición de la síntesis de clorofilas en las plantas maduras en presencia de plomo. Muchos investigadores han encontrado que el plomo en diversas dosis es capaz de inhibir los enzimas que actúan en la formación del ac.  $\delta$  amino levulínico, precursor de la clorofila. La razón de que esta inhibición no se produzca hasta el momento de la floración puede deberse a la dificultad de transporte de este elemento en la planta.

En la tabla 7 se han consignado los valores de la relación clorofila a/clorofila b. Podemos considerar que el plomo no altera esta relación.

En cuanto al contenido de carotenoides:

- En las plantas control es ascendente hasta la 4<sup>a</sup> muestra para descender en la 5<sup>a</sup>. El incremento que experimentan estos pigmentos no es uniforme sino que podemos observar la presencia de 2 acusados aumentos, uno de la 1<sup>a</sup> a la 2<sup>a</sup> muestra y otro de la 3<sup>a</sup> a la 4<sup>a</sup>.

- En las plantas Pb I siguen un curso de ascenso suave hasta la 4<sup>a</sup> muestra y después experimentan un descenso.

- En las plantas Pb II siguen un curso de suave ascenso a lo largo de toda la experiencia.

Es de considerar el incremento producido en el contenido de carotenoides a lo largo de nuestra experiencia, que en las plantas control es del orden  $1/26$ , en las Pb I  $1/5$  y en las Pb II  $1/2$  de la 1<sup>a</sup> a la 5<sup>a</sup> muestra respectivamente.

Podemos deducir de estos resultados que la síntesis de carotenoides queda inhibida por efecto del plomo.

Tabla n.º 5

PIGMENTOS LIPOSOLUBLES REFERIDOS A LAS HOJAS DE UNA PLANTA Y EXPRESADOS EN MILIGRAMOS

Muestras	C					I					II				
	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des
1	9,02	3,50	0,64	8,92	3,27	1,51	8,17	3,84	2,73						
2	14,78	6,23	3,02	13,88	5,87	2,80	11,80	5,30	2,79						
3	21,30	8,18	4,88	40,04	17,14	5,67	22,36	8,73	4,11						
4	71,11	25,01	14,24	40,14	15,37	7,44	26,50	13,72	4,79						
5	47,81	20,77	8,55	29,78	14,02	5,77	29,03	13,30	5,85						



Tabla nº 6

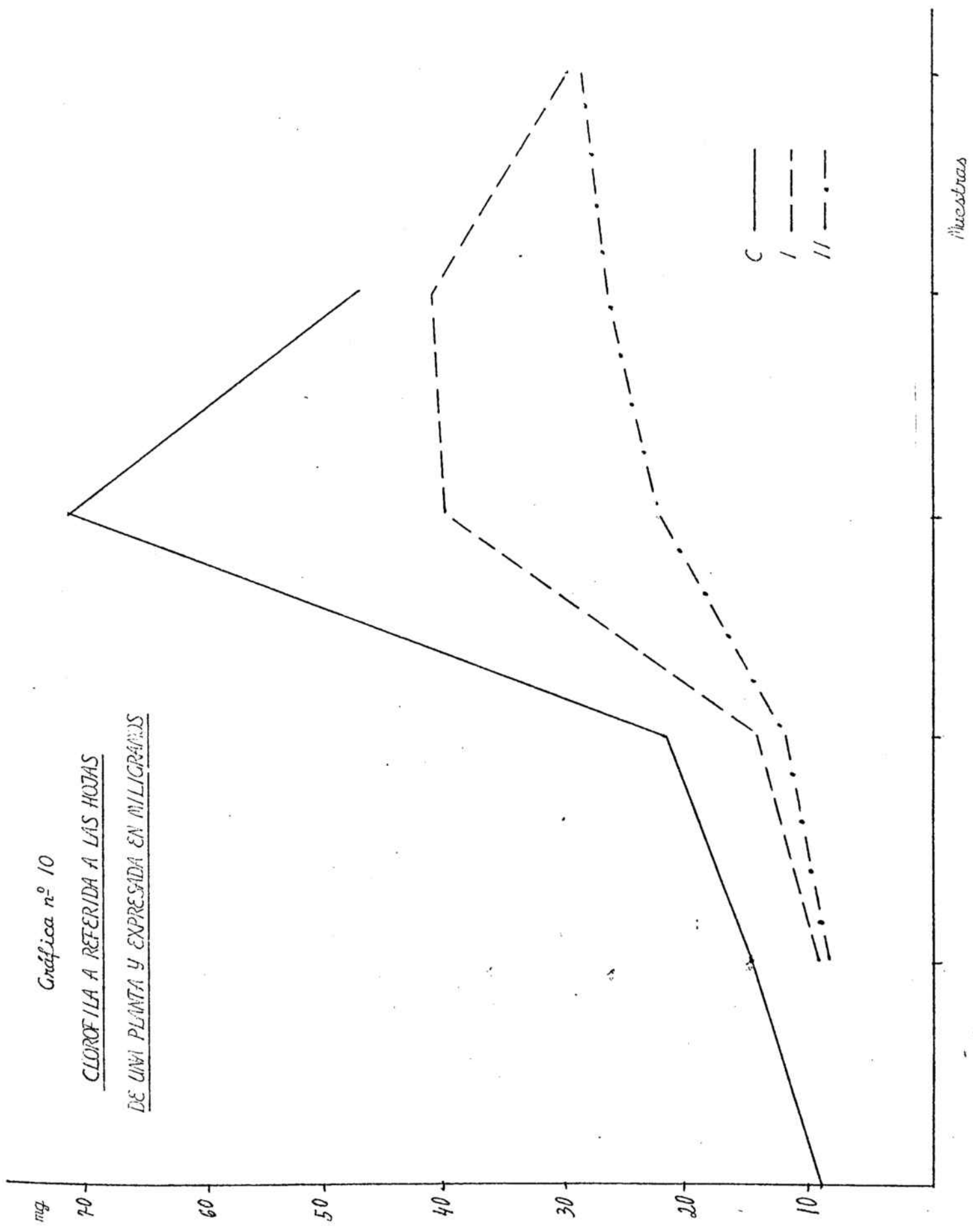
PIGMENTOS LIPOSOLUBLES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO DE HOJAS

Muestras	C					I					II					
	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des	Cloro- fila a	Cloro- fila b	Caro- tenoi- des
1	1,06	0,41	0,07	0,68	0,26	0,60	0,28	0,12	0,60	0,28	0,60	0,28	0,12	0,60	0,28	0,20
2	0,96	0,40	0,19	0,98	0,41	0,85	0,33	0,18	0,85	0,33	0,85	0,33	0,18	0,85	0,33	0,17
3	1,15	0,44	0,26	2,16	0,94	1,20	0,47	0,30	1,20	0,47	1,20	0,47	0,30	1,20	0,47	0,22
4	2,26	0,79	0,45	2,04	0,78	1,24	0,50	0,37	1,24	0,50	1,24	0,50	0,37	1,24	0,50	0,22
5	1,47	0,64	0,26	1,25	0,46	1,48	0,68	0,26	1,48	0,68	1,48	0,68	0,26	1,48	0,68	0,29

Gráfica n° 10

CLOROFILA A REFERIDA A LAS HOJAS

DE UNA PLANTA Y EXPRESADA EN M.LLIGRAMOS

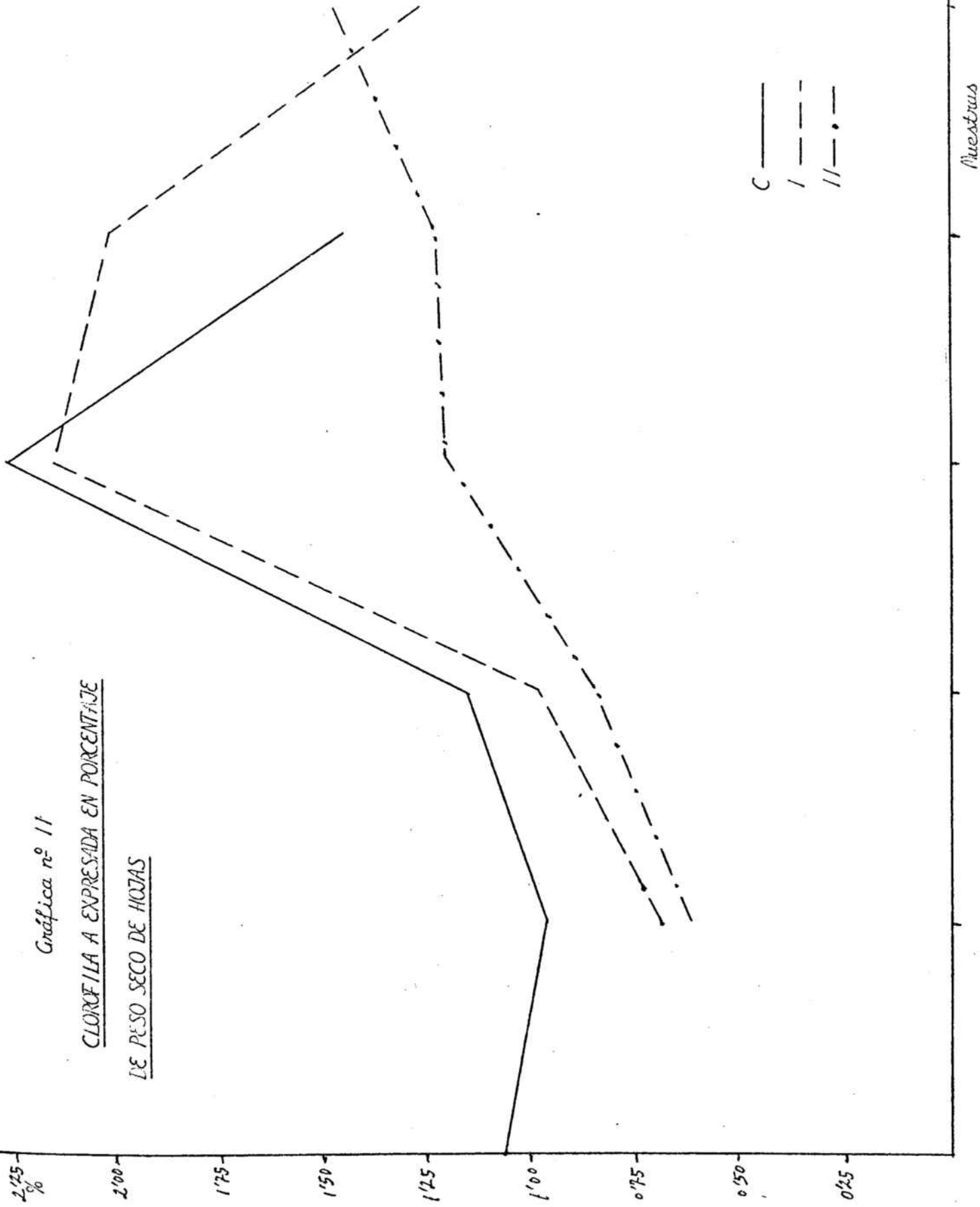


muestras

Gráfica n° 11

CLOROFILA A EXPRESADA EN PORCENTAJE

DE PESO SECO DE HOJAS

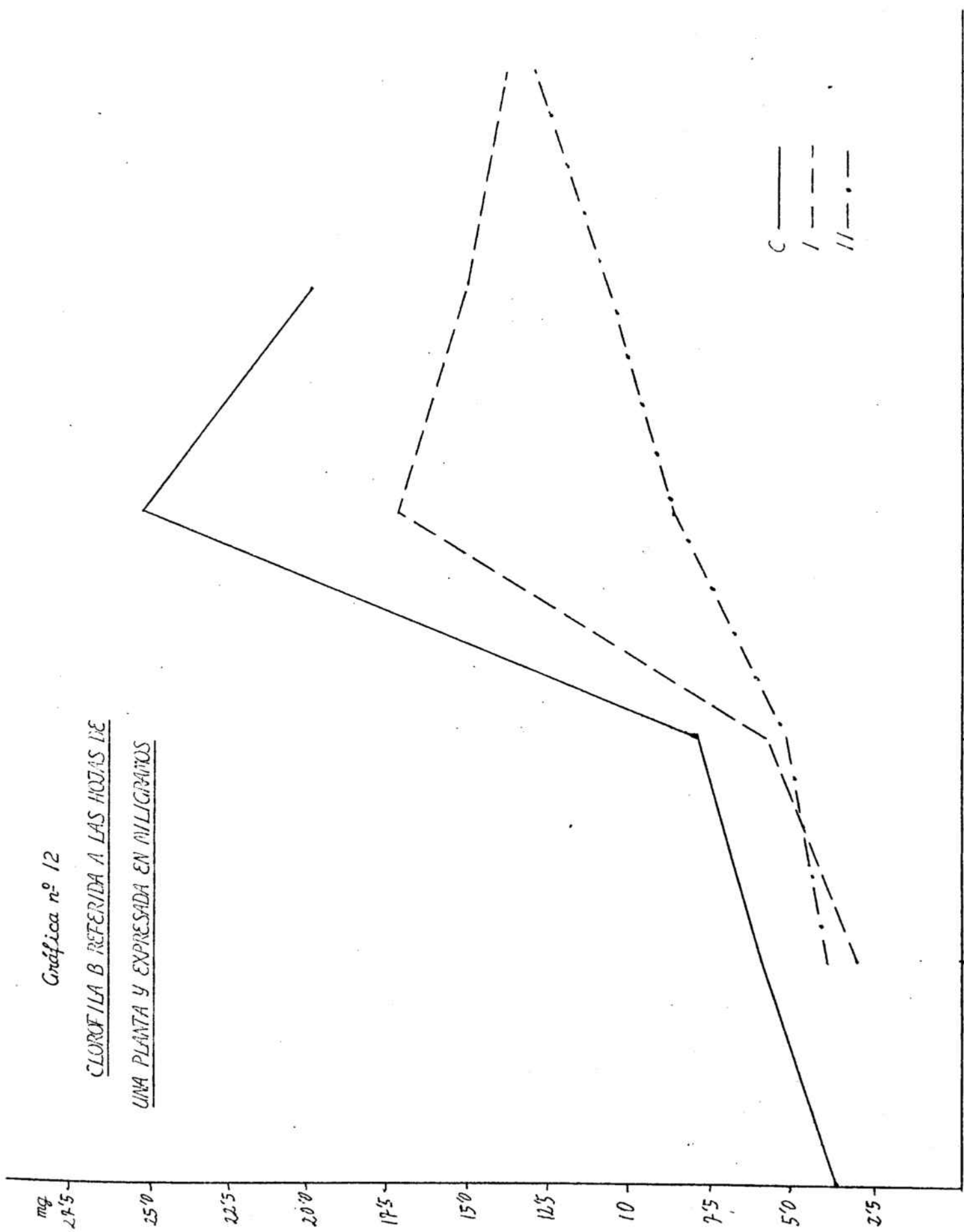


Muestras

Gráfica nº 12

CLOROFILA B REFERIDA A LAS HOJAS DE

UNA PLANTA Y EXPRESADA EN MILIGRAMOS



Directa

Gráfica n.º 13

CLOROFILA B EXPRESADA EN PORCENTAJE  
DE PESO SECO DE HOJAS

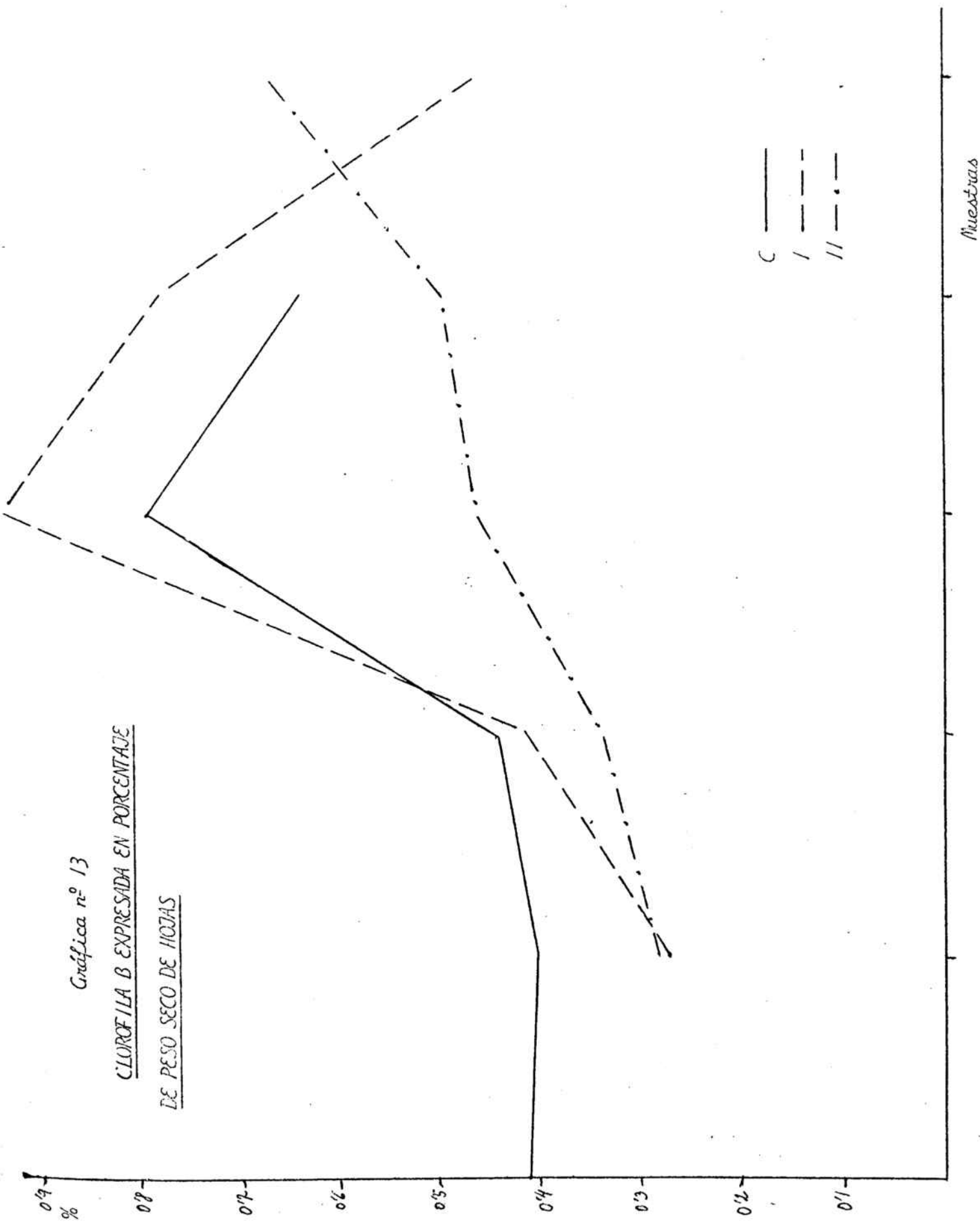


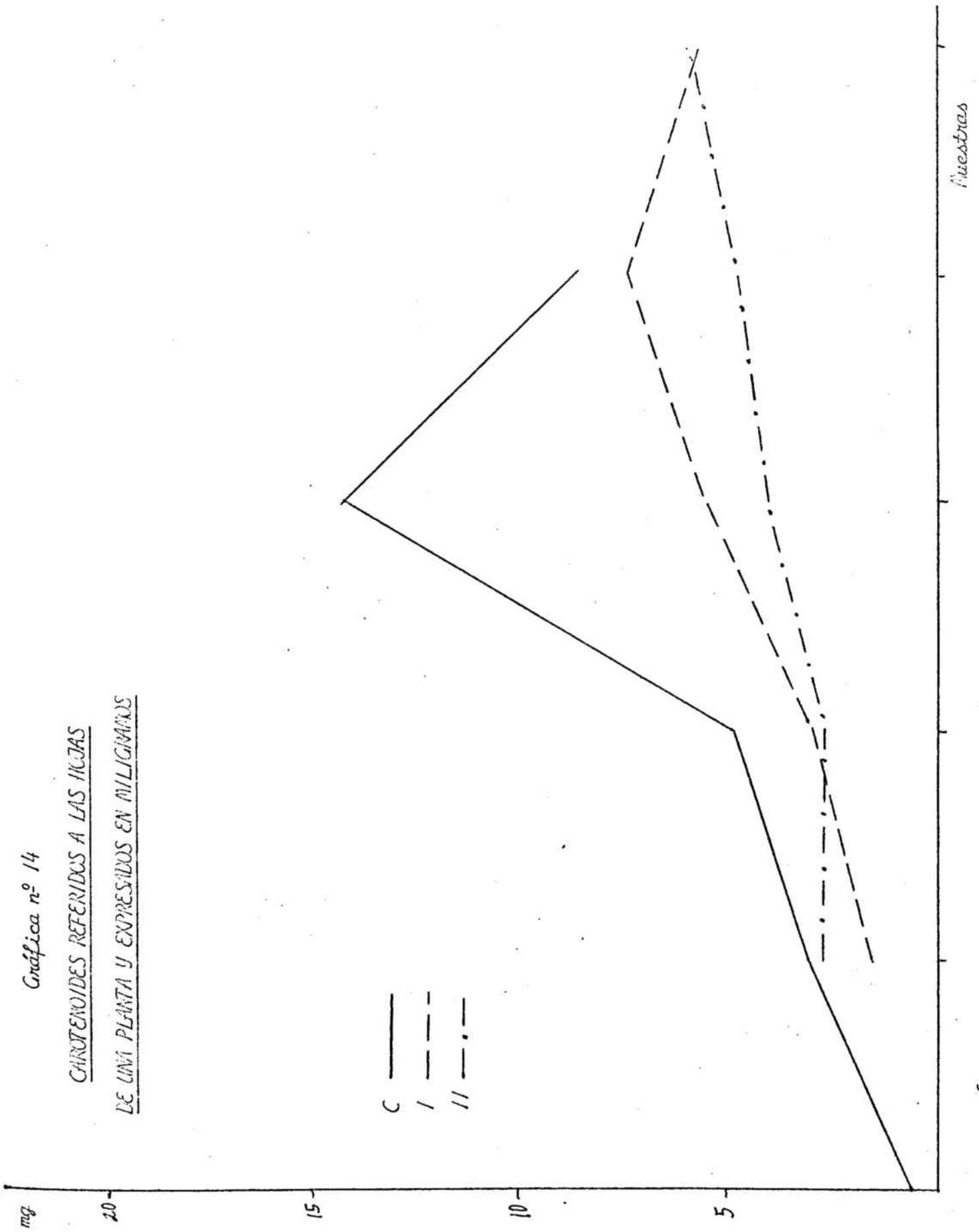
Tabla n° 7

RELACION CLOROFILA A/CLOROFILA B

Muestras	1	2	3	4	5
C	2,577	2,373	2,604	2,842	2,301
I	2,722	2,362	2,295	2,610	2,123
II	2,124	2,223	2,559	2,470	2,181

Gráfica n° 14

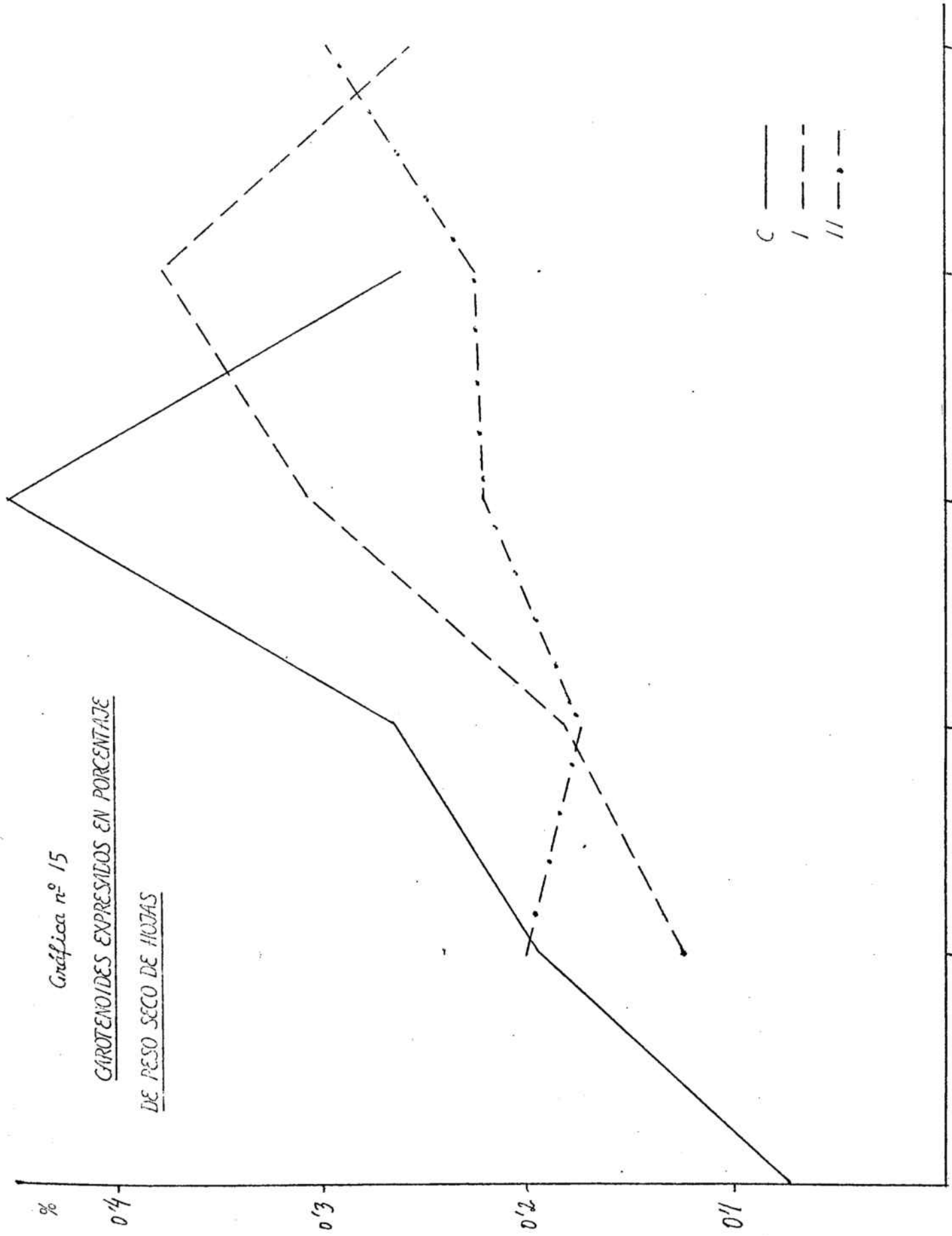
CAROTENOIDES REFERIDOS A LAS HOJAS  
DE UNA PLANTA Y EXPRESADOS EN M/LIGRAMOS



Gráfica n° 15

CAROTENOIDES EXPRESADOS EN PORCENTAJE

DE PESO SECO DE HOJAS



muestras



### Ácidos nucleicos

Los resultados de los análisis de los ácidos nucleicos están representados en las tablas 8, 9, 10, 11 y en las gráficas 16-30.

