



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL POSIBLE EFECTO
HERBICIDA DE LOS ÁCIDOS GRASOS
(TRIDECANOICO Y HEPTADECANOICO) Y
LA CAPSAICINA, IDENTIFICADOS EN
CAPSICUM ANNUUM L.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A

KARLA JESSICA FLORES LÓPEZ



DIRECTOR DE TESIS

Dr. Blas Lotina Hensen.

Ciudad Universitaria. D.F. 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Flores
López
Karla Jessica
25964385
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306227642

2. Datos del Tutor

Dr.
Blas
Lotina
Hennsen

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Adolfo
Andrade
Cetto

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Isabel
Aguilar
Laurens

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Alicia
Brechu
Franco

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Felix
Morales
Flores

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación del posible efecto herbicida de los ácidos grasos (tridecanoico y heptadecanoico) y de la capsaicina identificados en *Capsicum Annuum* L.
90pp
2016.

A mi abuela Pach y a mi mamá con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme estudiar y crecer profesionalmente en su máxima casa de estudios.

A la Facultad de Ciencias por permitirme desarrollarme, aprender y maravillarme por la ciencia dentro y fuera de sus aulas.

A la Facultad de Química por permitirme experimentar en sus laboratorios y crecer profesionalmente.

Al Doctor Blas Lotina Hennsen por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo y desarrollar mi tesis, así como también por la paciencia y los regaños.

A la M. en C. Beatriz King porque sin ella este trabajo no hubiera sido posible, por ser uno de los pilares más importantes en este trabajo, por estar siempre al pendiente, por enseñarme como se trabaja en el laboratorio, sobre todo por la paciencia que siempre tuvo conmigo, por las risas, pláticas y bailadas que nos hechábamos para desestresarnos un poco, por las muchas e inmensas veces que reviso mi trabajo, por todo esto y más, inmensas gracias.

A mi jurado: Doctor Adolfo Andrade, Doctora Isabel Aguilar y Doctora Alicia Brechu por el tiempo otorgado para leer el escrito, las revisiones realizadas a mi trabajo y los puntos de vista bien acertados, así como por su paciencia y sus sugerencias para mejorar el escrito.

Al Doctor Félix Morales por las revisiones realizadas al trabajo y por la ayuda incondicional que siempre tuve de su parte, por sacarme de mis mil dudas que siempre me surgían y no había persona que me las explicara mejor, por ser mi amigo.

A la Doctora Lílana Córdova por ayudarme en las revisiones, a hacer y sobre todo enseñarme estadística con palitos y bolitas en los programas, por las explicaciones a mis dudas que siempre surgían y siempre tenía las palabras correctas para explicarlas, por el tiempo que convivimos y por ser mi amiga.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios por ponerme en el lugar y tiempo acertado en esta vida.

A mi hermosa y gran motivación: mi mamá mi Meme adorada, gracias infinitas por cada una de las cosas realizadas, por los consejos, los regaños, las risas, por todo el empeño que siempre me dabas para no desistir, gracias por estar siempre presente en cada caída y en cada éxito que he tenido, por pavonearte (jaja) siempre que hablas de mí, por ser mi motor que siempre tiene fuerzas de seguir cuando yo las he perdido, gracias por enseñarme que se debe de escalar y no quedarse en el montón, por confiar en mí y dejarme estudiar lo que quería, porque aunque los demás me dijeran que moriría de hambre tu siempre seguías y sigues confiando en mí, por levantarme y saltar conmigo los obstáculos que siempre creo que son difíciles, por ser mi amiga y confidente, por amarme con tantas ganas y siempre estar echándome porras, te admiro mamá y te agradezco tanto porque lo mereces, porque solo tu supiste saber armarme de esta forma para ser lo que soy, sin ti esta estructura de tu hija no sería la misma. Porque todo lo que soy te lo debo a ti, y porque hoy puedo decirte lo logramos mamá, te amo más allá del infinito Meme.

A mis abuelos (Pachita y Meli) por quererme tanto, por el amor incondicional, por consentirme de la forma más amorosa e increíble y por preocuparse siempre de mi vida, en especial a mi adorada abuela, que sin ella no sería la persona que soy hoy en día, por esa manera tan hermosa de querer a tus nietos, por cuidarme tantos años, por llevarme siempre contigo al pueblo y a donde fueras, por ser la segunda mamá que toda persona desearía tener te amo con toda mi fuerza y te extraño aun mas, aunque se de sobra que siempre me acompañas y estas a mi lado, gracias por ser parte de este gran éxito culminado.

A mi prima Lary por ser la hermana que siempre, supongo quise tener, por no dejarme sentir hija única, por enseñarme tantas cosas, por divertirme conmigo como yo contigo, por esas risas y esos enojos que siempre se tienen y que aun así nuestro amor es más grande que podemos superarlos, por enseñarme que si quieres puedes superarte, solo es cuestión de ponerse las pilas.