El curso seguido por los valores absolutos de ADN en hojas de las plantas control es continuamente ascendente; por el contrario, en las hojas de las plantas tratadas con plomo se observa un curso, en su contenido de ADN, ascendente hasta la 2ª muestra y luego descendente.

Si comparamos los valores de los contenidos de ADN de las plantas control con las tratadas con plomo observamos que en la primera mitad de la experiencia, estado prefloral, los valores de las plantas control son inferiores a los de las plantas tratadas con plomo; mientras que en la segunda mitad de la experiencia ( floración y fructificación ) los valores son superiores en las plantas control. Este resultado es concordante con las experiencias de CHOYE en animales, ya que encontró que el plomo causa un aumento en la síntesis de ADN, a la que sigue una oscilación en la mitosis.

Es interesante observar que los porcentajes de ADN por peso seco en las hojas, tabla 9 y gráfica 17, son en las plantas control continuamente descendentes hasta la 4ª muestra para ascender en la 5ª. Este resultado es lógico puesto que las plantas ya adultas dividen sus células en menor

proporción y por el contrario sintetizan gran cantidad de otras sustancias, ya sean proteínas o sustancias inertes tales como celulosa y lignina, que aumentan el peso seco. En la 5ª muestra las plantas están en franca senescencia y translocan las sustancias más móviles lo que hace aumentar la proporción de ADN.

Si comparamos los valores de los porcentajes de ADN en las plantas control y tratadas con plomo, observamos que los porcentajes más altos corresponden a las dosis superiores de plomo. Excepto en la 1ª muestra los porcentajes siguen el orden Pb 11 > Pb 1 > C.

En las plantas tratadas con plomo los porcentajes siguen un curso continuamente descendente. Según estos resultados el plomo tendría un estímulo sobre la síntesis de ADN en el estado prefloral, esta síntesis está en parte ligada al crecimiento, pero en parte es independiente del mismo. Experiencias realizadas por CHOÏE dieron como resultado que este aumento en la síntesis de ADN no es una respuesta regenerativa, ni debida a fluctuaciones circadianas.

Los contenidos de ADN en tallos ( tablas 8 y 9 y gráfica 18 ) de las plantas control y tratadas con Pb 1 son ascendentes hasta la 4ª muestra para descender en la 5ª. Por el contrario en Pb 11 los niveles de ADN son continuamente ascendentes.

Los porcentajes de ADN por peso seco de tallo son continuamente descendentes en todos los casos.

Los contenidos de ADN en las raíces ( tablas 8 y 9 y gráficas 19 y 20 )

de las plantas control y Pb I aumentan continuamente. En plantas Pb II aumentan hasta la 4<sup>a</sup> muestra y bajan en la 5<sup>a</sup> muestra, este resultado seguramente es debido a que la senescencia del órgano está más avanzada.

Si tenemos en cuenta los porcentajes por peso seco de raíz se observa que son continuamente descendentes manteniéndose al igual que en los valores absolutos superiores las plantas Pb I y Pb II a las control.

Los valores absolutos de ADN en las inflorescencias ( tablas 8 y 9 y gráficas 21 y 22 ) son continuamente ascendentes en todos los casos, y revelan el estado de desarrollo de las semillas que se están formando en las inflorescencias, cuando se halla en estado de desarrollo incipiente los porcentajes de ADN por peso seco aumentan para mantenerse y descender al terminar la formación de las semillas.

Si atendemos a los niveles de ARN en las hojas ( tablas 10 y 11 y gráficas 23 y 24 ), se observa que las plantas control muestran niveles ascendentes hasta la 4<sup>a</sup> muestra y descienden en la 5<sup>a</sup> muestra. Las plantas Pb I aumentan continuamente sus contenidos de ARN y las Pb II aumentan de la 1<sup>a</sup> a la 2<sup>a</sup> muestra, y luego descienden.

Si comparamos los porcentajes de ARN por peso seco de hoja, se observa que las plantas control siguen un curso de lógico descenso de la 1<sup>a</sup> a la 2<sup>a</sup> muestra, debido a un aumento máximo de otras sustancias, aumento de la 2<sup>a</sup> a la 3<sup>a</sup> muestra, en la preparación a la iniciación de la floración, y luego un lento descenso hasta el final de la experiencia. Las plantas Pb I y Pb II siguen el mismo curso desplazado una muestra como consecuencia

de su estado vegetativo más adelantado. En cuanto al nivel del porcentaje, en el estado prefloral es tanto mayor cuanto mayor es la dosis de plomo aplicada, pero a partir del momento de la floración cambia, las plantas control mantienen siempre un porcentaje de ARN inferior al de las plantas Pb I, pero estas mantienen sus porcentajes superiores a las Pb II.

Los contenidos de ARN en tallos ( tablas 10 y 11 y gráficas 25 y 26 ), en las plantas control, Pb I y Pb II son ascendentes hasta la 4ª muestra para descender en la 5ª. En cuanto a los porcentajes son constantemente descendentes y parecen seguir el orden Pb I > Pb II > C.

En cuanto al curso seguido por los valores absolutos del ARN en las raíces ( tablas 10 y 11 y gráficas 27 y 28 ) de las plantas control y Pb I es continuamente ascendente. Las Pb II tienen un curso similar al ADN, ascendente hasta la 4ª muestra donde exhibe valores muy altos para descender luego en la 5ª muestra.

Si consideramos el estado prefloral de las plantas ( 1ª y 2ª muestra ), observamos que los valores de ARN en raíces son superiores en las plantas tratadas con plomo que en las control. Desde el momento de la floración existen fluctuaciones difíciles de interpretar.

Los porcentajes de ARN por peso seco de raíz aumentan de la 1ª a la 2ª muestra en todos los casos, para luego descender a lo largo de la experiencia. Los valores obtenidos en los tres grupos de plantas son muy similares

El curso seguido por el ARN en las inflorescencias ( tablas 10 y 11

y gráficas 29 y 30 ) es siempre ascendente, por el contrario los porcentajes en peso seco siguen un curso descendente. Ambos valores se mantienen siempre más altos en las plantas tratadas con plomo.

Tabla nº 8

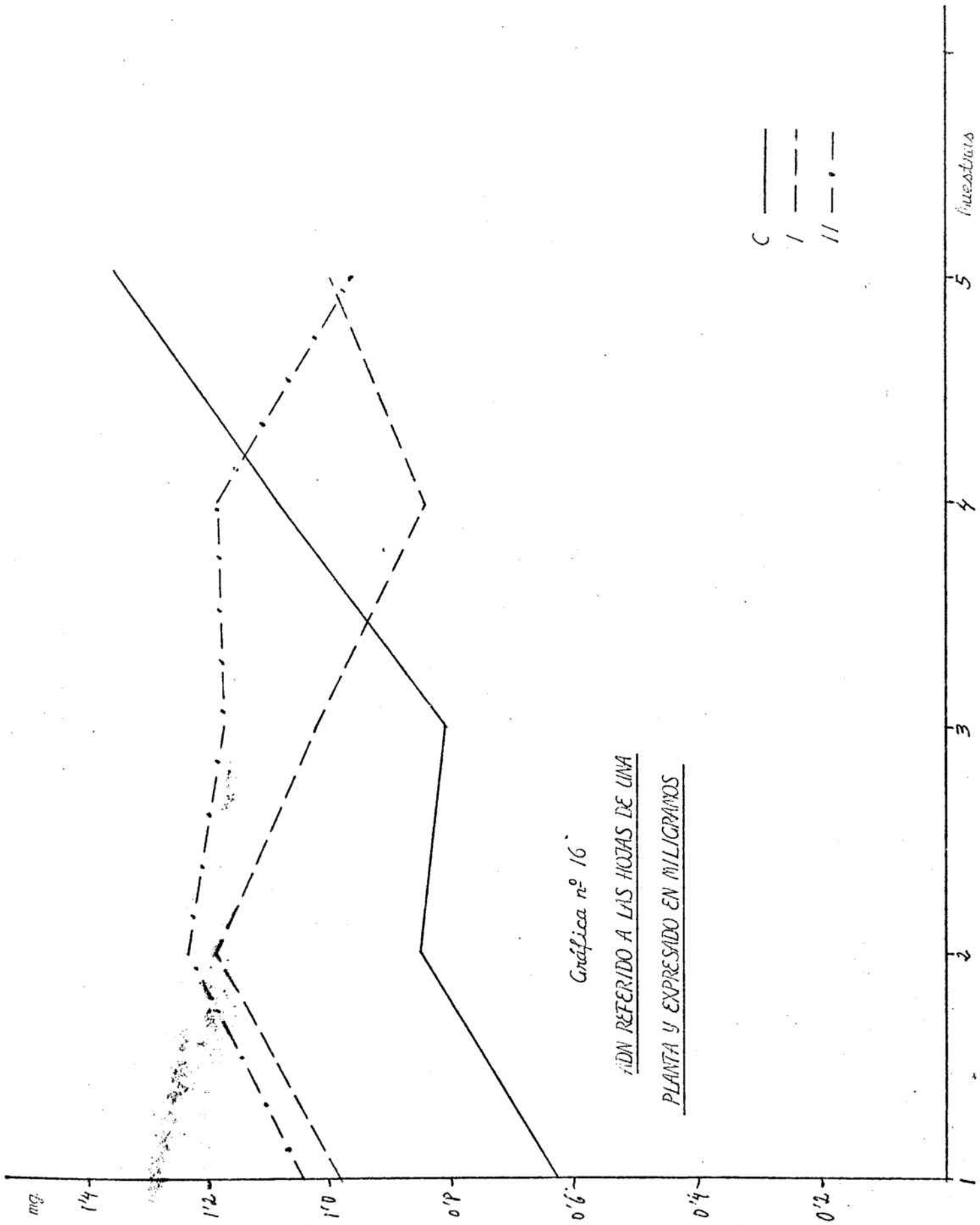
ADN EXPRESADO EN MILLIGRAMOS POR PARTE DE PLANTA

Muestras	C					I					II				
	H	T	R	I		H	T	R	I		H	T	R	I	
1	0,63	0,30	0,38	-		0,98	0,55	0,42	-		1,07	0,44	0,50	-	
2	0,85	0,44	0,58	-		1,20	0,63	0,64	-		1,24	0,60	0,65	-	
3	0,81	0,82	1,24	-		1,03	0,77	1,22	0,42		1,18	0,89	1,15	2,34	
4	1,09	1,54	1,89	2,17		0,84	0,85	1,86	1,02		1,19	1,39	2,58	6,79	
5	1,35	1,08	2,64	3,57		0,99	0,85	2,61	3,01		0,97	1,80	1,92	4,45	

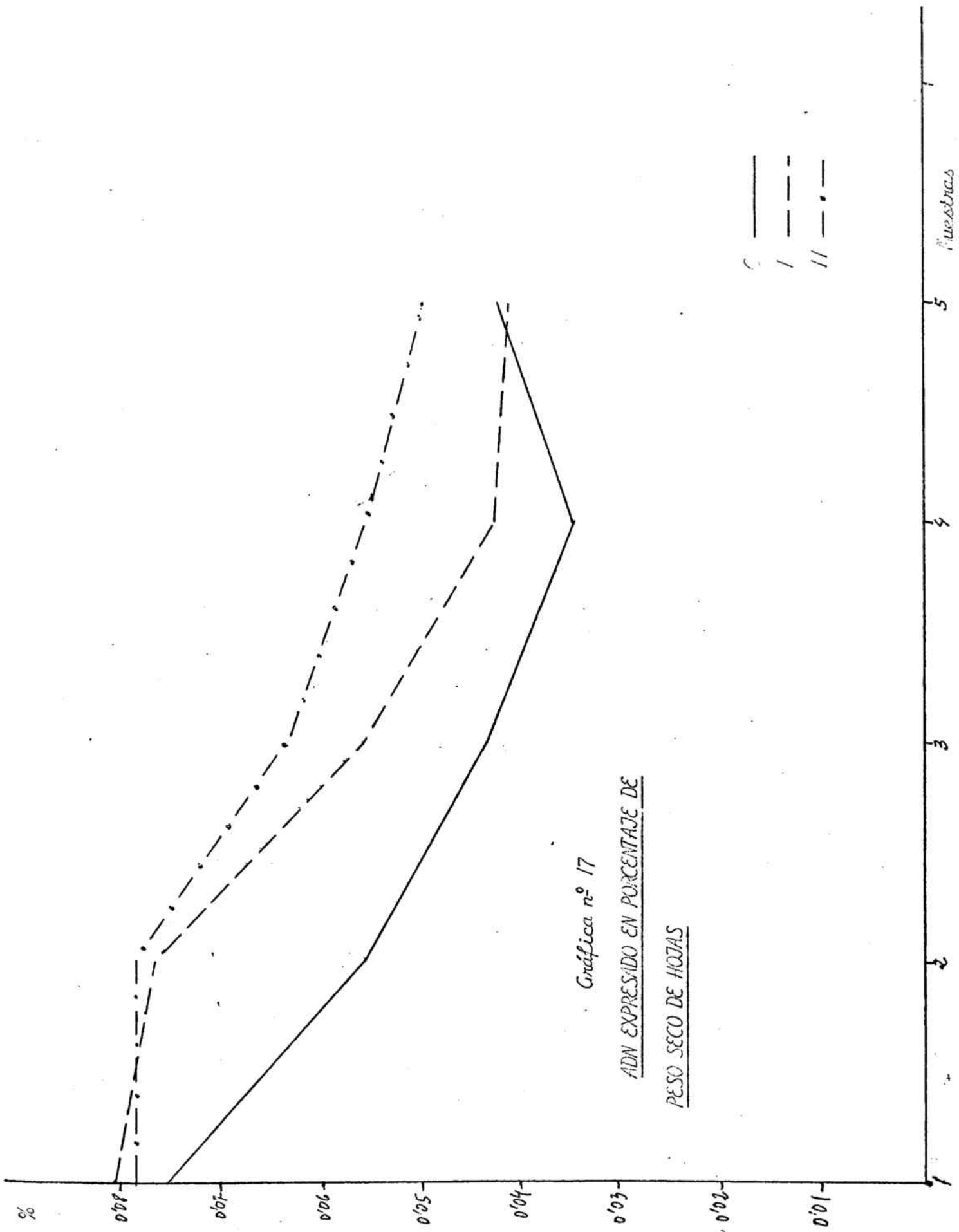
Tabla nº 9

ADN EXPRESADO EN PORCENTAJE DE PESO SECO

Muestras	C										I										II									
	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I		
1	0,076	0,102	0,33	-	0,081	0,12	0,35	-	0,079	0,11	0,33	-	0,081	0,12	0,35	-	0,079	0,11	0,33	-	0,079	0,11	0,33	-	0,079	0,11	0,33	-		
2	0,056	0,09	0,31	-	0,077	0,10	0,33	-	0,079	0,10	0,33	-	0,077	0,10	0,33	-	0,079	0,10	0,33	-	0,079	0,10	0,33	-	0,079	0,10	0,33	-		
3	0,044	0,09	0,30	-	0,056	0,11	0,31	0,37	0,064	0,10	0,30	0,38	0,056	0,11	0,31	0,37	0,064	0,10	0,30	0,38	0,064	0,10	0,30	0,38	0,064	0,10	0,30	0,38		
4	0,035	0,088	0,26	0,36	0,043	0,099	0,31	0,59	0,056	0,10	0,28	0,47	0,043	0,099	0,31	0,59	0,056	0,10	0,28	0,47	0,056	0,10	0,28	0,47	0,056	0,10	0,28	0,47		
5	0,042	0,074	0,18	0,47	0,042	0,092	0,30	0,21	0,050	0,09	0,24	0,20	0,042	0,092	0,30	0,21	0,050	0,09	0,24	0,20	0,050	0,09	0,24	0,20	0,050	0,09	0,24	0,20		







Gráfica nº 17

ADN EXPRESADO EN PORCENTAJE DE

PESO SECO DE HOJAS

I ———  
 II - - -  
 III - · -

mg.

Gráfica n.º 18

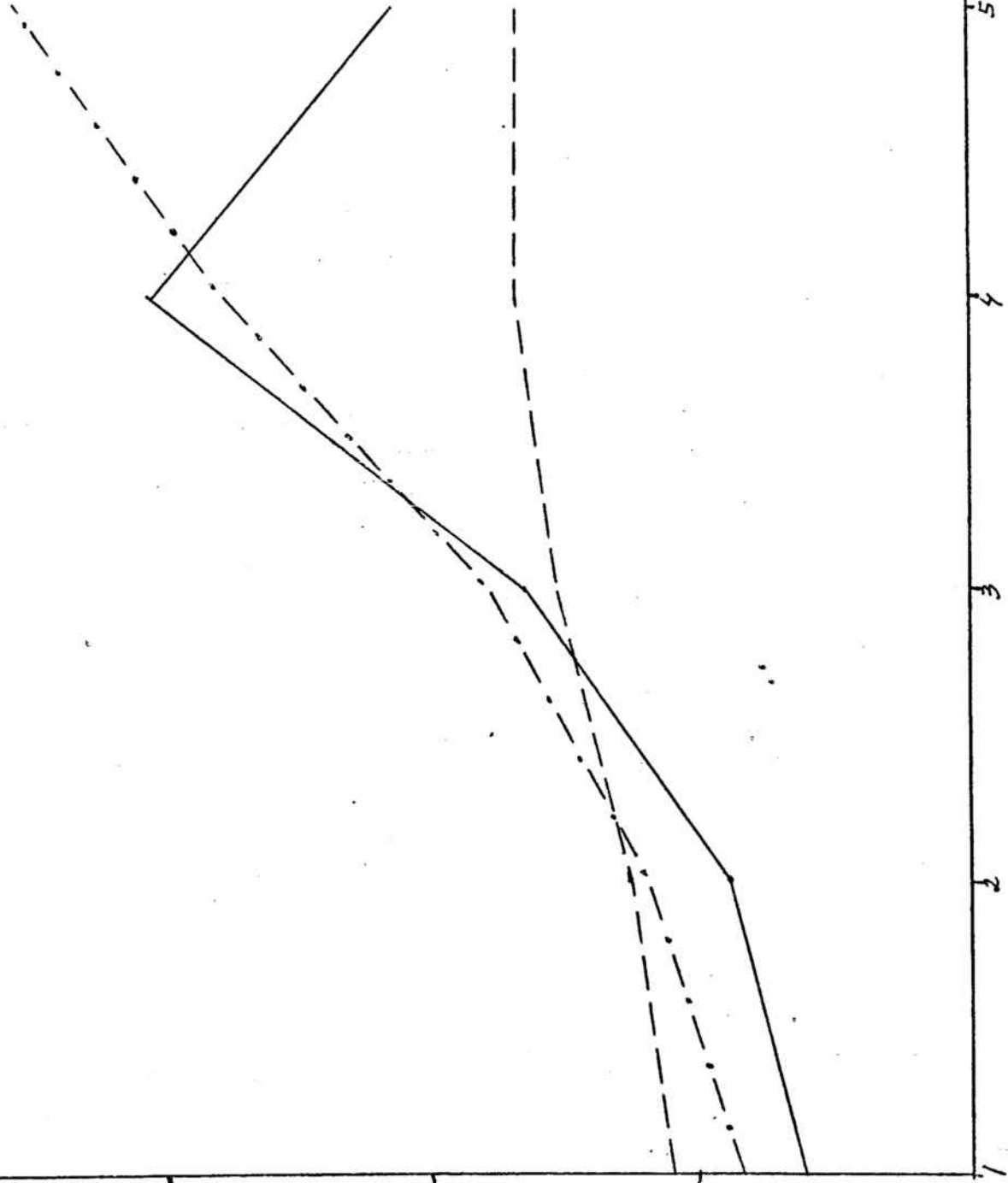
ADN REFERIDO AL TALLO DE UNA  
PLANTA Y EXPRESADO EN MILLIGRAMOS

2'0

1'5

1'0

0'5



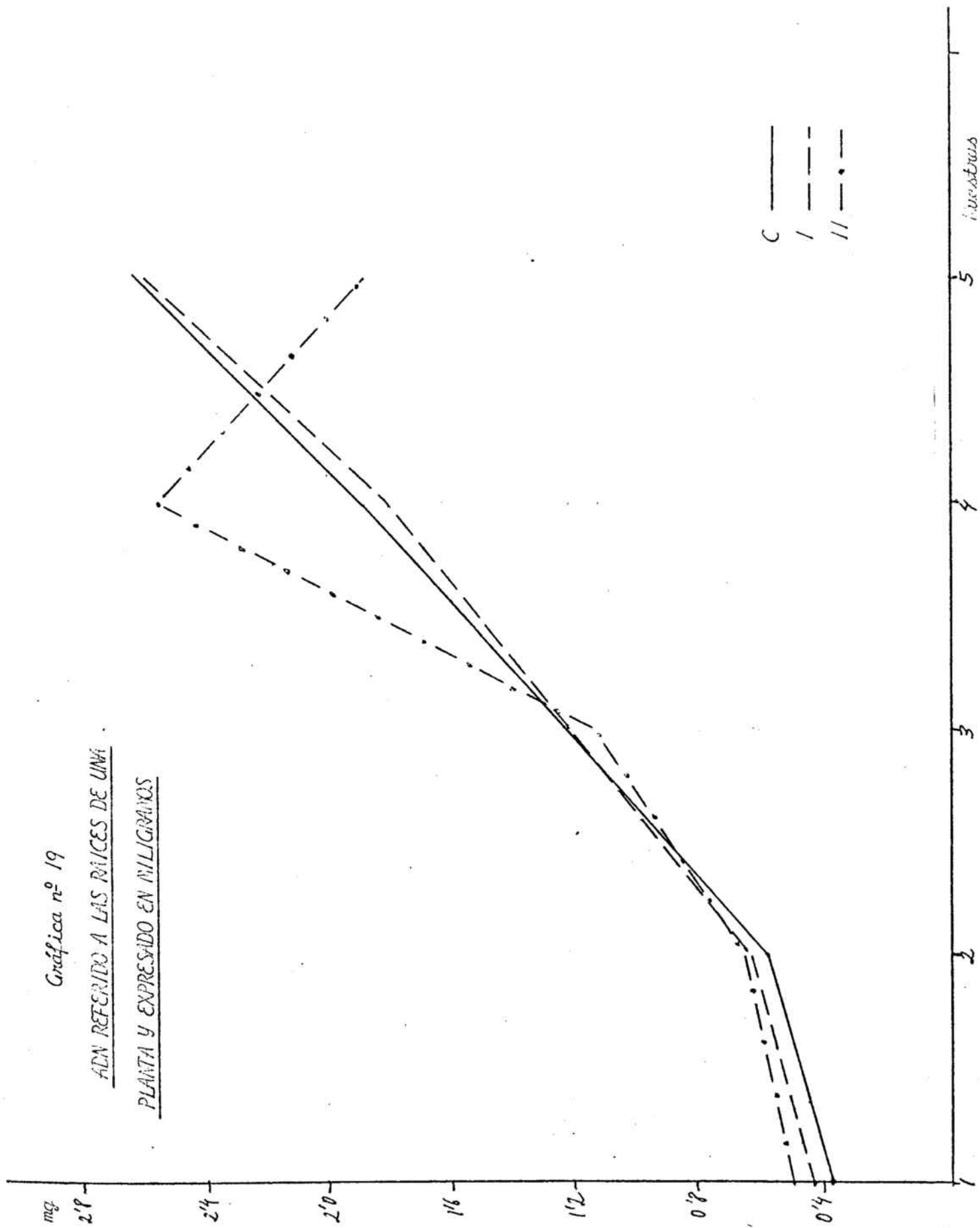
C  
/  
//

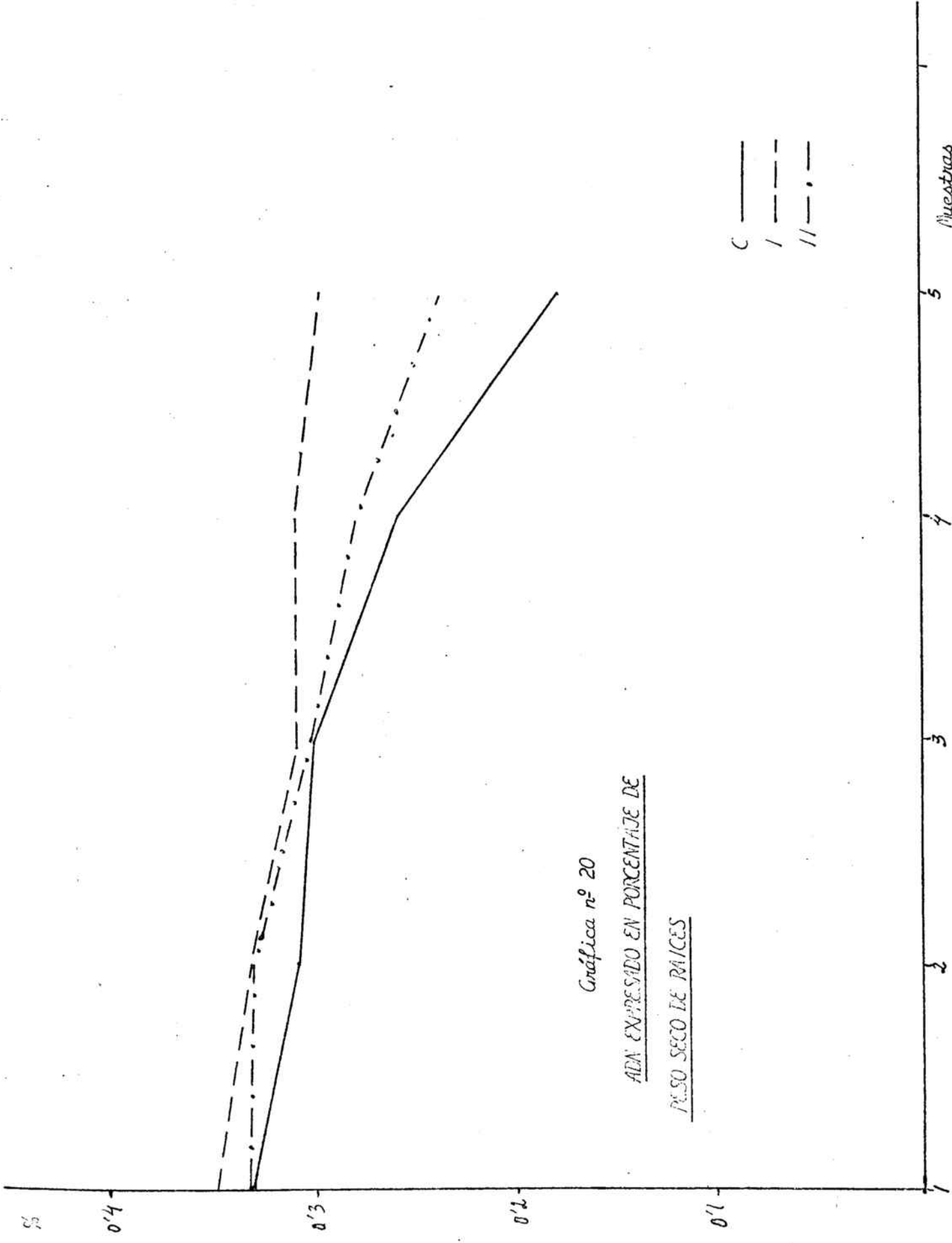
Fiestras

Gráfica nº 19

ADN REFERIDO A LAS RAÍCES DE UVA

PLANTA Y EXPRESADO EN MILLIGRAMOS





Gráfica nº 20

ADA EXPRESADO EN PORCENTAJE DE  
PESO SECO DE RAICES

C ———  
I - - - -  
II - · - -

Muestras

Gráfica nº 21

ALIN REFERIDO A LA INFLORESCENCIA  
DE UNA PLANTA Y EXPRESADO EN MILIGRAMOS

C ———  
I - - - -  
II - · - -

mg

8

7

6

5

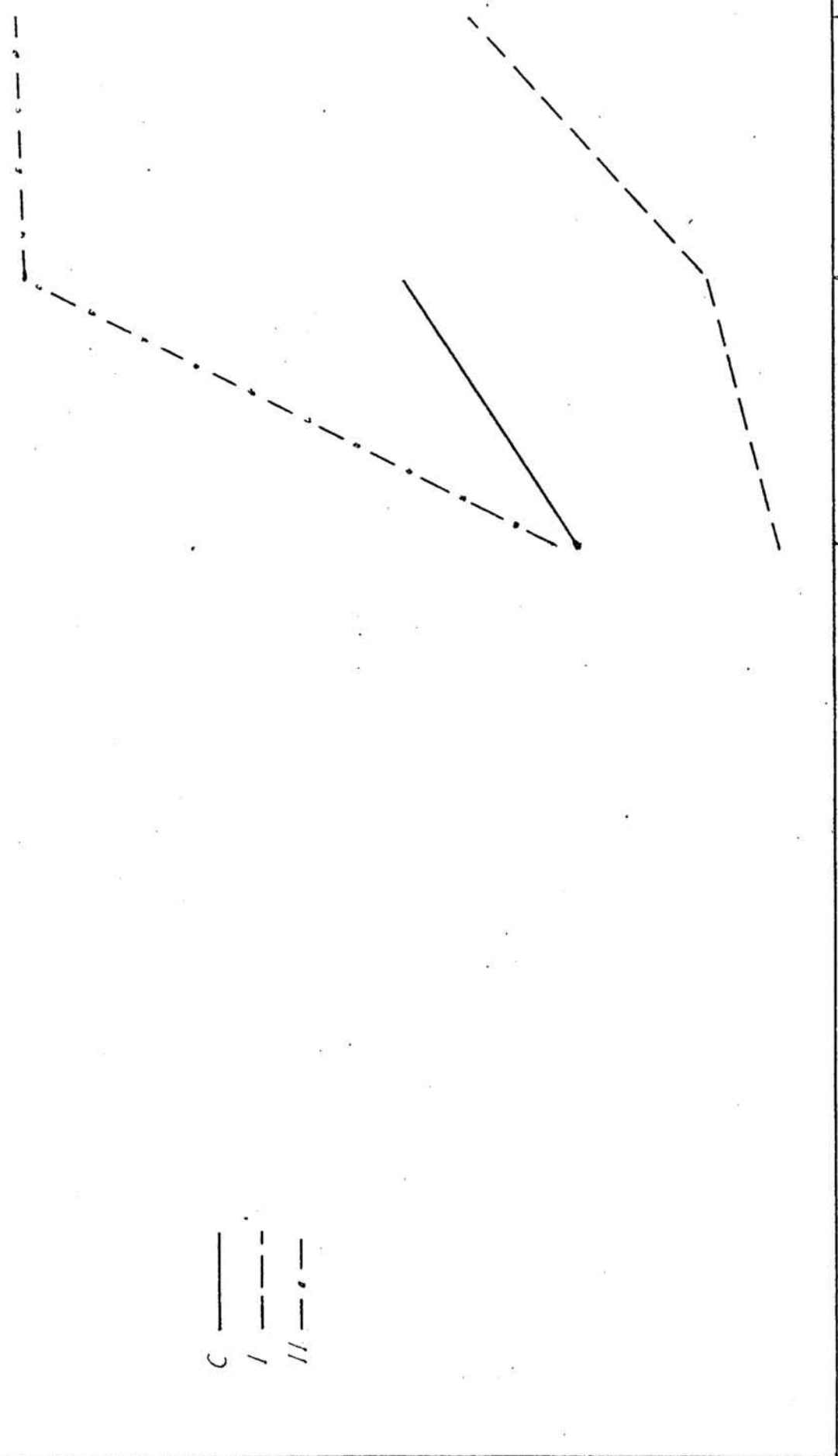
4

3

2

1

Muestras



Gráfica n° 22

ADN EXPRESADO EN PORCENTAJE DE

PESO SECO DE INFLORESCENCIA

C ———  
I - - - -  
II - · - · -

%

0'8

0'7

0'6

0'5

0'4

0'3

0'2

0'1

Muestras

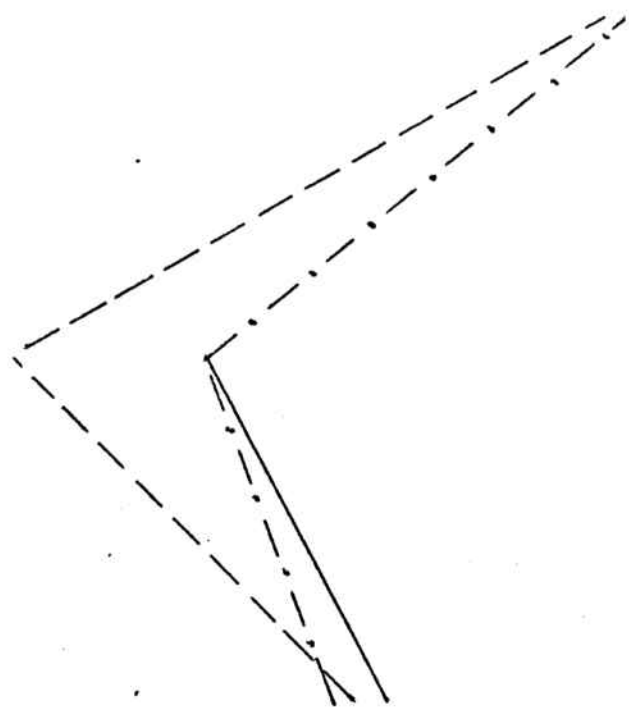


Tabla nº 10

ARN EXPRESADO EN MİLLİGRAMOS POR PARTE DE PLANTA

Muestras	C					I					II				
	H	T	R	I		H	T	R	I		H	T	R	I	
1	3,00	1,05	1,87	-	5,46	1,81	1,94	-	5,84	1,52	2,46	-			
2	5,18	1,84	3,05	-	7,48	2,71	3,14	-	7,69	2,35	3,18	-			
3	6,82	3,38	6,58	-	7,78	3,04	6,26	1,57	7,21	3,39	6,13	7,26			
4	9,10	5,62	11,20	7,79	7,26	3,11	9,30	2,22	7,02	5,03	14,38	16,61			
5	7,11	2,92	11,84	8,28	8,53	2,41	12,12	16,08	6,06	4,61	11,28	24,95			