A Rulo por quererme tanto desde chiquita y soportar mis travesuras, además de defenderme siempre, te quiero Rulo

A Marito, mi tía preferida, por cuidar y amarme como a tu propia hija y por consentirme siempre, te quiero mucho Ruquita querida, gracias.

A mis amados sobrinos: Jorge y Raúl, por siempre hacerme reír de sus cosas e incluso enojarme tanto, pero también sentirme orgullosa de sus logros, por dejarme amarlos tanto y regañarlos cuando es pertinente, simplemente por estar en mi vida. Los amo con toda mi fuerza.

A Uqbar y Thiago, porque quizá si no hubiera estudiado la carrera más hermosa nunca hubieran llegado a mí. Por ser los que siempre me reciben con tantas ganas de verme, porque son los que me enseñan que la vida es divertirse con cosas simples, los amo con todo mi corazón y sé que su amor siempre será incondicional.

A Ximena Ríos, mi psicóloga favorita, gracias por aguantar mi estrés todo este tiempo, por estar presente todos estos años y durante el proceso de la tesis, por entender que no solo era entrar al laboratorio y quedarme, sabías que era mucho más que eso y también gracias por estar conmigo en las buenas y malas situaciones, en mis días alegres y en los tristes también, en los exitosos y en los no tanto, por hacerme una integrante más de tu familia que me quieren tanto como yo a ellos, te adoro y te quiero siempre en mi vida.

A Brunei, amiga gracias por las risas imparables, por compartir las mejores prácticas de campo que una bióloga puede tener, por entrar en mi locura, por nuestras aventuras tan locas, por la gran imaginación que de repente brotaba en nuestro cerebro para idear planes para entrar al panteón a sacarnos fotos (jajaja), jamás olvidare nuestros planes de estudio que quizá no los seguimos pero al final pudimos con las materias y con la carrera, por fin podemos decir que estamos tituladas, te adoro amiga y siempre lo hare (KarBru).

A Gabriela Castañeda, Gab Gab Gaaaab 🎵🎵, gracias por ser parte de esta etapa tan maravillosa que viví, por ser mi amiga que así como puede ser mi paño de lágrimas puede ser también mi amiga de pachangas, porque contigo aprendí muchas cosas, desde tener una amistad padrísima, donde hay factores sorpresa (jaja) hasta saber lo que se siente no llegar a tu casa

pero saber divertirse(jaja), te adoro güera y quiero seguir divirtiéndome muchos años mas contigo y gritando en las pachangas: abajo, abajo más abajo (jaja).

A Cipa, mi amiga, que por azares del destino conocí y que por los mismos supimos formar una bonita amistad, porque contigo desahogo mis penas pero también río y reflexiono de ellas, porque la confianza que nos tuvimos desde el principio fue difícil que la tuviera con alguien más, porque de ella siempre tengo palabras sabias y las pongo en práctica.

A Kenya Ricart y Sandra Zedillo, por ser mis amigas las escandalosas, con sus risas que se escuchan a kilómetros, por la alegría que siempre me contagian, por esas buenas pláticas que nos echábamos ya fuera en la fac o en el transporte colectivo pero que disfrutaba mucho y porque a pesar de que nuestras vidas cambian, sabemos que siempre estamos las unas para las otras, las adoro con todo mi corazón.

A Bruno Montoya por las miles de cosas que vivimos juntos, por las pláticas larguísimas que de repente nos impedían entrar a clase pero que no era intencional, simplemente el tiempo se nos iba volando que ni cuenta nos dábamos, porque aprendí mucho de él y porque los grandes amigos se quedan siempre a tu lado.

A uva (Guadalupe Roldán) porque un semestre juntas nos sirvió para formar una bonita amistad y sabernos querer a nuestra manera.

A Pablo Colunga, cocotito simple y sencillamente porque siempre estas presente, porque aunque no nos frecuentemos se que en el momento que te necesite llegaras, por ser mi amigo, te quiero.

A Andreita, Anita, Frida, Eri y Christian por ir a pachangear con ustedes y divertirnos juntos, o irnos de práctica o a tomar café, de alguna u otra forma conviví con ustedes y lo disfrute.