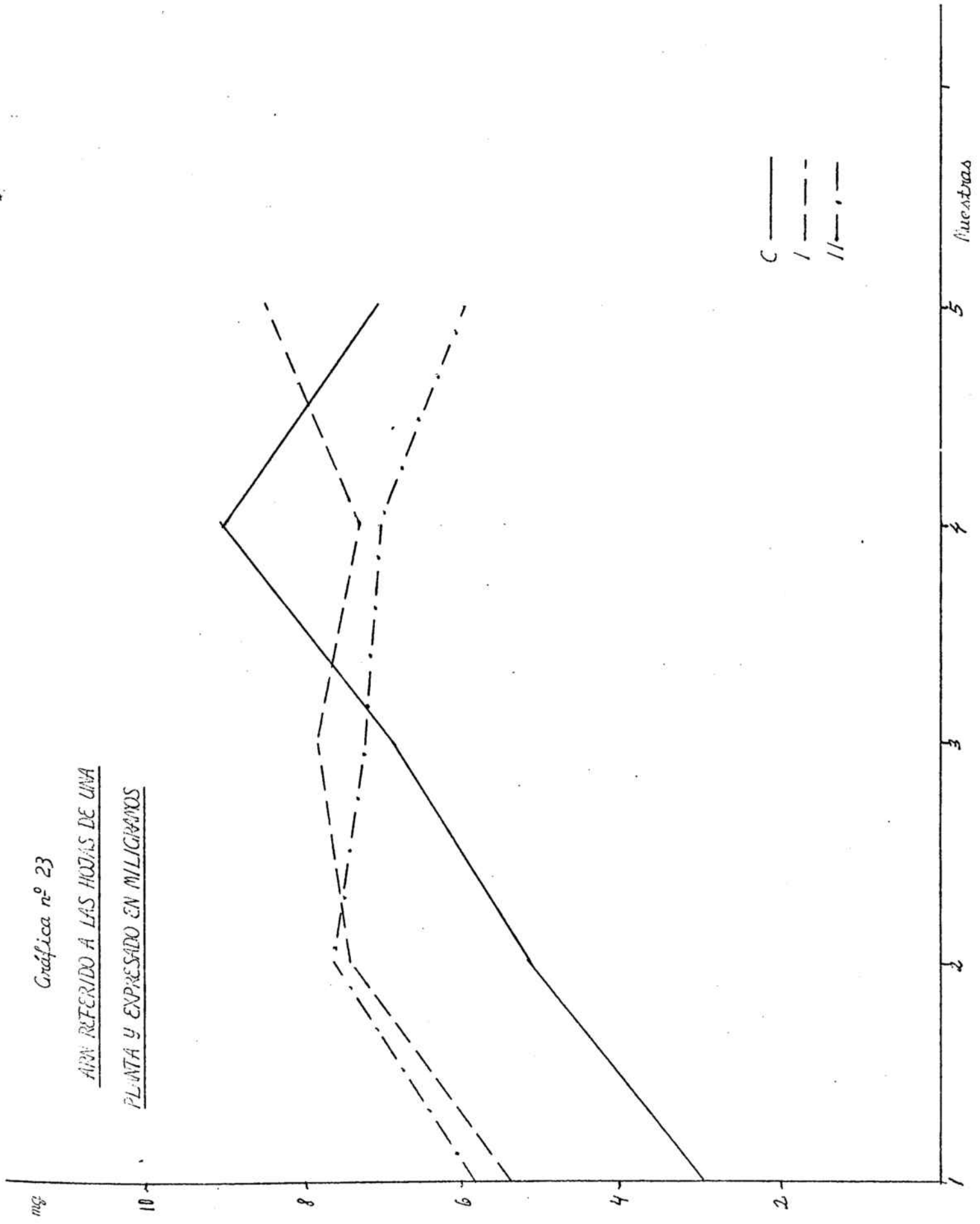




Gráfica nº 23

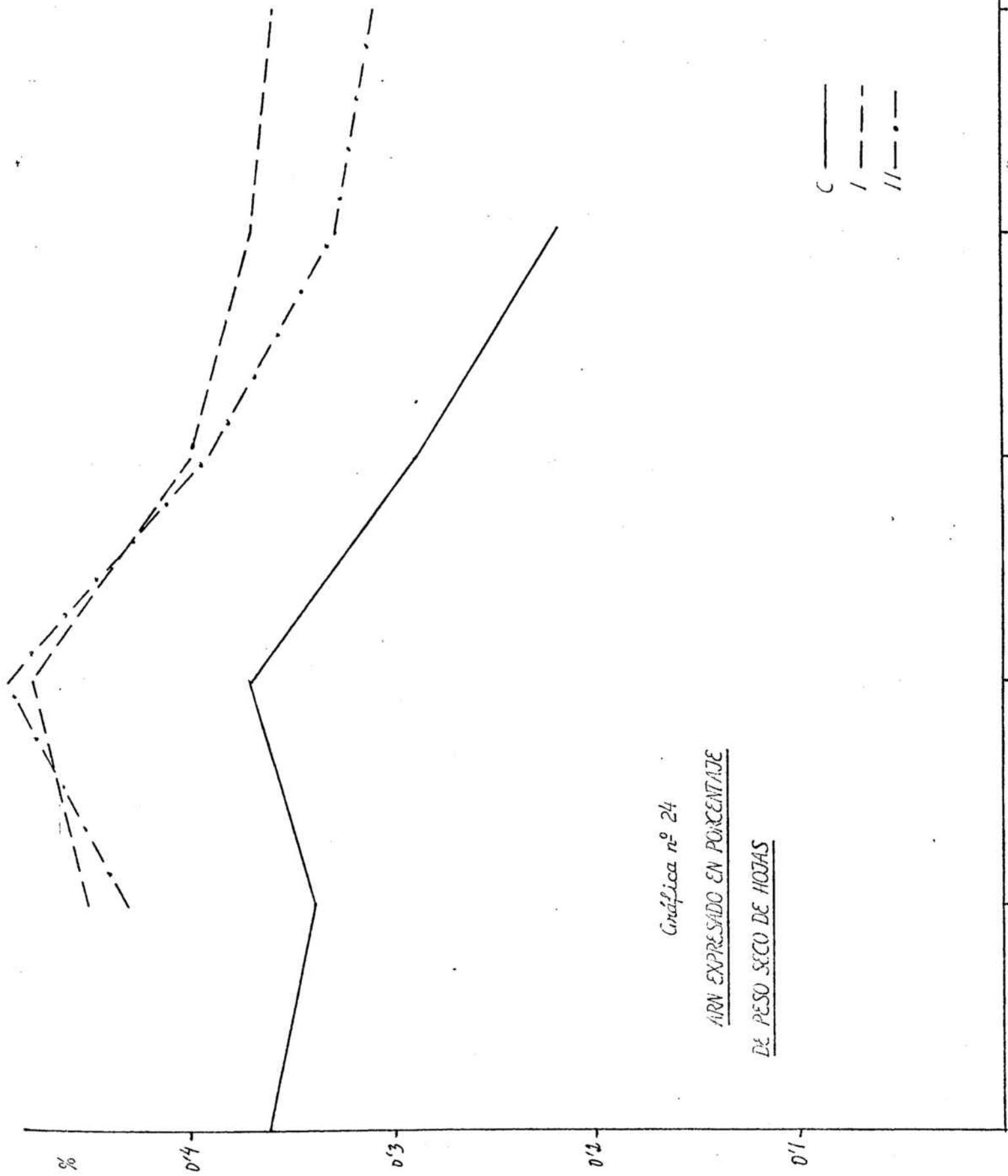
AIRN REFERIDO A LAS HOJAS DE UNA

PLANTA Y EXPRESADO EN MILIGRAMOS



C —  
/ - -  
// - . -

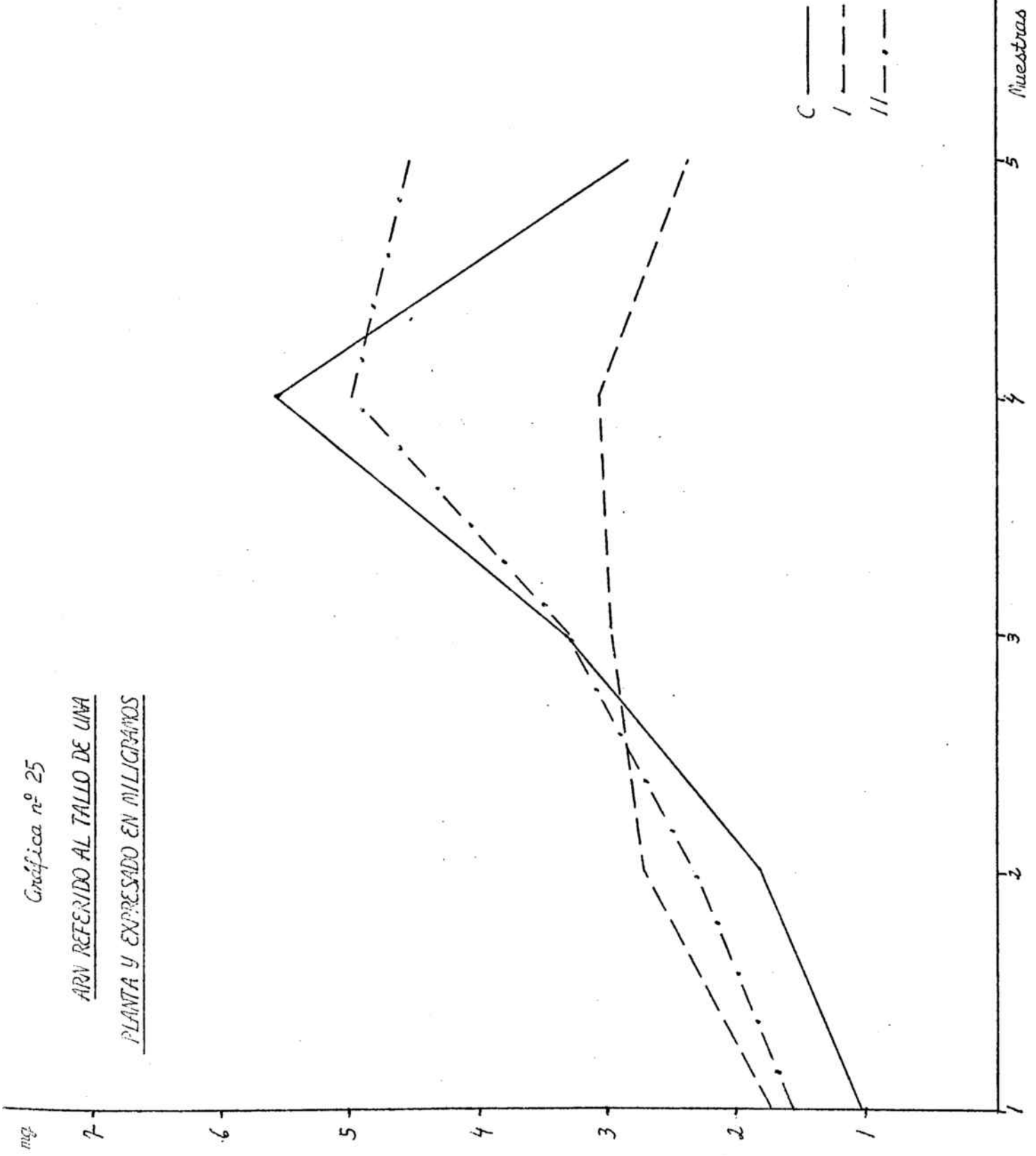
Muestras

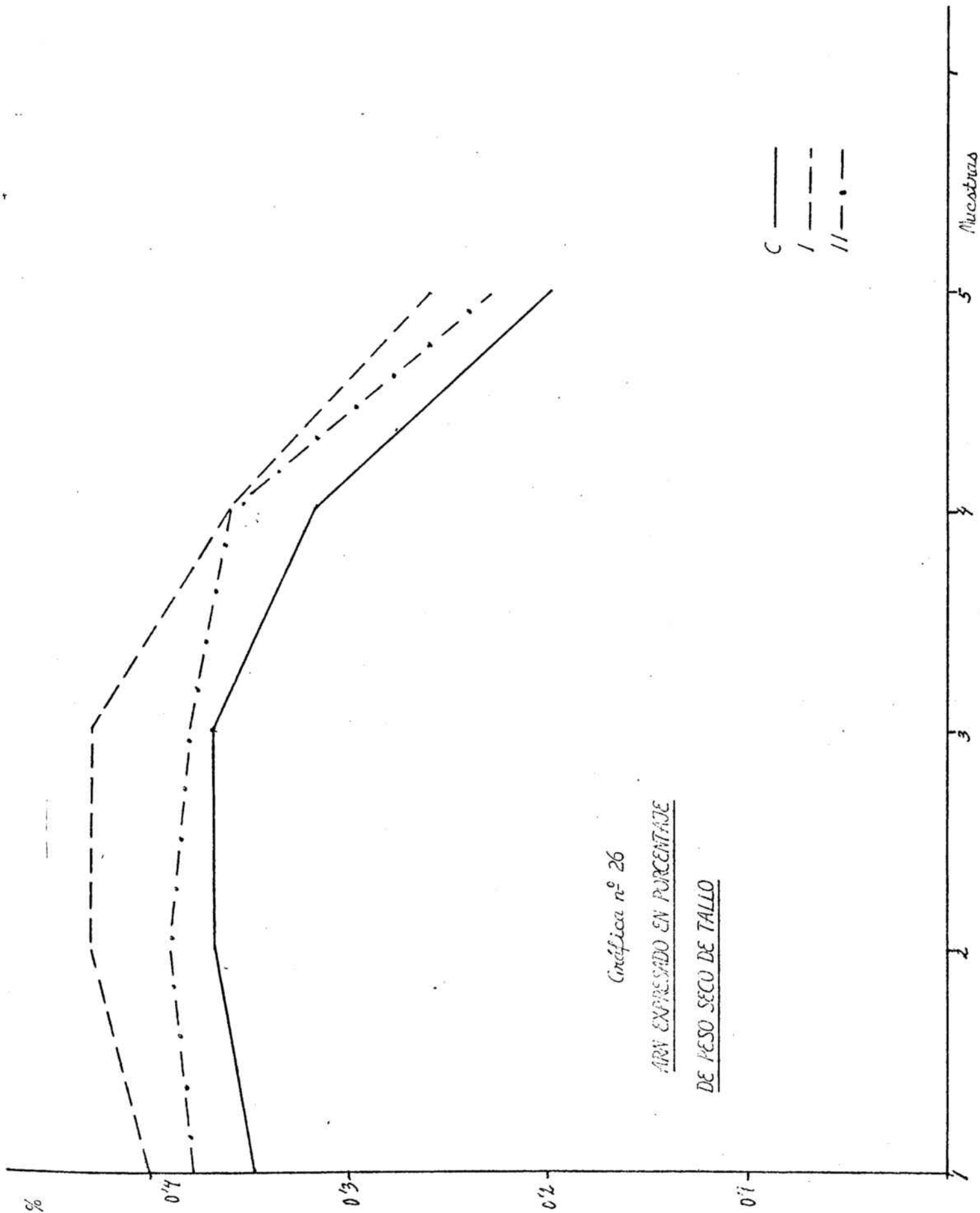


Gráfica n° 25

ARN REFERIDO AL TALLO DE UNA

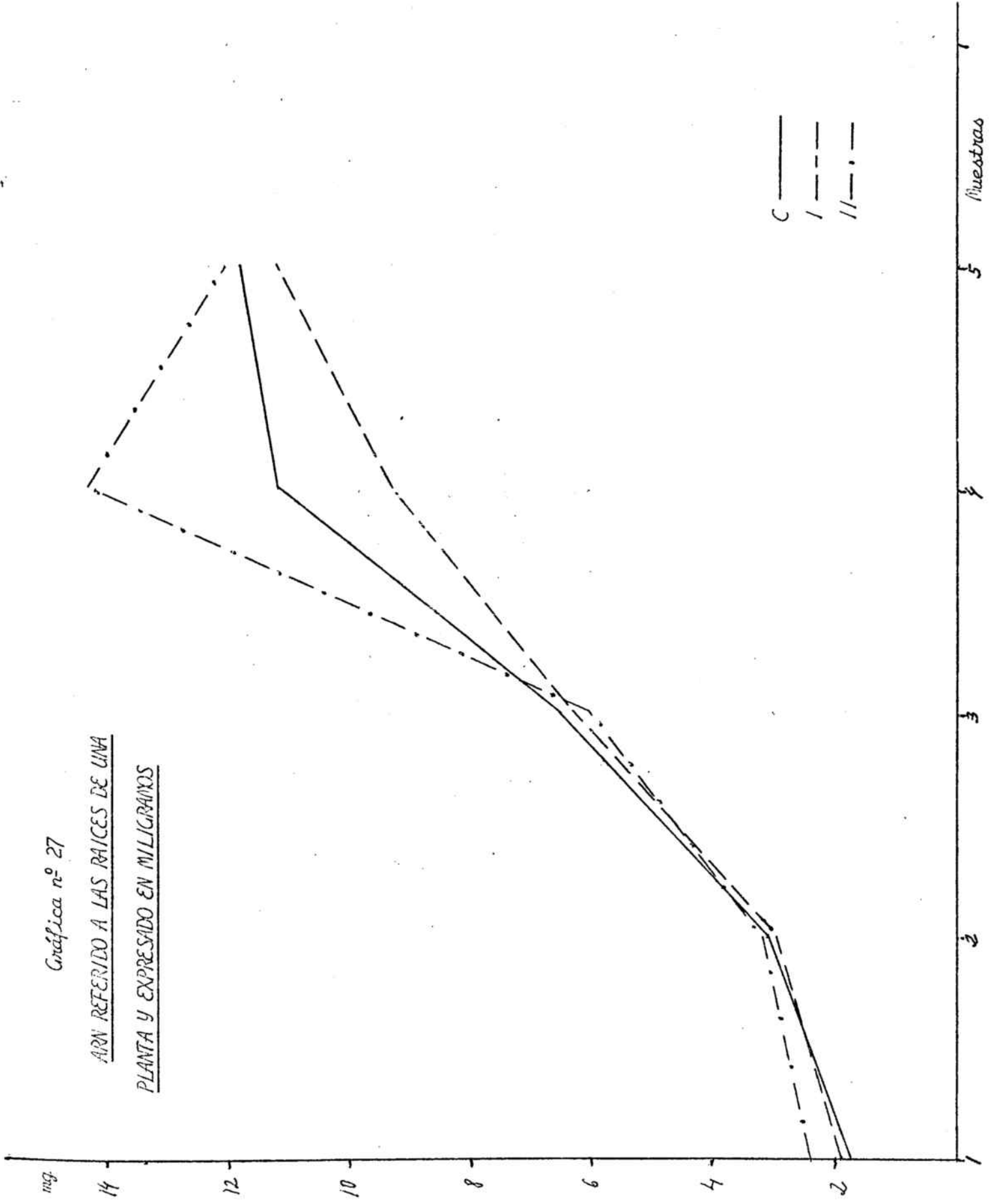
PLANTA Y EXPRESADO EN MILEGRIAMOS





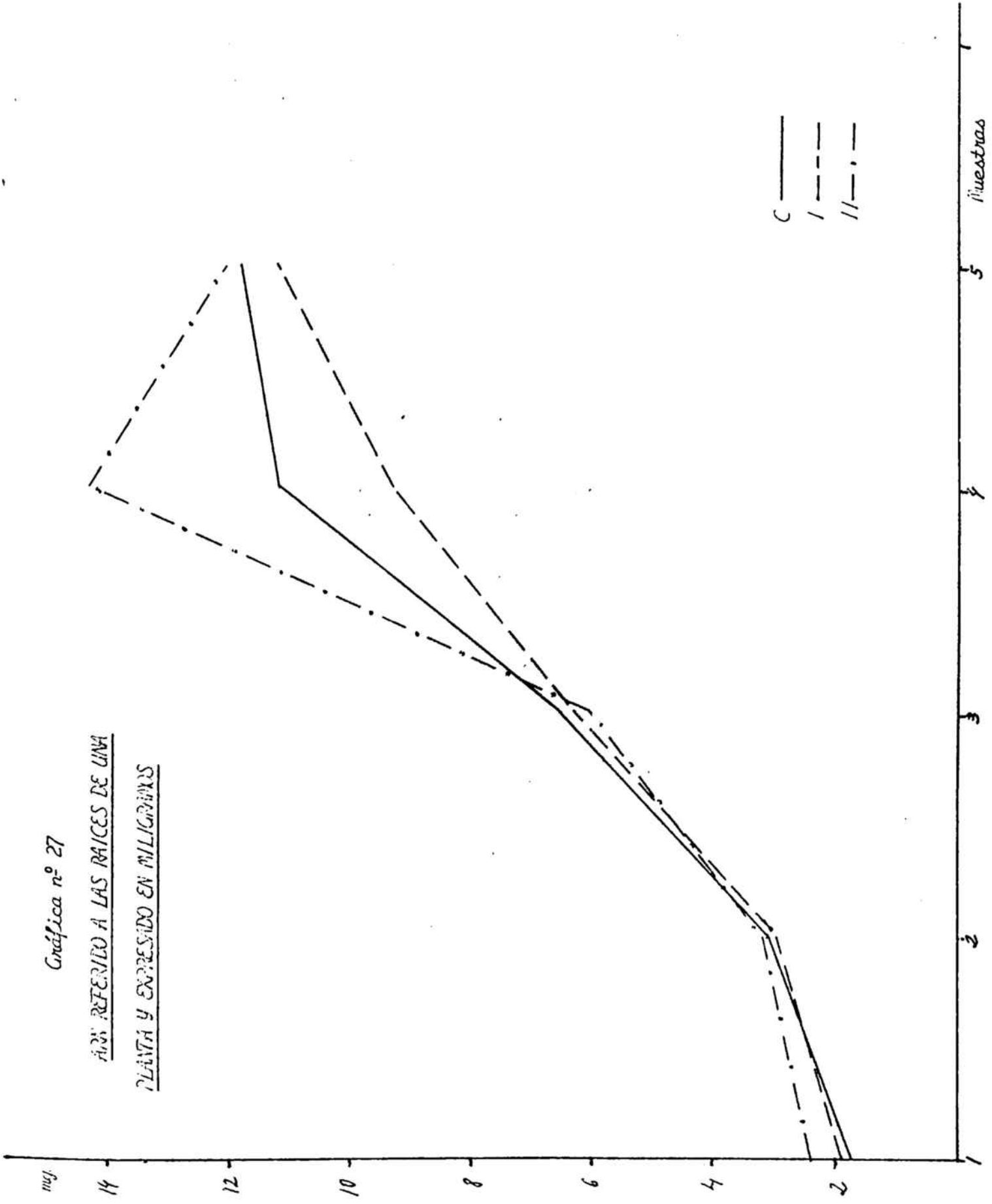
Gráfica n° 27

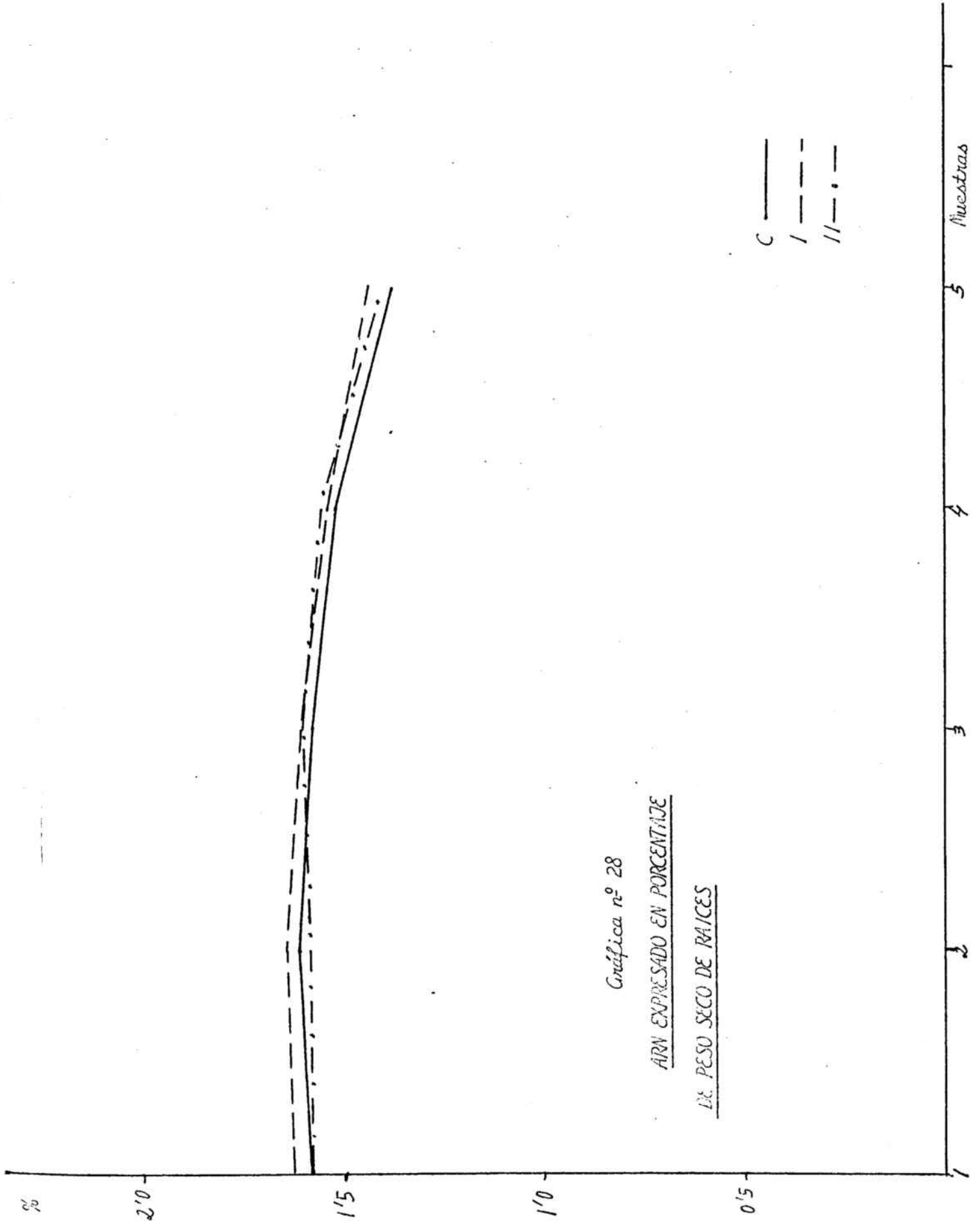
ARN REFERIDO A LAS RAICES DE UNA  
PLANTA Y EXPRESADO EN MILIGRAMOS



Gráfica n° 27

AGUA REFERIDO A LAS RAICES DE UNA  
PLANTA Y EXPRESADO EN MILIGRAMOS





Gráfica nº 28

ARV EXPRESADO EN PORCENTAJE  
DE PESO SECO DE RAICES

C ———  
I - - - -  
II - · - -

muestras

Gráfica nº 29

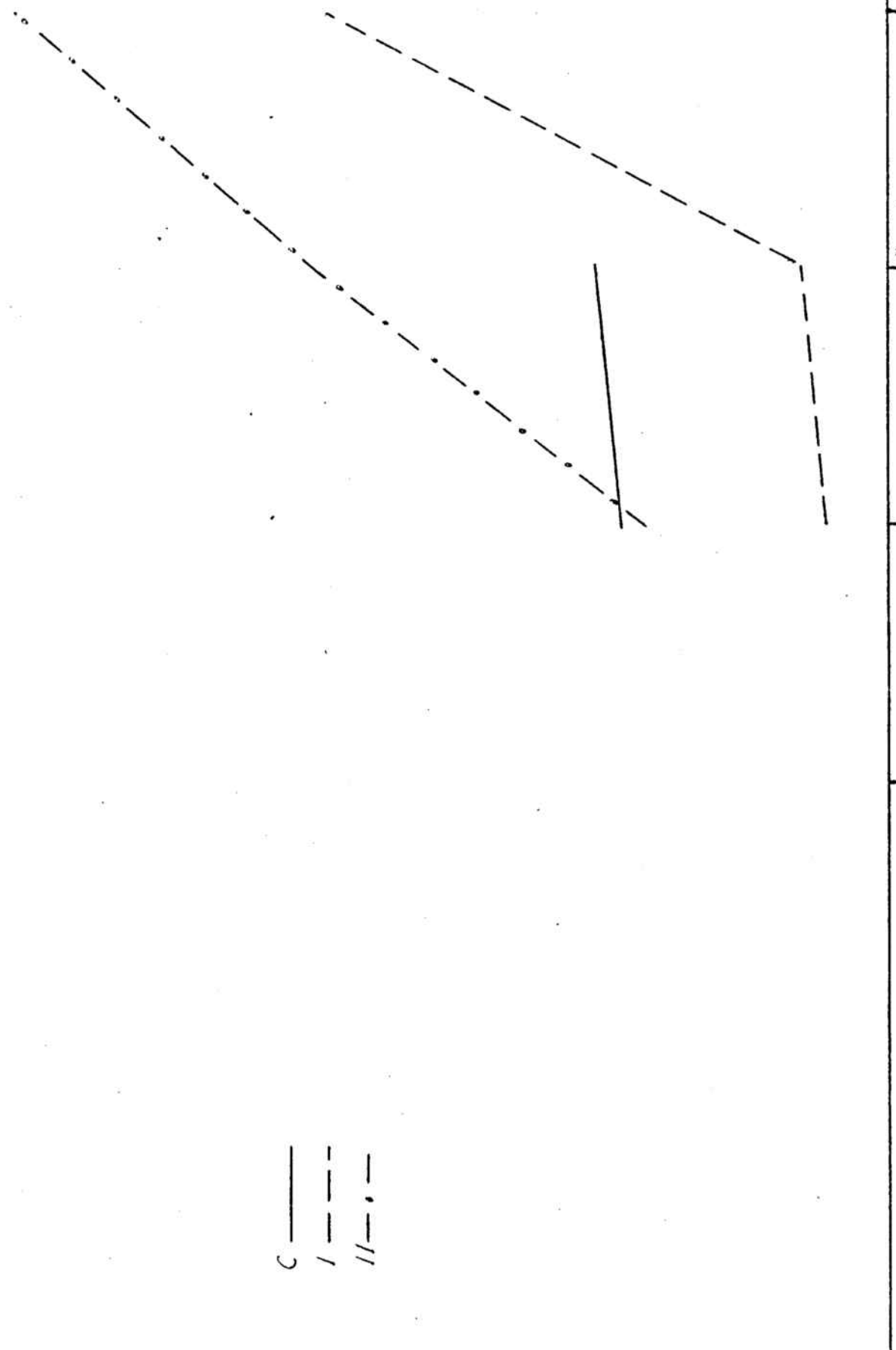
ARN REFERIDO A LA INFLORESCENCIA

DE UNA PLANTA Y EXPRESADO EN MILEGRAMOS

C ———  
/ - - -  
// - • -

mg 28 24 20 16 12 8 4

Muestras





Gráfica nº 30

AIRN EXPRESADO EN PORCENTAJE DE

PESO SECO DE INFLORESCENCIA

C ———  
I - - - -  
II - · - · -

%

14

12

10

08

06

04

02



Muestras

### Proteínas

El contenido de proteínas en hojas ( tablas 12 y 13 y gráficas 31, 32 y 33 ) control, Pb I y Pb II aumenta continuamente hasta la 4ª muestra para descender en la 5ª. Si comparamos los niveles de proteínas de las plantas control y las tratadas por Pb I y Pb II observamos que hasta la 3ª muestra ( floración ) son superiores los de las plantas tratadas siguiendo el orden Pb I > Pb II > C. En la 4ª muestra aumenta el nivel en las plantas control haciendo que sea superior al de las tratadas. En la 5ª muestra todos los niveles descienden. Si seguimos el criterio que apuntamos en el crecimiento, el contenido en proteínas de las plantas control se hace superior al de las plantas tratadas con plomo, pero el descenso que se observa en la senescencia es también muy superior en las plantas control, el plomo parece inhibir la degradación de las proteínas.

El curso seguido por los porcentajes en las plantas control y en las tratadas con plomo es continuamente descendente. Este hecho es normal y debido a que las plantas adultas contienen gran cantidad de sustancias inertes que aumentan extraordinariamente su peso.

El contenido de proteínas de los tallos ( tablas 12 y 13 y gráficas 34 y 35 ) en las plantas control, Pb I y Pb II es ascendente hasta la 4ª muestra y desciende en la 5ª. Los niveles de las plantas control se man-

tienen superiores a los de las plantas tratadas con plomo, y como en el caso de las hojas también en los tallos el descenso en el contenido de proteínas en el periodo de senescencia parece inhibido parcialmente por el plomo.

Los porcentajes de proteínas por peso seco de tallo siguen un curso continuamente descendente.

En las raíces las proteínas ( tablas 12 y 13 y gráficas 36 y 37 ) siguen el mismo comportamiento que en las hojas y tallos, pero los niveles son muy superiores en las plantas control. Este resultado se ve particularmente bien en los porcentajes de proteínas por peso seco de raíz que son considerablemente menores en las plantas tratadas con plomo. Podríamos concluir que este elemento irhibe fuertemente la síntesis proteica en las raíces, organo que por otra parte debe acumular este elemento contaminante.

En cuanto a la protzina de las inflorescencias ( tablas 12 y 13 y gráficas 38 y 39 ), siguen un curso continuamente ascendente. El proceso de maduración de las semillas, tiene una repercusión importante en el contenido y porcentaje de proteínas en las plantas tratadas con plomo.

Tabla nº 12

PROTEINAS EXPRESADAS EN MILIGRAMOS POR PARTE DE PLANTA

Muestras	C						I						II					
	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I		
1	182,0	15,7	14,9	-	265,2	25,6	15,4	-	218,7	22,0	16,4	-	218,7	22,0	16,4	-		
2	260,2	24,7	23,5	-	264,8	34,5	14,9	-	266,8	28,7	21,3	-	266,8	28,7	21,3	-		
3	284,6	50,6	50,5	-	320,0	34,3	26,7	26,1	296,5	41,2	27,2	105,2	296,5	41,2	27,2	105,2		
4	426,8	87,0	96,3	102,7	312,1	37,1	40,5	35,5	340,8	64,3	64,8	277,4	340,8	64,3	64,8	277,4		
5	287,5	13,5	29,6	117,1	375,0	19,4	35,3	348,5	313,0	24,4	36,6	534,7	313,0	24,4	36,6	534,7		

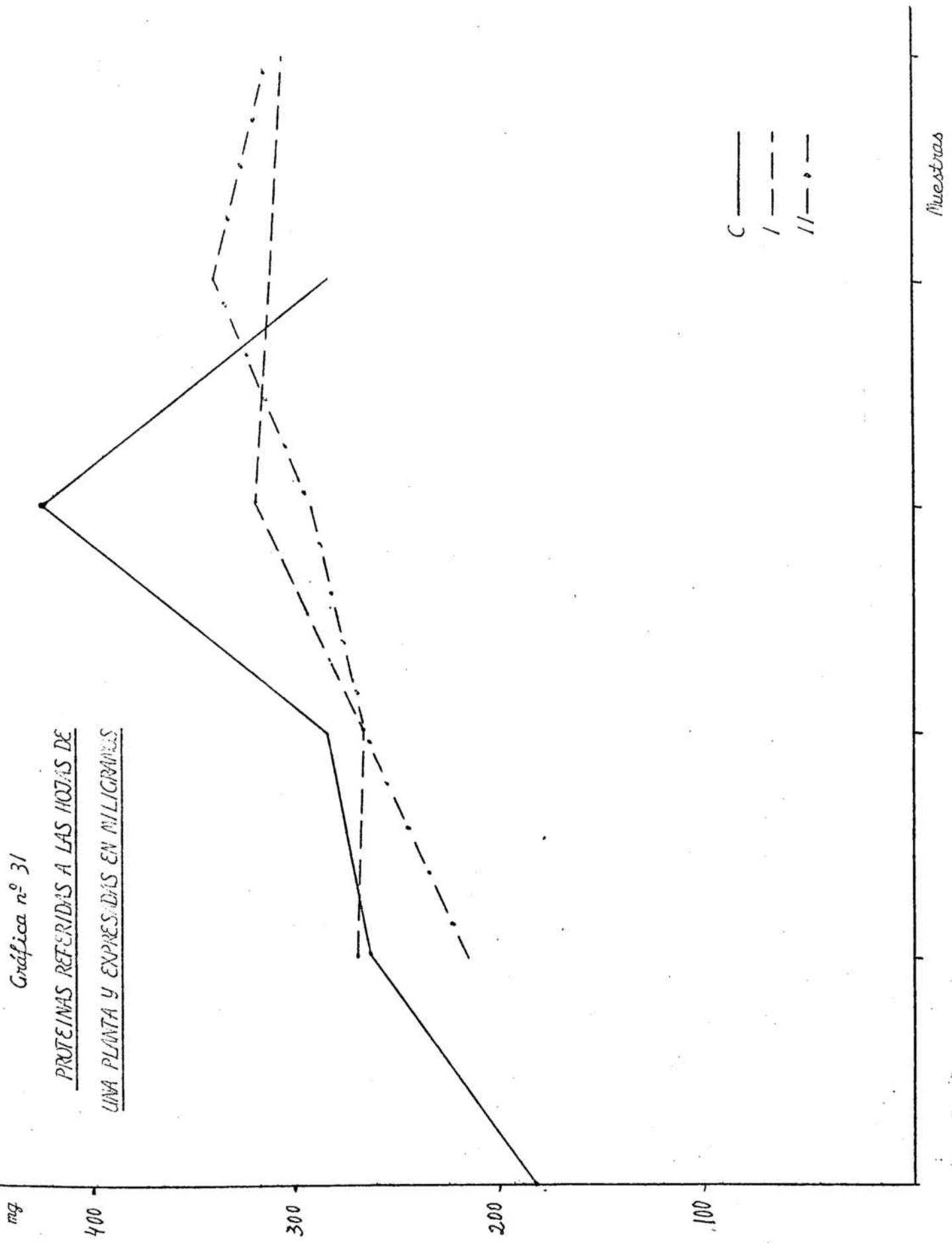
Tabla nº 13

PROTEINAS EXPRESADAS EN PORCENTAJE DE PESO SECO

Muestras	C					I					II					
	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I	H	T	R	I
1	21,80	5,25	12,63	-	22,00	5,49	12,85	-	16,08	5,50	10,69	-	16,08	5,50	10,69	-
2	16,93	4,97	12,42	-	16,98	5,47	7,71	-	16,99	4,75	10,77	-	16,99	4,75	10,77	-
3	15,43	5,53	12,21	-	17,27	4,85	6,78	22,52	16,03	4,62	7,07	17,08	16,03	4,62	7,07	17,08
4	13,58	4,95	15,24	17,01	15,90	4,29	6,76	20,45	16,00	4,60	7,03	19,20	16,00	4,60	7,03	19,20
5	8,88	1,90	8,98	15,41	15,82	2,10	4,20	12,41	16,00	1,07	4,58	24,00	16,00	1,07	4,58	24,00

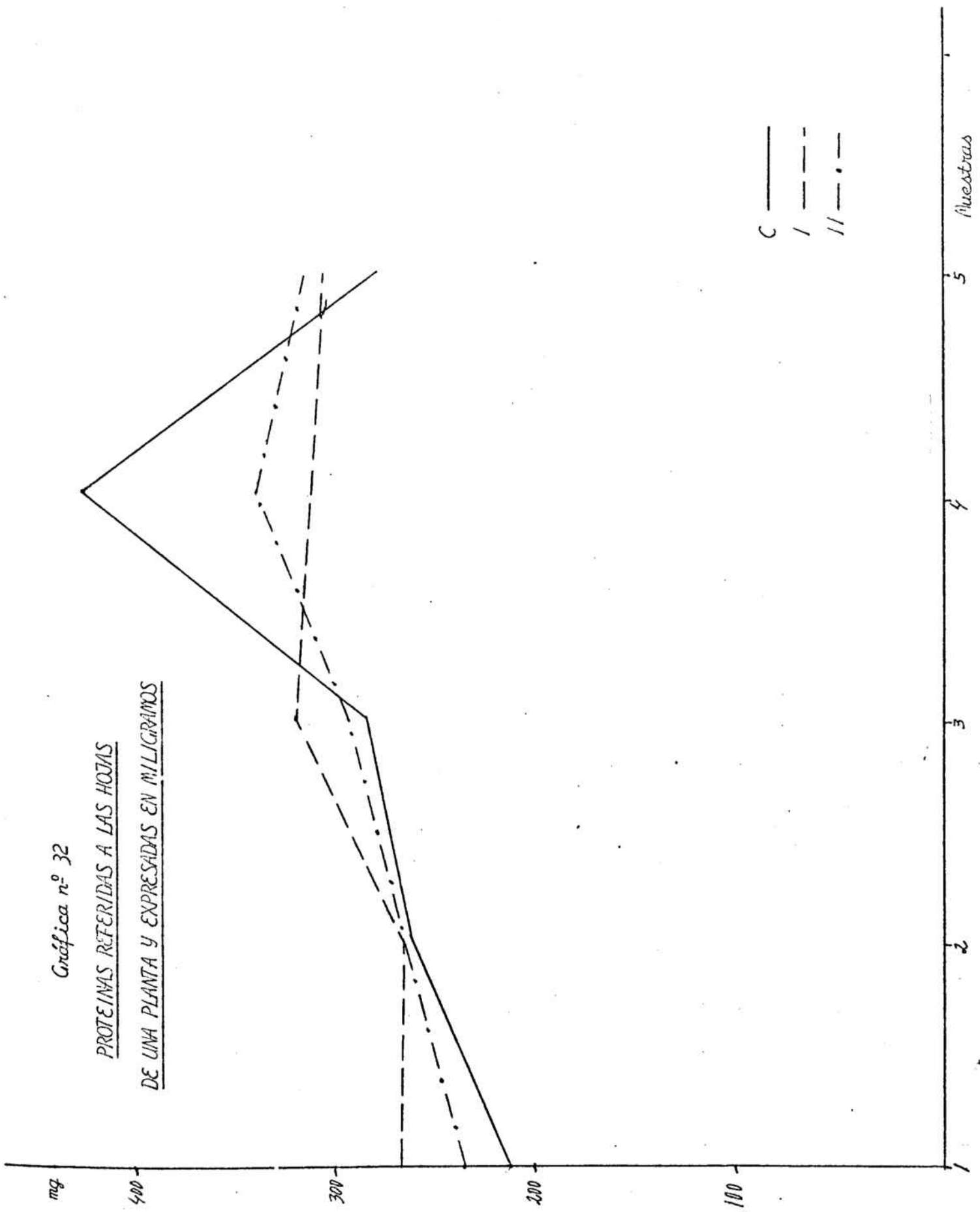
Gráfica n° 31

PROTEINAS REFERIDAS A LAS HOJAS DE  
UNA PLANTA Y EXPRESADAS EN MILEGRAMOS



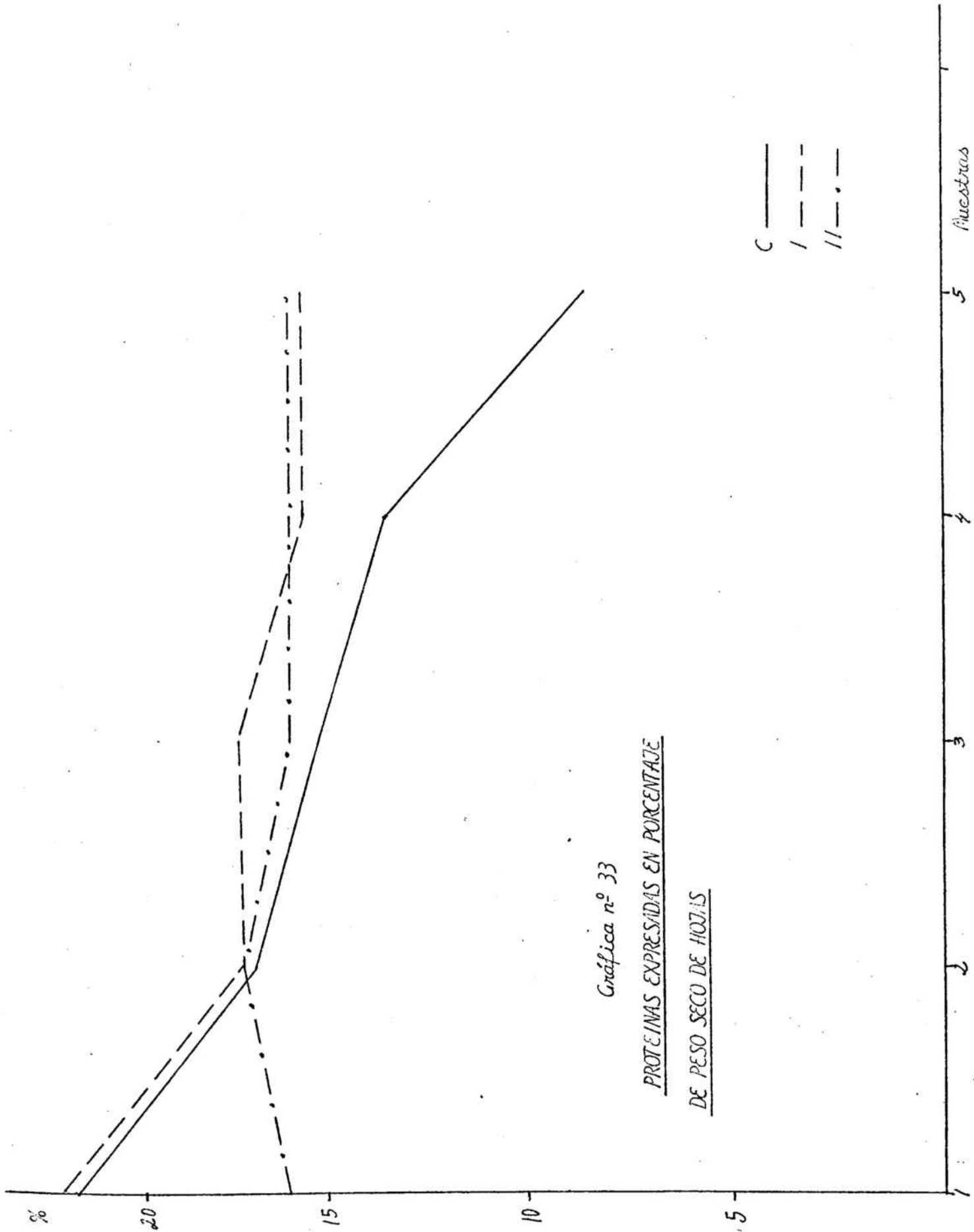
Gráfica n° 32

PROTEINAS REFERIDAS A LAS HOJAS  
DE UNA PLANTA Y EXPRESADAS EN MILEGRAMOS



C ———  
/ - - -  
// - · -

Muestras

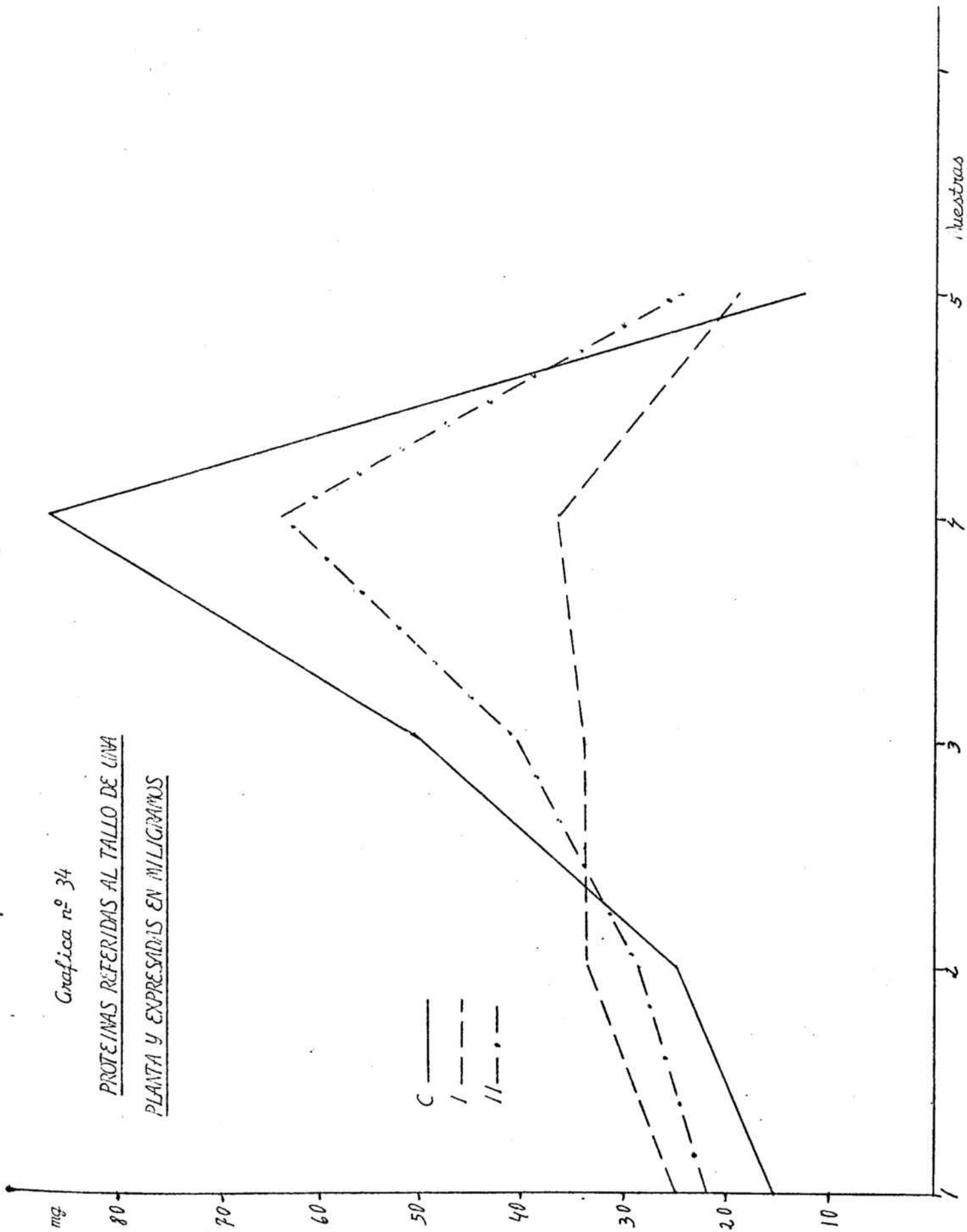


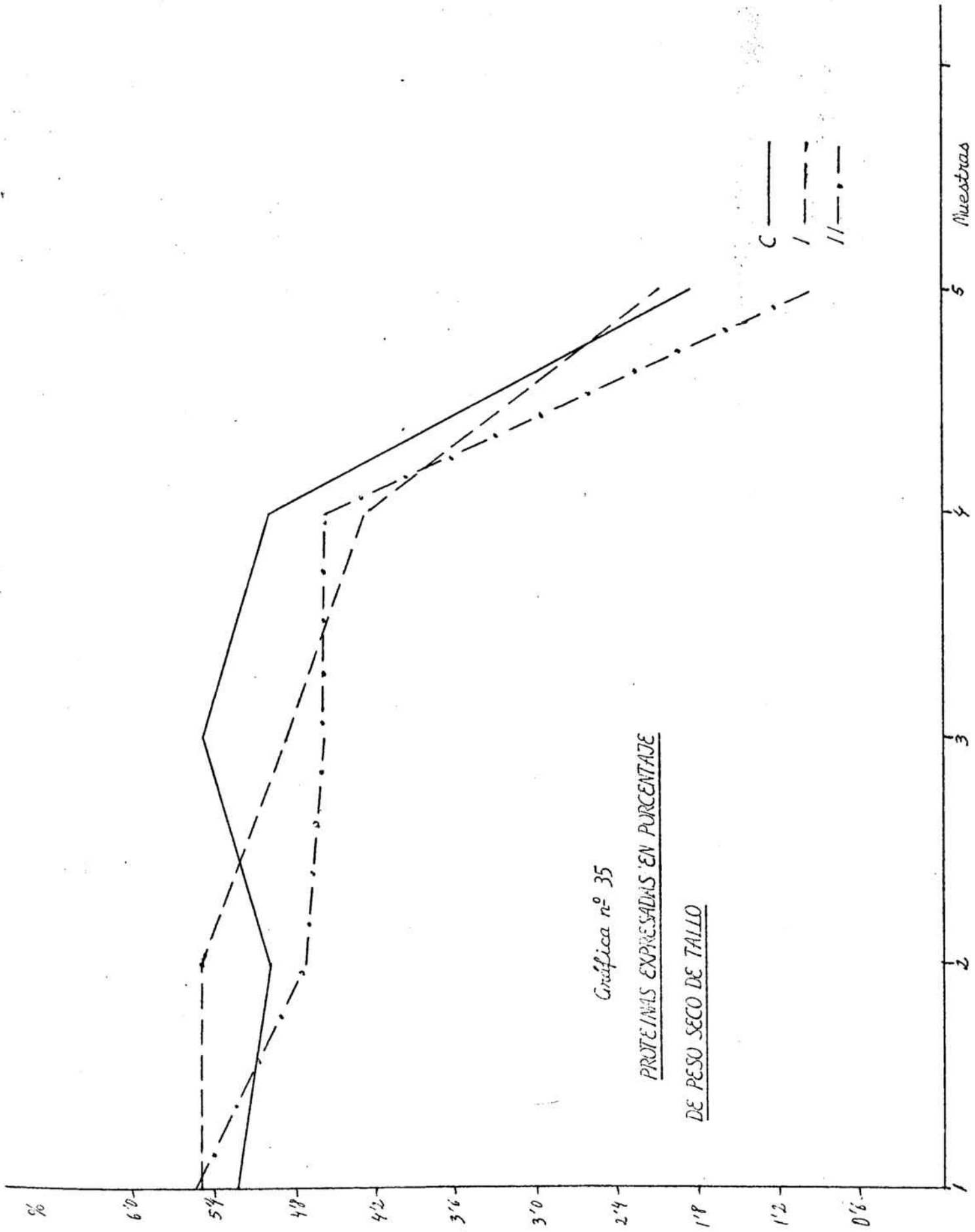


Grafica n° 34

PROTEINAS REFERIDAS AL TALLO DE LIMA

PLANTA Y EXPRESADAS EN MILIGRAMOS

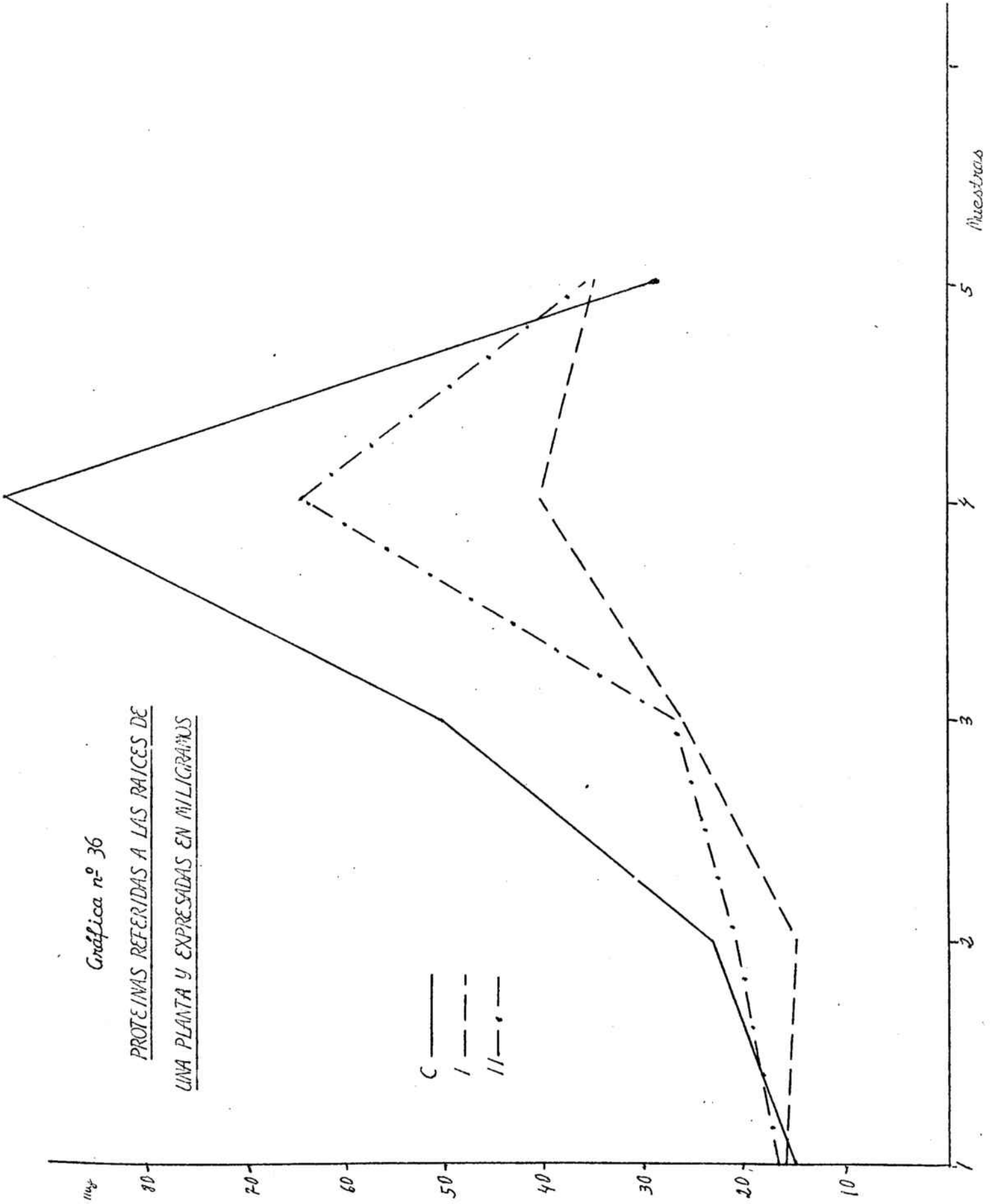


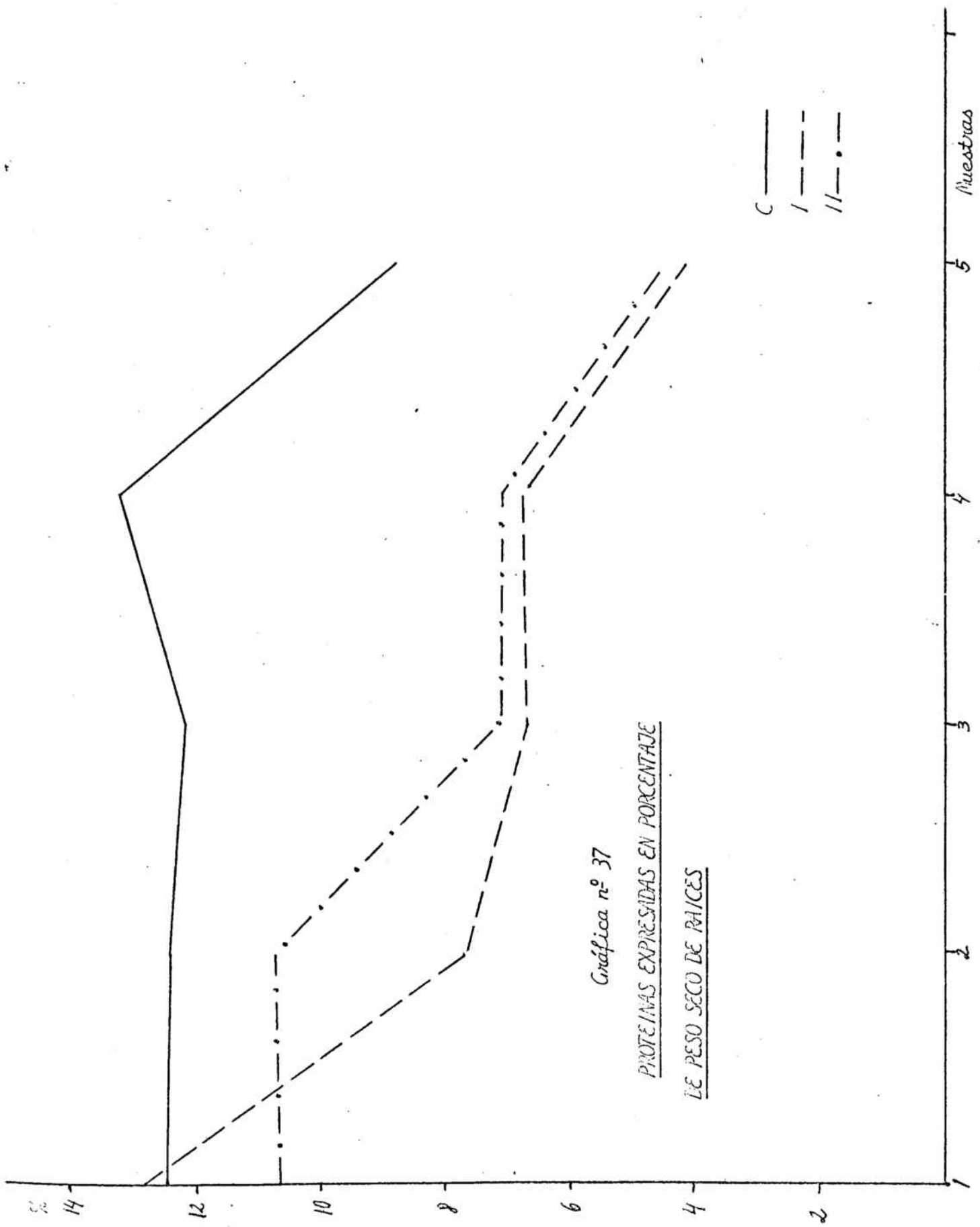


Gráfica n° 36

PROTEINAS REFERIDAS A LAS RAICES DE  
LINA PLANTA Y EXPRESADAS EN MILIGRAMOS

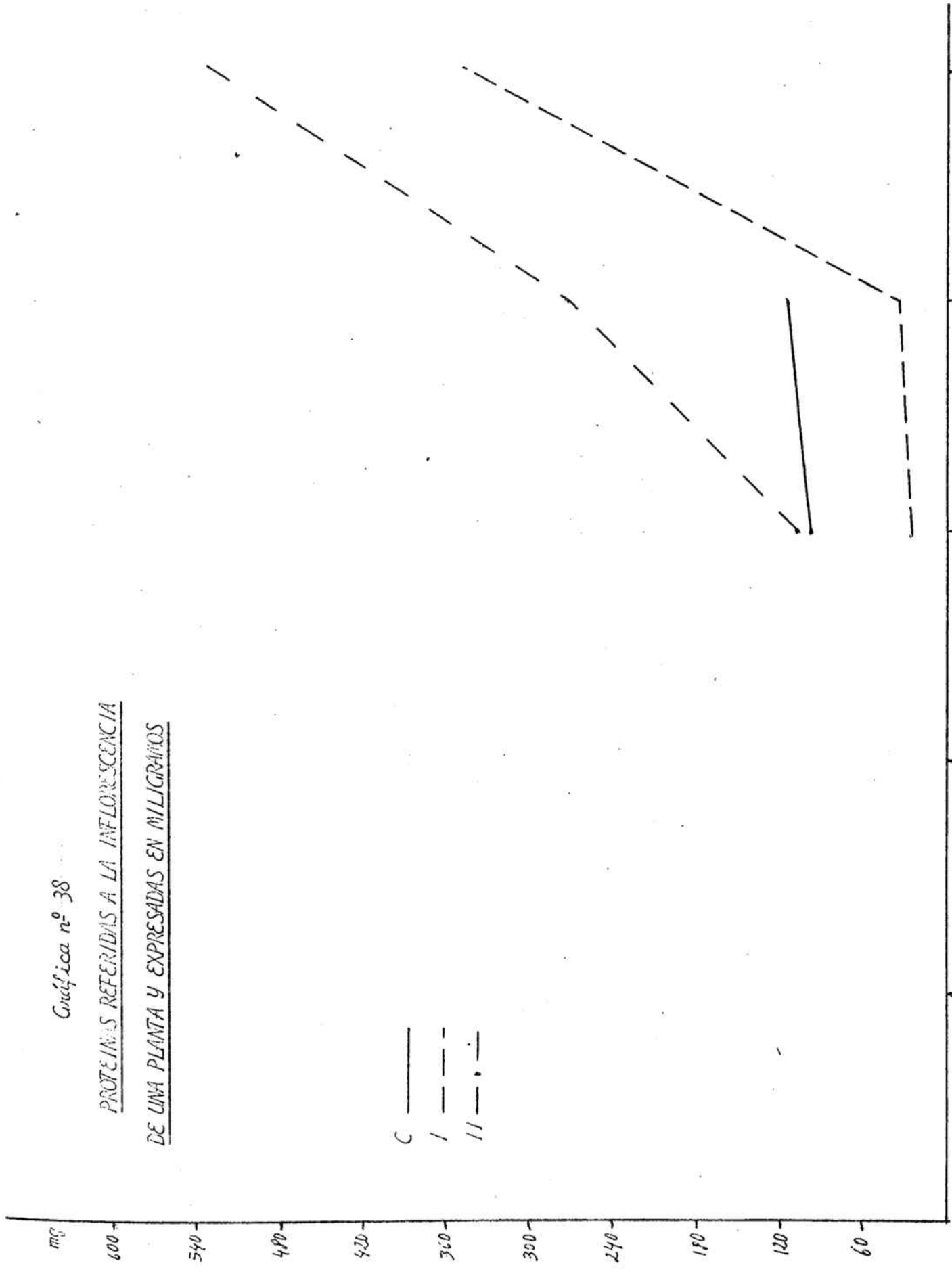
C ———  
/ ———  
// ———





Gráfica n° 38

PROTEINAS REFERIDAS A LA INFLORESCENCIA  
DE UNA PLANTA Y EXPRESADAS EN MILEGRAMOS



muestras

Gráfica n° 39

PROTEINAS EXPRESADAS EN PORCENTAJE  
DE PESO SECO DE INFLUESCENCIA

C ———  
/ - - -  
// - · -

%

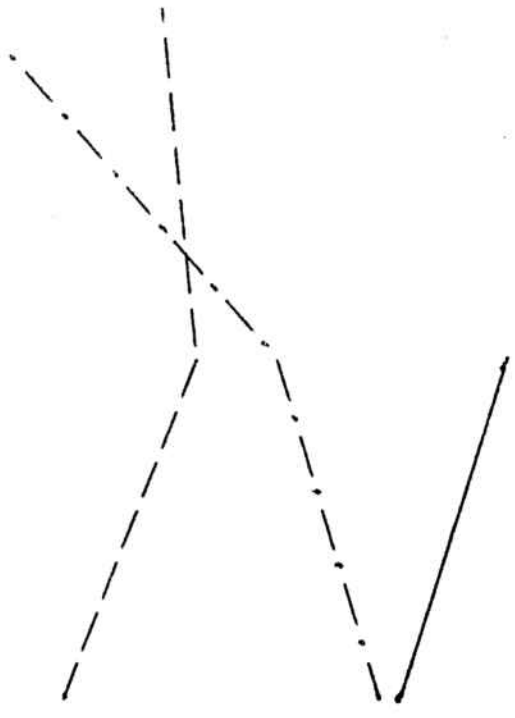
20

15

10

5

Muestras



## Aminoácidos

### *1- Consideraciones preliminares*

*Para la interpretación de los resultados concernientes a los aminoácidos, nos hemos atenido a las siguientes consideraciones:*

*a) Como puntos de referencia, para comparar en las plantas tratadas con el elemento Pb ( ensayos I y II ) y control su desarrollo y los valores de aminoácidos ensayados, hemos prestado especial atención a los siguientes estados del ciclo vegetativo:*

- Primordios de inflorescencia*
- Floración plena*
- Primeros frutos ( cuando ya se han definido algunos frutos, aunque predomine masivamente el estado floral ).*
- Fructificación plena ( cuando la planta presenta prácticamente solo frutos, aunque en distintos estados de maduración ).*

*b) De las cinco muestras recolectadas, hemos analizado solamente los aminoácidos de naturaleza proteica en estado libre de la tercera y la quinta muestra. La tercera muestra coincidió con la aparición de los primordios de inflorescencia en las plantas control, la floración plena en las plantas del ensayo I y los primeros frutos en las plantas del ensayo II. La*

quinta muestra coincidía con la presencia de los primeros frutos en las plantas control y la fructificación plena en las plantas tratadas con plomo, aunque en un grado más avanzado en las del ensayo II.

De este modo, quedarían indicadas las modificaciones ocasionadas en período de floración-fructificación por el tratamiento con plomo.

c) Hemos analizado los aminoácidos de naturaleza proteica en estado libre, tratando de hallar una posible relación entre los niveles de los mismos y el curso seguido por los niveles de nucleicos, proteína total y nicotina, en los distintos ensayos ( control, I y II ) de cada muestra y para cada órgano ( hojas, tallos, raíz e inflorescencias ).

d) Los aminoácidos han sido referidos en grupos, cuyos valores, expresados en porcentaje de peso seco, siguen un curso análogo en los distintos ensayos. Nos ha parecido que esto ayudaría a facilitar la interpretación de los resultados y, en todo caso, cuando esto no fuese posible, a la simple descripción.

## 2- Descripción de los resultados

Se refieren a los valores de los aminoácidos, expresados en porcentaje de peso seco por órgano, correspondiente a las dos muestras tomadas.

### HOJAS

a) Los aminoácidos, ácido aspártico, glicina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina y triptófano, presentan en las hojas de las plantas control y tratadas ( I y II ) ( tablas 14, 19, 21,



22, 23, 24, 25, 26 y 27 ) el siguiente curso de valores:

		Control. Se presentan en estado libre: ile > leu > asp > val >							
		fen > gli > tir > tri > met							
3 <sup>a</sup> muestra	/	no se presenta ninguno en estado libre							
	//	no se presenta ninguno en estado libre							
		Control no se presenta ninguno en estado libre							
5 <sup>a</sup> muestra	/	"	"	"	"	"	"	"	"
	//	"	"	"	"	"	"	"	"

La explicación fisiológica del por qué estos aminoácidos no están presentes en las hojas de las plantas control en la 5<sup>a</sup> muestra, podría ser que, dado el estado vegetativo de las mismas ( fructificación ), las hojas se hallaban en estado senescente, y probablemente se habría producido una translocación previa de estos aminoácidos hacia partes metabólicamente más activas ( por ejemplo, inflorescencias ).

Por otra parte, el que no se encuentren estos aminoácidos en las plantas tratadas en ninguna de las dos muestras nos hace pensar en la posible acción inhibitoria, por parte del plomo ( metal pesado ), de la acción de los enzimas que ocasionan la hidrólisis de las proteínas o la síntesis de los indicados aminoácidos, o bien que hubiesen migrado con anterioridad.

b) El curso de los valores de treonina, serina, ac. glutámico, prolina y alanina ( tablas 15, 16, 17, 18 y 20 ) referidos a las hojas de una planta, en los distintos ensayos, es el siguiente:

	Control	tre > glu > pro > ser > ala
3 <sup>a</sup> muestra	I	pro > glu > ser > tre > ala
	II	pro > glu > ser > tre > ala

Para estos aminoácidos, a excepción de prolina, los valores son considerablemente más altos en las hojas de las plantas control que en las tratadas, y a su vez en las hojas de las plantas del ensayo I mayores que los respectivos de las plantas del ensayo II; es decir  $C > I > II$ .

Referido a la prolina, las relaciones son  $I > C > II$

	Control	pro > tre > glu > ser > ala
5 <sup>a</sup> muestra	I	no se presentan en estado libre
	II	" " " " " "

Destacamos en esta última muestra, que los valores hallados para los indicados aminoácidos en las hojas de las plantas control, son, en todos los casos, más bajos que los encontrados en la 3<sup>a</sup> muestra.

Aquí, la explicación fisiológica del por qué de estos hechos podría deducirse de la comparación del estado de desarrollo de estas plantas en las dos muestras consideradas. El estado de desarrollo de las plantas control en la quinta muestra, es comparable al alcanzado por las tratadas en la tercera muestra. Por ello, las hojas de las plantas tratadas en la tercera muestra deberían presentar lógicamente niveles más altos de estos aminoácidos libres, debido especialmente a hidrólisis proteica, que es normalmente potenciada en los órganos senescentes; el que lo expuesto no ocu-

na en la tercera muestra, donde los niveles más bajos para estos aminoácidos los encontramos precisamente en las plantas II de desarrollo más avanzado; y el que en la quinta muestra no se encuentren ni indicios de estos aminoácidos, nos lleva a pensar en una inhibición, también en este caso de los enzimas que regulan la degradación de proteína y/o la síntesis de los indicados aminoácidos.

c) Los aminoácidos lisina, histidina y arginina, no se han encontrado en estado libre, ni en las hojas de las plantas control, ni en las de las tratadas, en las dos muestras consideradas.

En este caso, no parece que se pueda pensar en ningún efecto por parte del plomo, en el metabolismo de estos aminoácidos, ya que tampoco se encuentran en el control

### TALLO

a) Los valores de los aminoácidos ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina y alanina en estado libre y referidos al tallo de una planta ( tablas 14, 15, 16, 17, 18 y 20 ), no manifiestan la misma relación en los ensayos de la 3ª muestra, así:

- Los valores de asp, tre, glu y pro, son más altos en el control que en el ensayo II, y estos a su vez superiores a los del ensayo I; es decir:

C > II > I

- Los valores de ser y ala, son mayores en el ensayo I que en el control, y estos, a su vez, más altos que los del ensayo II; es decir, I > C > II.

Sin embargo, en la 5ª muestra todos estos aminoácidos siguen el mismo curso; se presentan en mayor cantidad en los tallos de las plantas tratadas II, después en las I, y finalmente, con valores más bajos, en el tallo de las control; así,  $II > I > C$

b) Los aminoácidos valina y metionina ( tablas 21 y 22 ) en los tallos, no se encuentran en estado libre en ningún ensayo de la tercera muestra.

En la quinta muestra, aparecen indicios de estos aminoácidos en los tallos de las plantas I y valores apreciables en los de las plantas II; no encontrándose en los tallos de las plantas control.

c) Para los aminoácidos glicina, isoleucina, leucina, tirosina, y fenilalanina ( tablas 19, 23, 24, 25 y 26 ), solo los encontramos en la 3ª muestra, en el tallo de las plantas control ( caso de ile, leu y fen ), o bien valores más altos en los tallos de las plantas control que en los de las tratadas ( caso de gli ).

En la 5ª muestra, por el contrario, ninguno de estos aminoácidos se presenta en estado libre en el tallo de las plantas control, y si en los de las plantas tratadas, siendo los valores en todos los casos mayores en el ensayo I que en el II.

d) Finalmente, triptófano, lisina, histidina y arginina, no se encuentran en estado libre ni en el tallo de las plantas control, ni en los de las plantas tratadas, en las dos muestras consideradas ( tablas 27, 28, 29, 30 ).

De lo expuesto, deducimos que los valores de todos los aminoácidos de naturaleza proteica en estado libre, presentes en el tallo en el perio-

do correspondiente a nuestra experiencia, presentan una característica común: son considerablemente más altos al final de la experiencia ( 5<sup>a</sup> muestra ) en las plantas tratadas que en las control, en los que muchos aminoácidos no se presentan ni en indicios.

El fenómeno observado podría ser el reflejo de una hidrólisis proteica propia del estado senescente de los tallos de las plantas tratadas, más acusado en los tallos del ensayo II por estar más avanzado su desarrollo.

#### RAIZ

a) Al igual que ocurría en el tallo, en la raíz de las plantas control y tratadas, los aminoácidos ac. aspártico, treonina, serina, ac. glutámico, prolina y alanina, presentan una relación de valores en los tres ensayos, que permite agruparlos para su estudio, ( tablas 14, 15, 16, 17, 18 y 20 ).

Las cantidades halladas para cada uno de estos aminoácidos en estado libre, en las raíces de las plantas ensayadas, siguen el siguiente orden de mayor a menor:

3<sup>a</sup> muestra                    C > II > I

5<sup>a</sup> muestra                    C > I > II

Únicamente para prolina            II > I > C

b) Valina y metionina no las apreciamos en estado libre en las raíces de las plantas ensayadas en la 3<sup>a</sup> muestra; y en la 5<sup>a</sup> muestra encontramos valores para los indicados aminoácidos en los ensayos control y I, siendo en este último mayores, así I > C. ( tablas 21 y 22 ).

c) Las cantidades halladas de glicina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina libres ( tablas 19, 23, 24, 25 y 26 ) son más altas para todos estos aminoácidos en las plantas control que en las tratadas en la 3<sup>a</sup> muestra; por el contrario, en la 5<sup>a</sup> muestra ni siquiera encontramos indicios de estos aminoácidos en las raíces de las plantas control, y si valores apreciables para los mismos en las raíces de las plantas tratadas. En las dos muestras para todos los aminoácidos se encuentran valores mayores en las raíces de las plantas I que en las de las plantas II.

3<sup>a</sup> muestra                    C > I > II

5<sup>a</sup> muestra                    - I > II

d) Para triptófano, lisina, histidina y arginina en estado libre, encontramos indicios ( tri, lis ), valores ( his ) o nada ( arg ) en las plantas II de la 3<sup>a</sup> muestra.

En la 5<sup>a</sup> muestra no encontramos ningún valor para los indicados aminoácidos ( tablas 27, 28, 29 y 30 )

Considerando lo expuesto para las raíces de las plantas control y tratadas, solo queremos destacar un posible efecto inhibidor ejercido por el plomo sobre los enzimas que intervienen en la síntesis y/o hidrólisis de los aminoácidos ac. aspártico, treonina, serina, ac. glutámico y alanina, por ser sus valores siempre relativamente más bajos en las raíces de las plantas tratadas, particularmente en las del ensayo II, que en las raíces de las plantas control en ambas muestras.

## INFLORESCENCIA

a) Los valores de los aminoácidos ac. aspártico, treonina, serina, ac. glutámico, prolina, glicina y alanina en estado libre, referidos a la inflorescencia de una planta ( tablas 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 ), manifiestan todos la misma relación en los ensayos de la 3ª muestra:

	Control	no se presentan en estado libre
3ª muestra	I	pro > tre > glu > ser > asp > ala > gli
	II	pro > tre > ser > asp > glu > ala > gli

En todos los casos, los valores correspondientes de estos aminoácidos son más altos en las inflorescencias de las plantas tratadas I que en las II, así  $I > II$ .

En la 5ª muestra para los indicados aminoácidos encontramos valores en los tres ensayos considerados, y con la particularidad de que, con la excepción de prolina y treonina, en todos los demás casos las cantidades halladas en las inflorescencias de las plantas control son superiores a las encontradas en las plantas tratadas, y para éstas mayores en las del ensayo I que en las del ensayo II, es decir  $C > I > II$ . Sin embargo, para prolina y treonina se aprecia  $I > II > C$ .

	Control	tre > glu > pro > ser > ala > asp > gli
5ª muestra	I	tre > pro > glu > ser > ala > asp > gli
	II	tre > pro > glu > ser > asp > ala > gli

b) De los aminoácidos valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina en estado libre, no encontramos cantidades apreciables en las inflorescencias de las plantas control y tratadas de la 3<sup>a</sup> muestra. En las correspondientes de la 5<sup>a</sup> muestra se observa que, para todos los aminoácidos, los valores encontrados en las inflorescencias control son más altos que los encontrados en las de las plantas tratadas; y en las de éstas, superiores en las del ensayo I que en las del ensayo II; así también  $C > I > II$ .

c) Finalmente los valores de los aminoácidos triptófano, lisina, histidina y arginina libres, y referidos a la inflorescencia de una planta ( tablas 27, 28, 29 y 30 ), no los encontramos en los ensayos de la 3<sup>a</sup> muestra, y en los de la 5<sup>a</sup> los encontramos más altos en los correspondientes a las plantas tratadas I que en las II, mientras que los valores de todos estos aminoácidos son considerablemente inferiores en las plantas control.

---

A la inflorescencia llegan por traslocación gran cantidad de sustancias procedentes de otros órganos de la planta ( especialmente de las hojas ) y, entre estas sustancias, aminoácidos en estado libre. La síntesis proteica en estos órganos es activa; por ello, una interpretación fisiológica, que explique la relación entre los aminoácidos, según los datos obtenidos en nuestras experiencias, podría ser:

El estado de las plantas control en la tercera muestra es de primor-



dios de inflorescencia, mientras que el de las tratadas es de floración plena para las del ensayo I y de primeros frutos para las del ensayo II. Por ello, las inflorescencias de las plantas tratadas II presentan un mayor grado de desarrollo, que bien puede traducirse en mayor cantidad de proteína sintetizada y menor cantidad de aminoácidos libres con respecto a las inflorescencias de las plantas tratadas I.

En la 5<sup>a</sup> muestra las plantas control se encuentran en el mismo estado de desarrollo que las plantas tratadas de la tercera muestra, y por ello encontramos valores para los aminoácidos que en la mayoría de los casos son superiores a los respectivos de las plantas tratadas.

Es de destacar, que, en la mayoría de los casos, los niveles de los valores alcanzados por los aminoácidos proteicos en estado libre son superiores en las inflorescencias de las plantas tratadas comparados con los respectivos de las inflorescencias de las plantas control en el mismo grado de desarrollo. Este hecho parece indicar una inhibición de la síntesis proteica, por efecto del plomo, lo que se traduce en una reducción del crecimiento.

Tabla n° 14

ACIDO ASPARTICO - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO

SECO POR ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0220	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0664	0,0072	0,0130
5	0,0093	0,0442	0,0495
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0349	0,0128	0,0373
5	0,0461	0,0269	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	0,0785	0,0724
5	0,0294	0,0206	0,0174

Tabla nº 15

TRECOWINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,1332	0,0083	0,0025
5	0,0112	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,2172	0,0200	0,0333
5	0,0375	0,0643	0,1074
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,1990	0,0326	0,0796
5	0,1678	0,0750	0,0273
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	0,2953	0,2678
5	0,1172	0,2833	0,1328

Tabla nº 16

SERINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0507	0,0110	0,0032
5	0,0075	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0484	0,0888	0,0153
5	0,0077	0,0312	0,0389
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0427	0,0226	0,0252
5	0,0727	0,0237	0,0057
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	0,0852	0,0574
5	0,0669	0,0649	0,0580

Tabla nº 17

ACIDO GLUTAMICO - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO

SECO POR ORGANNO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,1263	0,0258	0,0119
5	0,0091	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,1106	0,0341	0,0404
5	0,0251	0,0663	0,0550
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0923	0,0489	0,0833
5	0,1818	0,0440	0,0188
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	0,2099	0,0442
5	0,1200	0,1066	0,0612

Tabla nº 18

PROLINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR  
ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0605	0,0818	0,0287
5	0,0502	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0963	0,0403	0,0580
5	0,0722	0,0996	0,1871
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0517	0,0070	0,0130
5	0,0080	0,0102	0,0182
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	0,3652	0,3396
5	0,0940	0,2173	0,1214

Tabla nº 19

GLICINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0115	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0062	0,0007	0,0040
5	—	0,0110	0,0082
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0140	0,0065	0,0059
5	—	0,0074	0,0059
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	0,0165	0,0032
5	0,0133	0,0117	0,0030

Tabla nº 20

ALANINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0378	0,0083	0,0032
5	0,0020	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0224	0,1867	0,0153
5	—	0,0179	0,0224
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0274	0,0167	0,0185
5	0,0129	0,0129	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	0,0587	0,0178
5	0,0500	0,0488	0,0100



Tabla n° 21

VALINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0197	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	indicios	0,0069
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	—	—	—
5	0,0049	0,0052	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	0,0112	0,0077	0,0023

Tabla nº 22

METIONINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0033	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	claros indicios	0,0021
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	—	—	—
5	claros indicios	0,0101	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	0,0088	0,0040	0,0017

Tabla nº 23

ISOLEUCINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO

POR ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0315	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,1895	—	—
5	—	0,0107	0,0040
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0208	—	0,0032
5	—	0,0022	indicios
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	indicios	indicios
5	0,0154	0,0153	0,0069

Tabla nº 24

LEUCINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0254	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0038	—	—
5	—	0,0097	0,0077
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0581	0,0046	0,0166
5	—	0,0039	0,0016
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	claros indicios	indicios
5	0,0149	0,0139	0,0059

Tabla n° 25

TIROSINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0070	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0821	0,0052	0,0103
5	—	0,0059	claros indicios
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0131	—	indicios
5	—	indicios	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	indicios	indicios
5	0,0144	0,0142	0,0022

Tabla nº 26

FENILALANINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO

POR ORGANNO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0148	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	0,0042	—	—
5	—	0,0733	0,0134
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	0,0198	—	indicios
5	—	indicios	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	0,1498	0,1330	0,0430

Tabla nº 27

TRIPTOFANO - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO

POR ORGANNO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	0,0051	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	—	—
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	—	—	indicios
5	—	—	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	0,0784	0,0136

Tabla nº 28

LISINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	<i>indicios</i>	—	—
5	—	—	—
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	—	—	<i>claros indicios</i>
5	—	—	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	0,0051	0,0051	0,0028



Tabla nº 29

HISTIDINA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR  
ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	indicios	—	—
5	—	—	—
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	—	—	0,0041
5	—	—	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	0,0087	0,0057

Tabla nº 30

ARGININA - VALORES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE PESO SECO POR

ORGANO

Muestras	HOJAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	—	—
Muestras	TALLOS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	—	—
Muestras	RAICES		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	—	—
Muestras	INFLORESCENCIAS		
	C	I	II
3	—	—	—
5	—	0,0279	0,0158

### Nicotina

Si consideramos el contenido de nicotina en hojas ( tablas 31 y 32 y gráficas 40 y 41 ) de plantas control, Pb 1 y Pb 11, observamos que es continuamente ascendente. En la 1<sup>a</sup> muestra las cantidades de nicotina son muy superiores en la Pb 11 que en la Pb 1 y en estas que en la control. En la 2<sup>a</sup> muestra el aumento de nicotina en las plantas control es tan grande que practicamente se igualan los contenidos con Pb 1 y Pb 11, y a partir de la 3<sup>a</sup> muestra los valores se hacen superiores en las plantas control, dando al final de la experiencia el orden  $C > Pb 1 > Pb 11$ .

Si consideramos los porcentajes por peso seco de hoja, observamos los mismos fenómenos: en la 1<sup>a</sup> muestra  $Pb 11 > Pb 1 > C$ , un rápido ascenso en el porcentaje de nicotina de las plantas control y en la 5<sup>a</sup> muestra  $C > Pb 1 > Pb 11$ .

El contenido de nicotina de los tallos ( tablas 31 y 32 y gráficas 42 y 43 ) de las plantas control se muestra ascendente hasta la 4<sup>a</sup> muestra y luego descendente, los de las tratadas con plomo descendentes hasta la 3<sup>a</sup> muestra ( floración ) y luego ascendente.

Los porcentajes de nicotina por tallo en las plantas control son continuamente descendentes y los de las tratadas con plomo descendentes hasta la 3<sup>a</sup> muestra y luego ascendentes.

*Las raíces de las plantas control ( tablas 31 y 32 y gráficas 44 y 45 ) tienen un contenido en nicotina que sigue un curso ascendente hasta la 4ª muestra para descender en la 5ª, cuando la planta está ya senescente.*

*En las raíces de las plantas tratadas con plomo la nicotina sigue una línea prácticamente ascendente.*

*Los porcentajes de nicotina en raíces siguen un curso ascendente hasta el momento de la floración y luego descendente.*

*En el estudio del contenido de nicotina en las inflorescencias ( tablas 31 y 32 y gráficas 46 y 47 ) de nuevo debemos tener en cuenta el desarrollo de la misma. Las semillas de Nicotiana rustica contienen nicotina; así, la formación de las mismas influirá en el contenido de nicotina de la infructescencia, que tanto en las plantas control como en las tratadas con plomo es continuamente ascendente en el curso de la experiencia. Los valores muy superiores en las plantas tratadas con plomo ( Pb 11 > Pb 1 > C ) no son más que un reflejo de una infructescencia más desarrollada y madura que en las plantas control.*

Tabla n.º 31

NICOTINA EXPRESADA EN MILEGRAMOS POR PARTE DE PLANTA

Muestras	C										I					II																								
	T					R					H					I					H					T					R					I				
	H	T	R	J	J	H	T	R	J	J	H	T	R	J	J	H	T	R	J	J	H	T	R	J	J	H	T	R	J	J	H	T	R	J	J					
1	2,09	1,85	0,53	-	-	3,68	3,89	0,73	-	-	7,07	3,54	0,39	-	-	11,65	3,50	1,94	3,18	-	14,05	6,15	2,99	16,19	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-										
2	11,06	2,69	0,89	-	-	8,67	3,67	1,03	-	-	9,42	5,18	0,63	-	-	11,65	3,50	1,94	3,18	-	14,05	6,15	2,99	16,19	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-										
3	13,71	4,46	3,34	-	-	14,20	1,96	1,78	1,52	-	11,65	3,50	1,94	3,18	-	14,05	6,15	2,99	16,19	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-															
4	30,57	5,83	3,85	5,97	-	13,86	2,90	1,09	2,26	-	14,05	6,15	2,99	16,19	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-															
5	59,86	3,45	1,70	9,65	-	25,18	3,31	2,10	19,74	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-	20,54	12,28	2,69	25,36	-															

Tabla nº 32

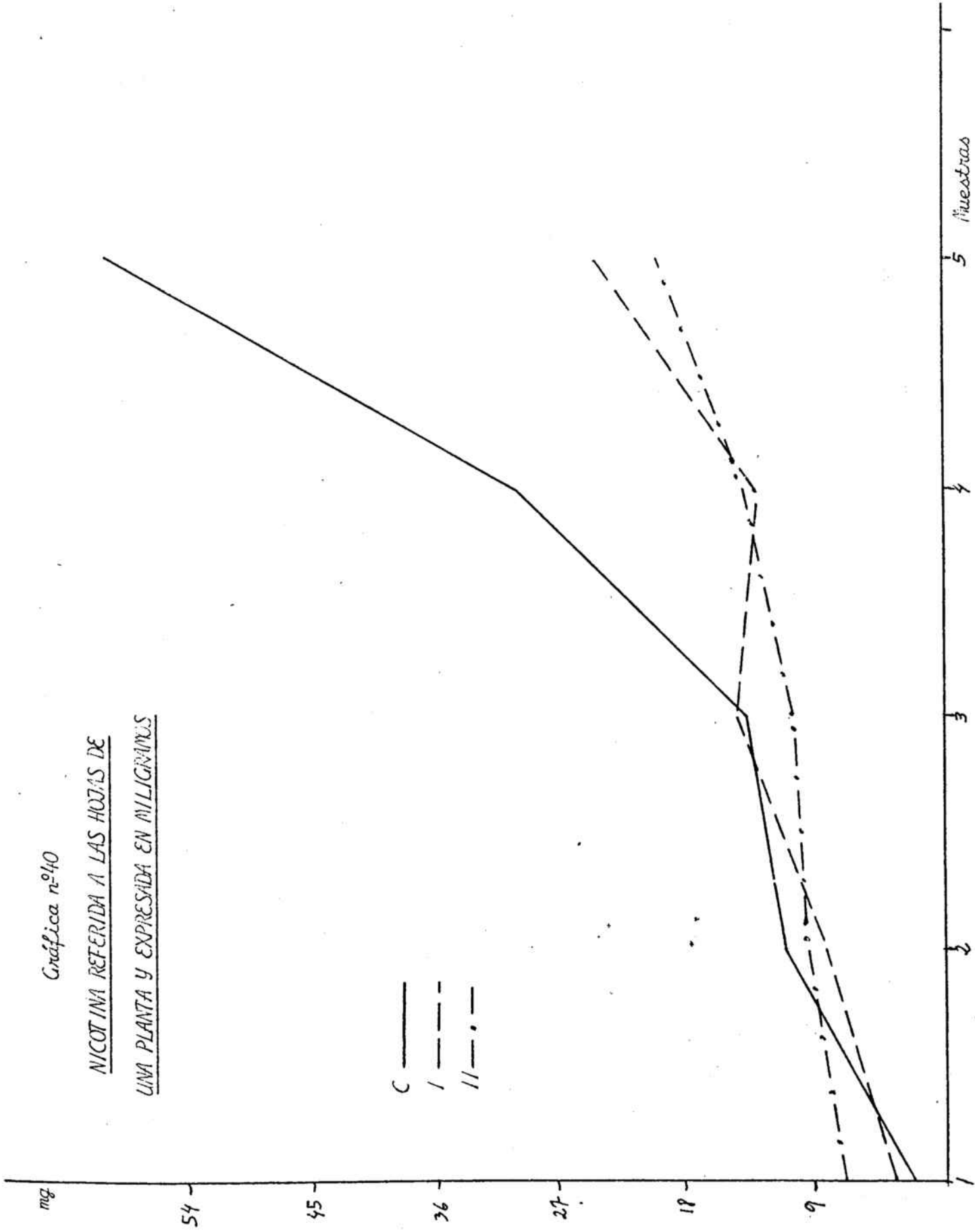
NICOTINA EXPRESADA EN PORCENTAJE DE PESO SECO

Muestras	C					I					II					
	H	T	R	I	-	H	T	R	I	-	H	T	R	I	-	
1.	0,25	0,61	0,45	-	0,30	0,83	0,61	-	0,52	0,88	0,25	-	0,60	0,85	0,32	-
2.	0,72	0,54	0,46	-	0,55	0,58	0,53	-	0,76	0,27	0,45	1,31	0,63	0,39	0,50	0,51
3.	0,74	0,48	0,80	-	0,70	0,33	0,18	1,30	0,66	0,44	0,32	1,12	1,05	0,61	0,33	1,13
4.	0,97	0,33	0,53	0,98	1,06	0,35	0,25	1,37	1,05	0,61	0,33	1,13	1,05	0,61	0,33	1,13
5.	1,85	0,23	0,20	1,27	1,06	0,35	0,25	1,37	1,05	0,61	0,33	1,13	1,05	0,61	0,33	1,13

Gráfica n.º 40

NICOTINA REFERIDA A LAS HOJAS DE  
UNA PLANTA Y EXPRESADA EN M/LIGNIUS

C ———  
/ - - - -  
// - . . -



Gráfica n°41

NICOTINA EXPRESADA EN PORCENTAJE

DE PESO SECO DE HOJAS

C ———  
/ - - -  
// - · -

%

2'0

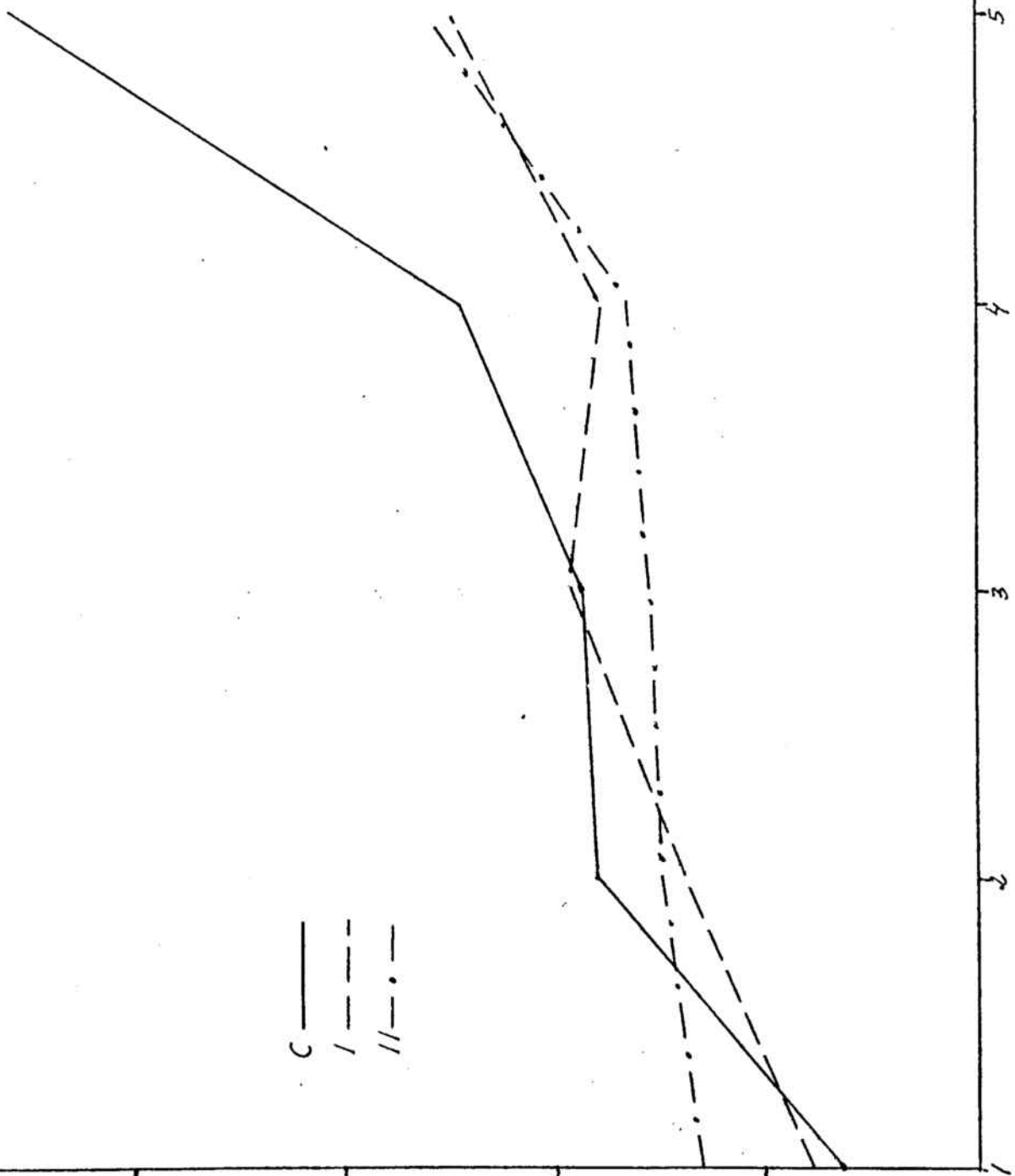
1'6

1'2

0'8

0'4

1



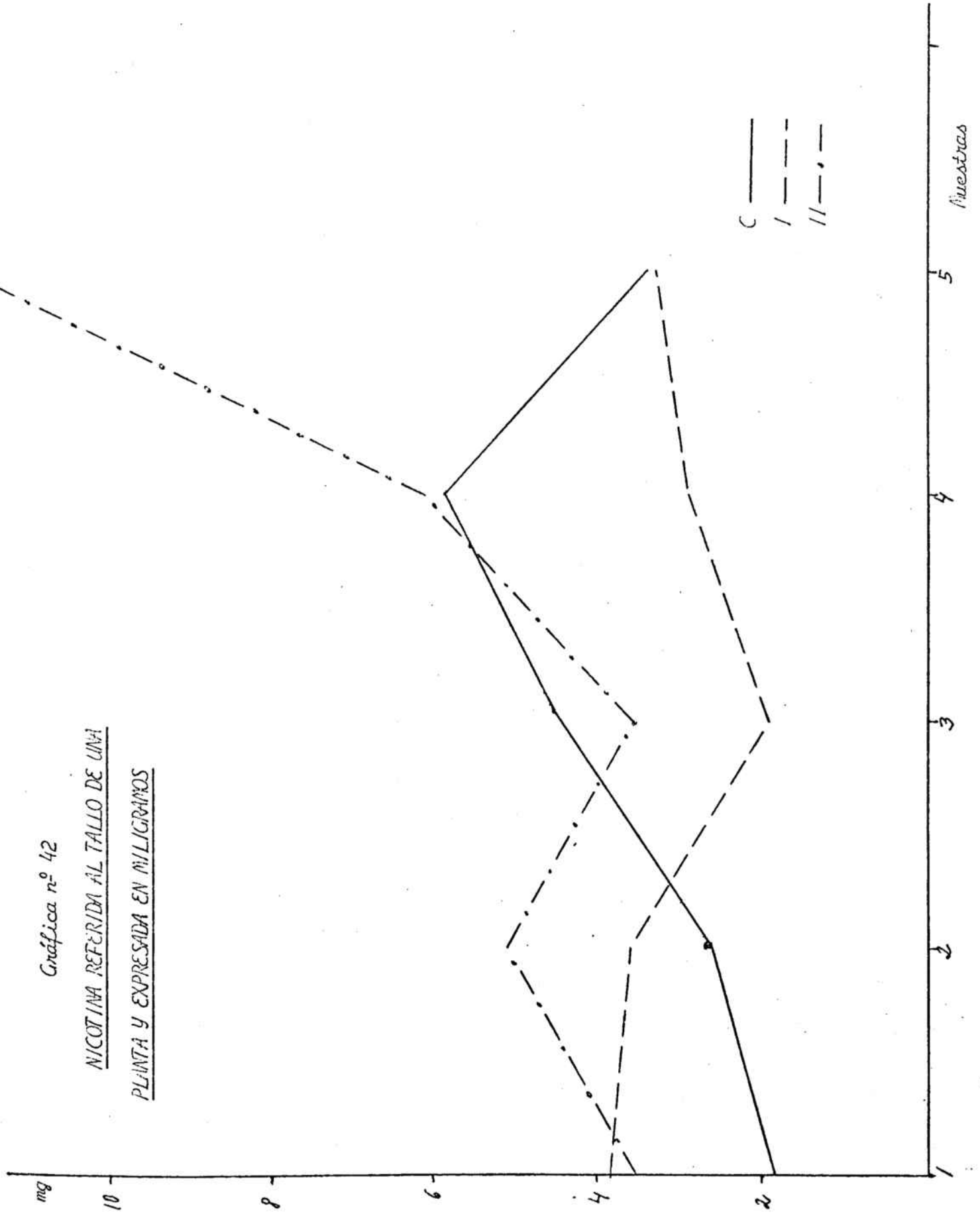
Muestras



Gráfica n° 42

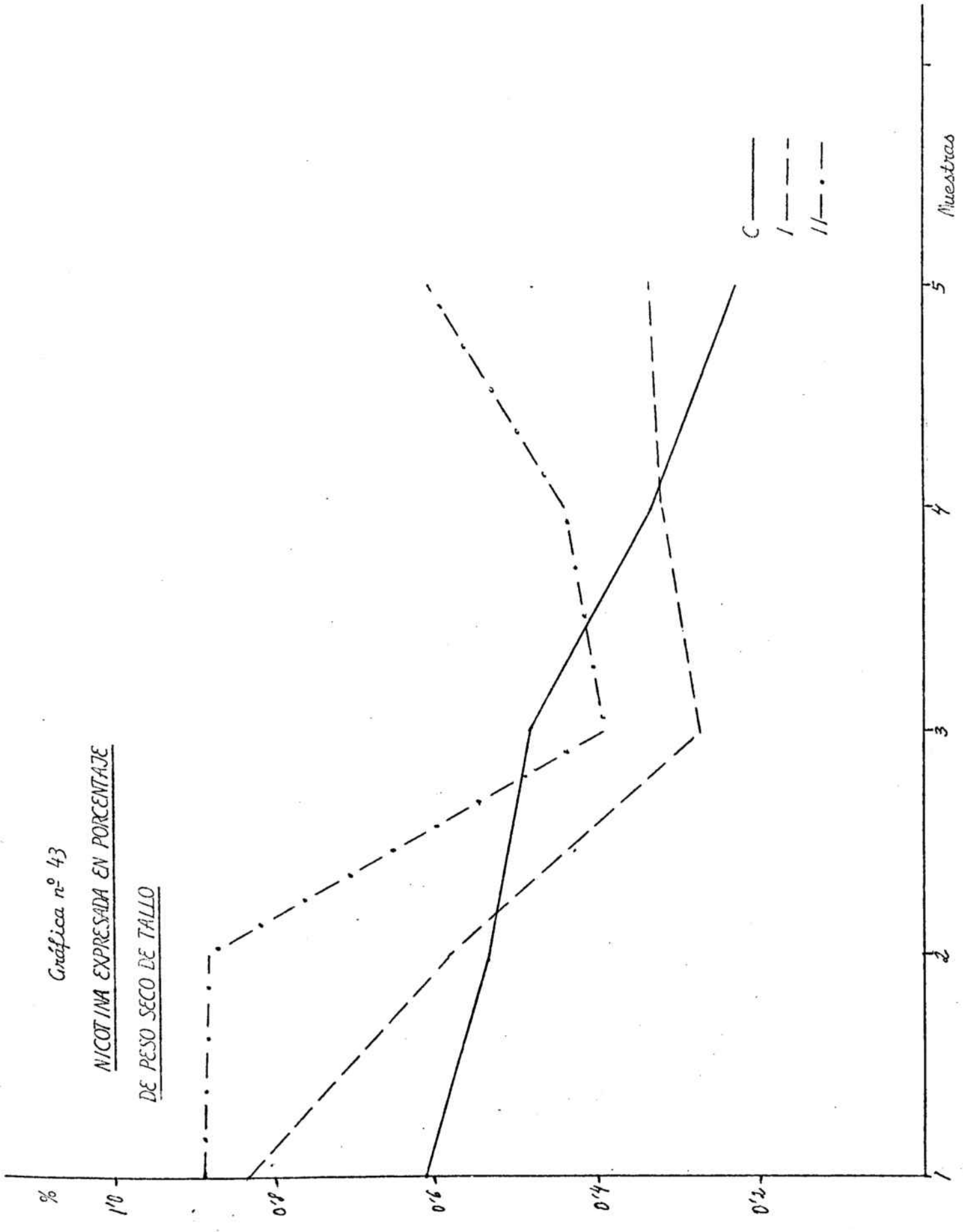
NICOTINA REFERIDA AL TALLO DE UNA

PLANTA Y EXPRESADA EN M/LIGRAMOS



Gráfica n° 43

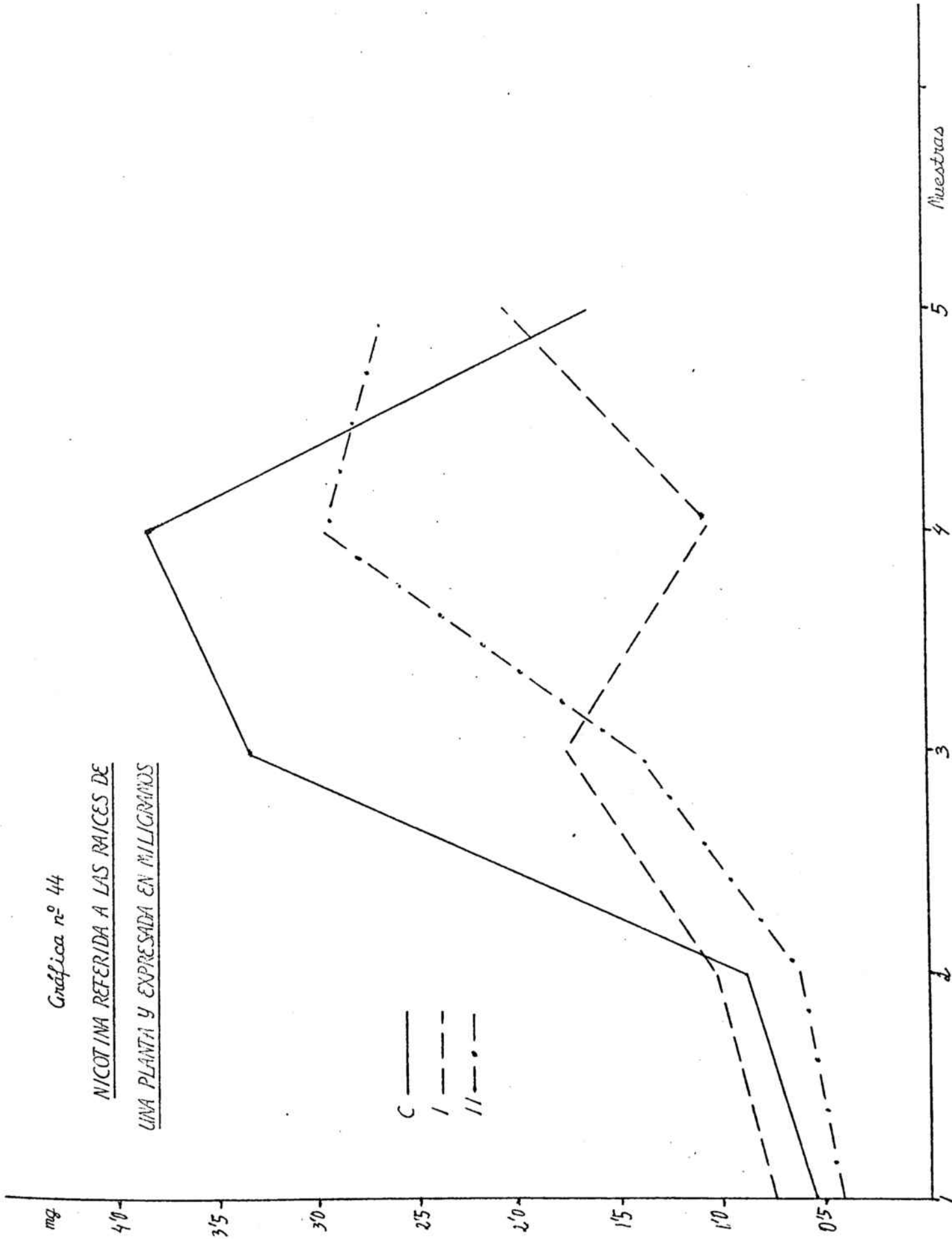
NICOTINA EXPRESADA EN PORCENTAJE  
DE PESO SECO DE TALLO



Gráfica nº 44

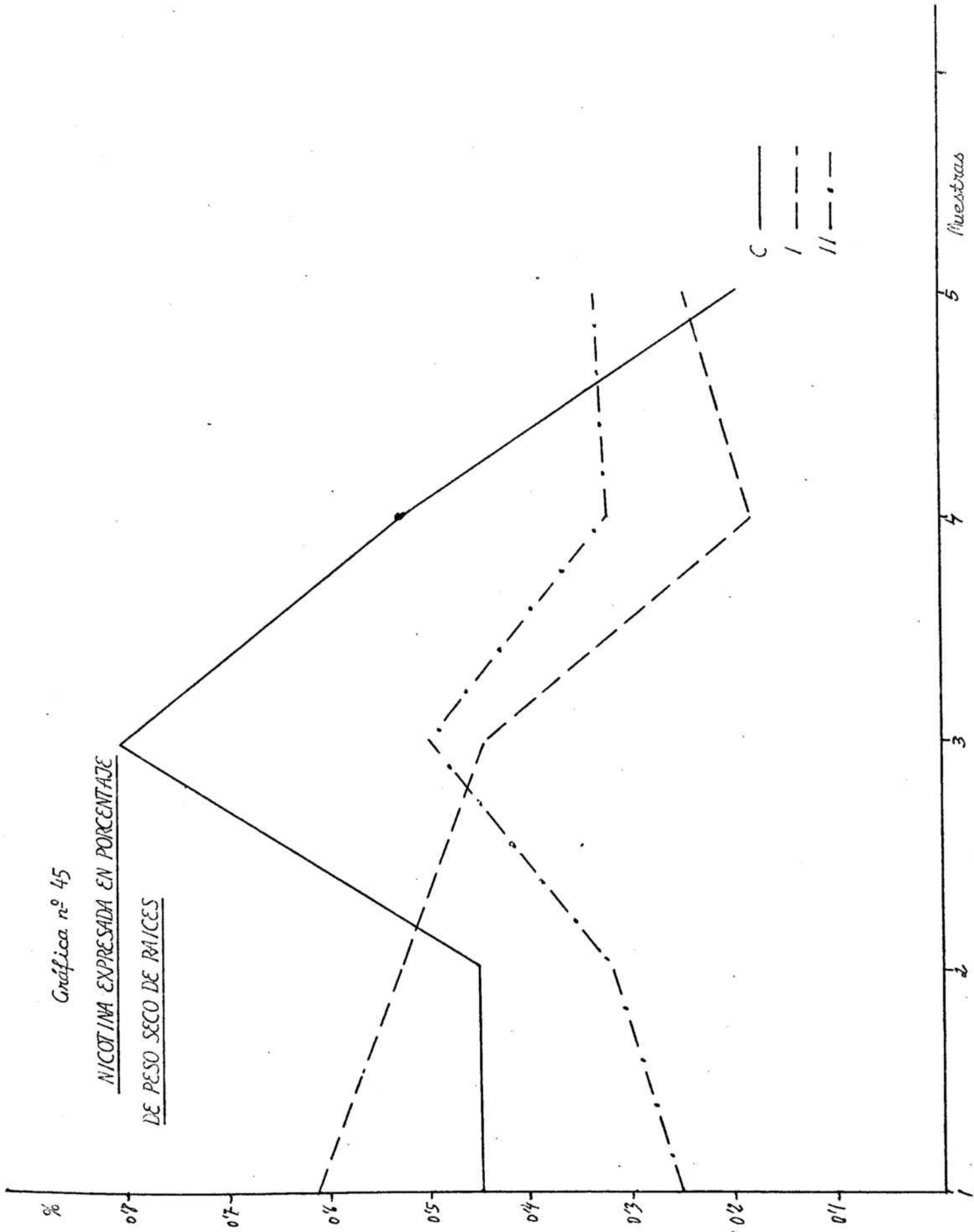
NICOTINA REFERIDA A LAS RAICES DE  
UNA PLANTA Y EXPRESADA EN MILEGRAMOS

C ———  
/ - - -  
// ····



Gráfica n° 45

NICOTINA EXPRESADA EN PORCENTAJE  
DE PESO SECO DE RAICES



C ———  
I - - - -  
II - · - · -

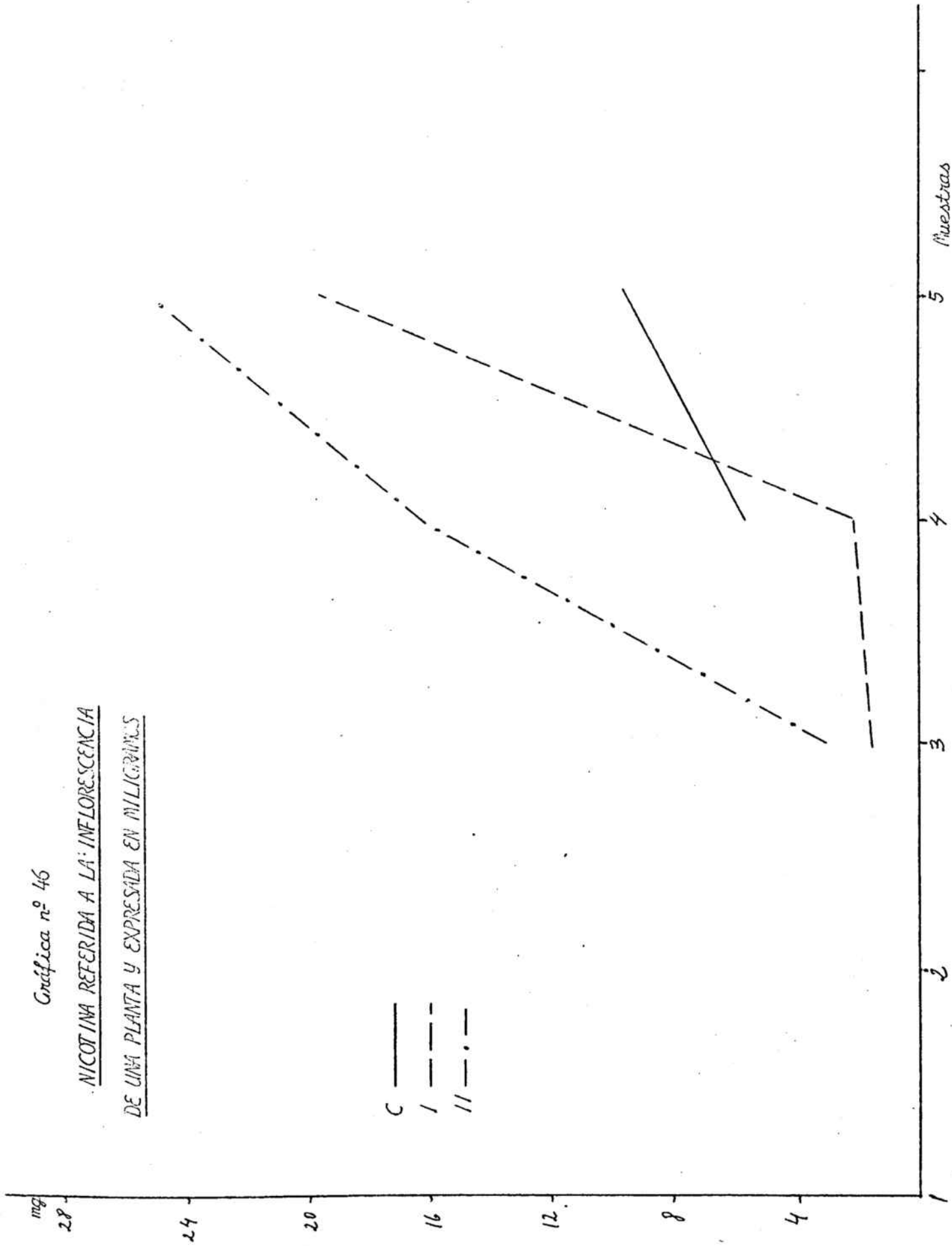
Muestras

Gráfica n° 46

NICOTINA REFERIDA A LA INFLORESCENCIA

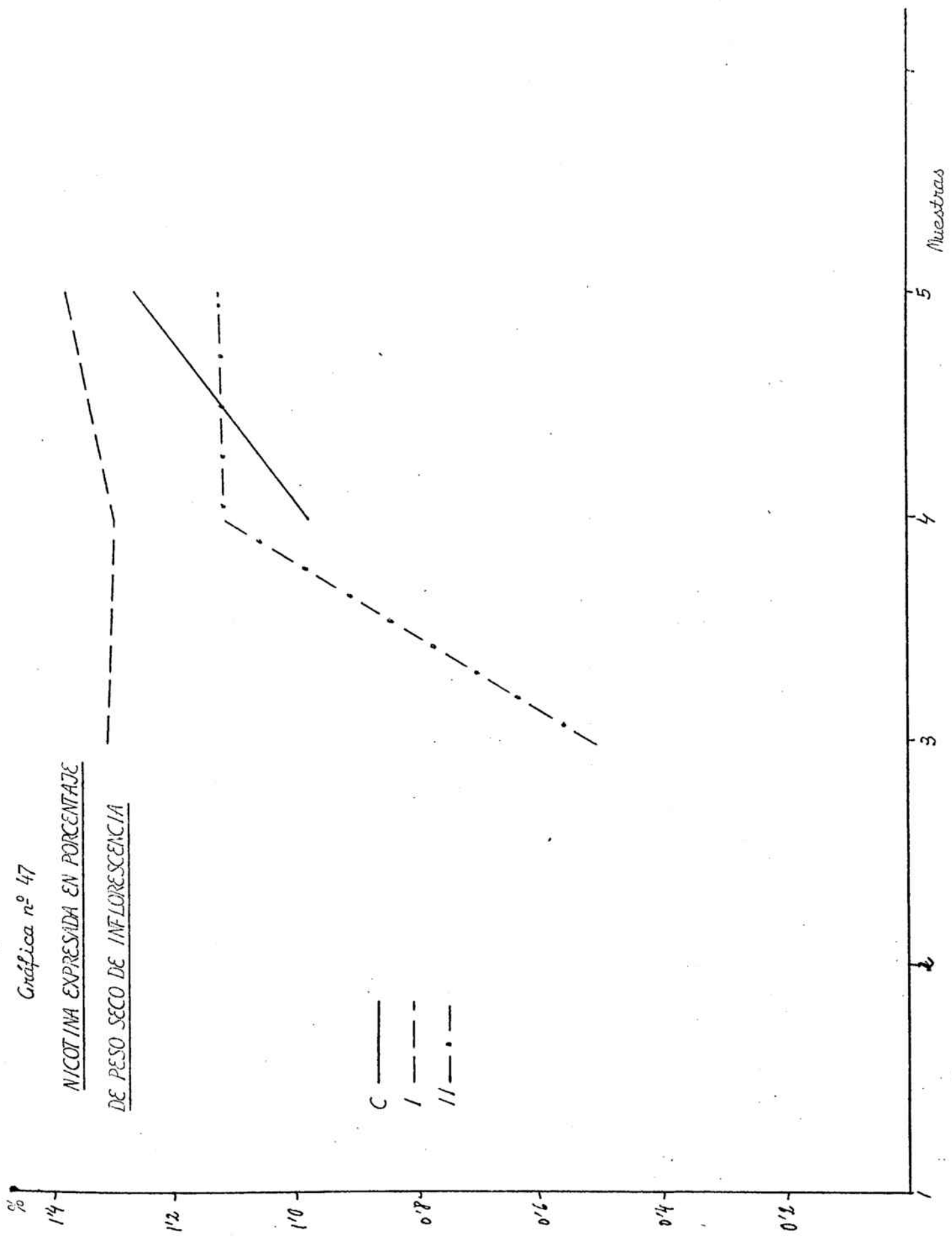
DE UNA PLANTA Y EXPRESADA EN MİLLIGRAMOS

C ———  
I - - - -  
II - · - · -



Gráfica nº 47

NICOTINA EXPRESADA EN PORCENTAJE  
DE PESO SECO DE INFLORESCENCIA



## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos deducir las siguientes conclusiones:

- 1- El plomo parece acortar el ciclo vegetativo de las plantas de Nicotiana rustica L., adelantando la floración y fructificación.
- 2- Las plantas manifestaban un menor crecimiento en soluciones adicionadas de plomo que en la solución control.
- 3- En el estado prefloral de la planta el plomo inhibe parcialmente la síntesis de clorofila, pero en la senescencia se retarda su degradación.
- 4- El contenido de carotenoides es más bajo en las plantas crecidas en las soluciones adicionadas de plomo.
- 5- El plomo parece estimular la síntesis de ADN y ARN en el estado prefloral de la planta.
- 6- Los niveles de proteínas en el estado prefloral son superiores en las plantas control que en las tratadas con plomo, pero cuando las plantas llegan a la senescencia, el plomo parece retardar la degradación de las proteínas
- 7- Por efecto del plomo y en proporción a la dosis empleada del mis-

mo, parece observarse una inhibición de la acción de los enzimas que ocasionan la hidrólisis proteica. Este hecho se deduce del mayor nivel de aminoácidos libres encontrados en las plantas control con relación a las tratadas; aún cuando, la planta a partir del estado de floración presenta cada vez mayor nivel de aminoácidos libres como consecuencia del avance en el estado de senescencia.

8- En el estado prefloral los niveles de nicotina en hojas ( órgano donde normalmente se acumula la nicotina ) son superiores en las plantas tratadas con plomo que en las control, y, a su vez, tanto mayores cuanto mayor es la dosis de plomo dada. Por el contrario, en las plantas senescentes se invierte el orden.

---



*La planta, sin duda, ha tomado el plomo en alguna medida, ya que se han observado trastornos metabólicos en las plantas tratadas, pero ignoramos si este elemento ha quedado retenido en las raíces, o si ha experimentado traslocación y en que medida se encuentra en los demás órganos de la planta*

*En trabajos sucesivos analizaremos los contenidos en plomo en los distintos órganos de la planta, para valorar con más criterio los efectos producidos por dicho elemento en los mismos.*

---

## BIBLIOGRAFIA

- 1- DE SAUSSURE. *Recherches chimiques sur la vegetation*. Paris ( 1804 ).
- 2- ARNON, D. I. *Fisiología vegetal*. Robert M. Devlin. Ed. Omega. Barcelona. 239-253.
- 3- STILES, W., W. Ruhland ( ed ) *Encyclopedia of plant physiology*. Springer, Berlin. 4: 599 ( 1958 ).
- 4- LIPMAN, C. B., *Soil Sci.* 45: 189 ( 1938 ).
- 5- GERLOFF, G. C., *Ann. Rev. Plant Physiol* 14, 107-124 ( 1963 ).
- 6- NICHOLAS, D. J. D., *Ann. Rev. Plant Physiol* 12, 63-90 ( 1961 ).
- 7- BRIGGS, G. E., and R. N. ROBERTSON., *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8:11 ( 1957 ).
- 8- EPSTEIN, E., *Plant Physiol.* 30: 529 ( 1955 ).
- 9- EPSTEIN, E., *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7: 1 ( 1956 ).
- 10- STOUID, P. R., and D. R. HOAGLAND., *Am. J. Botan.* 26: 320 ( 1939 )

- 11- BAYER, E., *Ann. review of Phytopathology*, 17, 77-105 ( 1966 ).
- 12- AUQUIER, P., and J. DE LEVAL., *Biological abstracts*, 59, June ( 1 ) ( 1975 ).
- 13- LIEBHARDT, W. C., and T. J. KOSKE., *Commun Soil Sci Plant anal* 5 ( 2 ) : 85-92 ( 1974 ).
- 14- CANNON, H. L., *Science*, 132, 591-98 ( 1960 ).
- 15- MALYUGA, D. P., *Acad. Sci. Press, Moscow* ( 1963 ). *Translated Consultants Bureau, N. Y.*, 205 pp., ( 1964 ).
- 16- AMBLER, J. E., *Radiation Botany*, 4, 259-65 ( 1964 ).
- 17- GREGORY, R. P. G., and BRADSHAW, A. D., *New Phytologist*, 6, 131-43 ( 1965 ).
- 18- JOWETT, D., *Nature* 182, 816-17 ( 1958 ).
- 19- JOWETT, D., *Nature* 184, 43 ( 1959 ).
- 20- BERRY, R. A., *Jour. Agr. Sci* 14, 58-65 ( 1924 ).
- 21- VON SCHARRER, K., and W. SCHROPP., *Diagnostic criteria for plants and soils*. Robert F. Brewer. Chapman ( ed ). 213-218.
- 22- KEATON, C. M., *Soil Sci*. 43, 401-11 ( 1937 ).

- 23- PRAT, S., *Anc. Journ. Bot.* 14, 633-34 ( 1927 ).
- 24- BRADSHAW, A. D., *Nature.* 169, 1098 ( 1960 ).
- 25- WILKINS, D. A., *Nature* 180, 37-38.
- 26- HESSLER, A., *Biological abstracts.* 59, May ( 11 ) ( 1975 )
- 27- FIOSSELLO, Nevio and M. T. MOLINARI., *Biological abstracts.* 59, March ( 11 ) ( 1975 ).
- 28- CHOIE, D. D., and G. W. RICHTER., *Biological abstracts.* 58, 58254 November ( 11 ) ( 1974 ).
- 29- CHOIE, D. D., and G. W. RICHTER., *Biological abstracts.* 58, 58255 November ( 11 ) ( 1974 ).
- 30- SENENT., *La Contaminación.* Ed. Salvat. Barcelona ( 1973 ).
- 31- CHAUVIN, P., y ROUSSEL, A., *La Pollution Atmosphérique,* Paris ( 1968 ).
- 32- O. M. S. *Risques pour la santé du fait del L'environement.* Ginebra ( 1972 ).
- 33- TICO, L. J., *Cultivo de la vid.* Ed. Sertebi. Barcelona ( 1972 ).
- 34- MARCILLA., *Tratado práctico de viticultura y enología españolas.* Ed. Saeta. Madrid ( 1968 ).

- 35- MEADOWS, D. H., MEADOWS, D. L., RANDERS, J., and WILLIAM, W.,  
*The limits to growth*. New York ( 1972 ).
- 36- ARNON, D. I., and D. R. HOAGLAND., *Soil Sci* 50, 463 ( 1940 ).
- 37- STEINER and VAN WINDEN., *Plant Physiology* 46, 886 ( 1970 ).
- 38- ARNON D. I., *Plant Physiol* 24, 218 ( 1949 ).
- 39- MAC KINNEY G. S., *Biol Chem.* 140, 315 ( 1941 ).
- 40- MAUER A. M. and POLJAKOFF - MAUER., *Physiologia plantarum* 15,  
283 ( 1962 ).
- 41- INGLE J. D. and R. H. HAGEMAN., *Plant Physiol* 40, 835 ( 1965 ).
- 42- INGLE J. D., *Phytochemistry* 2, 353-370 ( 1968 ).
- 43- HOLGATE D. P. and T. W. GOODWIN., *Phytochemistry* 6, 831-43 ( 1965 ).
- 44- SCHNEIDER W. J., *J. Biol. Chem* 161, 293 ( 1945 ).
- 45- BURTON W., *Biochem J.* 62, 315 ( 1956 ).
- 46- VICKERY A. B., *Physiol Rev.* 25, 347 ( 1945 ).
- 47- BELHAMATI A. and COLLET F., *Physiol Plant* 23, 859 ( 1970 ).
- 48- DANIEL J. W. and H. H. BALWIN., *Methods in cell Physiology* 1, 9-41  
*academia Press*. New York ( 1964 ).

49- HANNLEY Y WEBER., *Service Federal del Hygiene publique XXVII*  
46-8 ( 1936 ).

50- SCHIMDT H. y M. SERRANO., *Experientia* 4, 311-312 ( 1948 ).