A mis amigos del laboratorio Ely, Gabby, Vianey, Karen, Edgar y Mora, por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia agradable, por aguantar mis aullidos cuando cantaba alegremente sin parar, por las risas y por las buenas pachangas que organizábamos en el laboratorio para celebrar acontecimientos importantes, y por dejarme saber y conocer que se siente trabajar con tanto químico. En especial a Vale por esas caminatas

inmensas donde platicábamos sobre la vida pero claro sin dejar aparte las pláticas científicas sobre nuestros experimentos (jaja), por cantar conmigo aunque se fuera la luz, por bailar, aunque solo movieras un brazo (jaja) por esas risas y metros cuadrados que a veces nos sorprendían (jaja), porque tu descubriste que si me presionan hago las cosas y por muchas cosas más; a Oscar por que fue el que me hizo ya no sentirme la única bióloga en el laboratorio, por quererme tanto y mas por demostrármelo, por tener buen sentido del humor y disfrutar de lo inventado (jaja) y por ser el amigo que siempre quiero tener a mi lado .

A Karina y Felix porque aunque me dejaron sola, fueron parte de este trabajo, porque así me pude dar cuenta de lo grande que puedo llegar a ser, Karinucha gracias por toda la ayuda cuando llegue al laboratorio y por tu amistad incondicional, aprendiz de ti soy y “riete de la vida”; Felix el final de los experimento son gracias a tu ayuda, no sé que hubiera sido de mí con las ciclodextrinas si no hubieras estado, el éxito se multiplica por cada ayuda tuya.

A Lilitiana Santos, chamacaaaaa, como olvidar tu gran ayuda en la fluorescencia de la clorofila, justo fuiste un gran pilar para esto de los cloroplastos y por lo tanto para el escrito, gracias por tu amistad y por el tiempo compartido y “levanta los brazos mujer...” (jajaja).

A mis amigos del trabajo, Ely, Beto, Karo y Charlie, que sin duda hacían de mis fines de semana los más divertidos, por que llegar al trabajo era sinónimo de diversión, risas y demás, por la bonita amistad que formamos.

A las hermosas personas que aunque ya no están presentes, están en mi mente y corazón y sé que las tengo a lado mío y que aunque no lo lean, formaron parte de mi vida: Coco y Nachito, gracias infinitas por el tiempo regalado, por aguantar mis travesuras y por entrar en mi mundo fantástico de diversiones, gracias por quererme tanto como la nieta que siempre quisieron. Samo gracias por la motivación siempre, por estar en mi hermosos años de la carrera, por aconsejarme y preguntar, estoy infinitamente agradecida, porque solo tu y yo sabíamos querernos a nuestra manera.

A mis profesores que fueron parte de mi formación como bióloga,

“Por mi raza hablara el espíritu”

Índice

Lista de Abreviaturas	1
RESUMEN	3
1 INTRODUCCIÓN	4
2 ANTECEDENTES	6
2.1 <i>Capsicum annuum</i> L.....	6
2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	6
2.1.2 Descripción	6
2.1.3 Usos	8
2.1.4 Compuestos identificados	8
2.2 Capsaicinoides.....	9
2.2.1 Capsaicina	11
2.3 Ácidos grasos.....	11
2.3.1 Ácido heptadecanoico	12
2.3.2 Ácido tridecanoico.....	13
2.4 Malezas y métodos de control.....	13
2.5 Herbicidas.....	15
2.6 Adyuvantes.....	17
2.7 Metabolitos secundarios de las plantas.....	19
2.8 Alelopatía.....	19
2.9 Efectos alelopáticos de <i>Capsicum annuum</i> L. sobre otras plantas.	20
2.10 Cloroplasto	21
2.11 Fotosíntesis.....	22
2.11.1 Clorofilas	24
2.11.2 Fotosistemas	25

2.11.3	Procesos de la fase luminosa de la fotosíntesis.	25
2.11.3.1	Fotólisis del agua o división del agua para producir oxígeno.	26
2.11.3.2.	Síntesis de poder reductor (NADPH).	26
2.11.3.3.	Síntesis de ATP o fotofosforilación.	27
2.11.4	Reacción de Hill	27
2.11.5	Desacoplantes.....	28
2.12	Fluorescencia de la clorofila a	29
3	Hipótesis.....	32
4	Objetivos	33
4.1	General	33
4.2	Particulares.....	33
5	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	34
5.1	Preparación de los compuestos evaluados.....	34
5.2	Ensayos de germinación y crecimiento de raíz y tallo.	34
5.3	Aislamiento de cloroplastos de hojas de espinaca (<i>Spinacea oleraceae</i> L.) y cuantificación de clorofila.	35
5.4	Medición de la velocidad del transporte de electrones fotosintético no cíclico. ...	36
5.5	Medición de la velocidad del transporte de electrones del Fotosistema II y I	37
5.6	Medición de las reacciones parciales de los Fotosistemas II.....	37
5.7	Efecto de los compuestos ensayados en la fluorescencia de la clorofila a en cloroplastos aislados de hojas de espinacas.....	39
5.8	Medición de la actividad ATPasa en cloroplastos aislados de hojas de espinacas (<i>Spinacea oleraceae</i> L.)	39
5.9	Medición in vivo de los compuestos evaluados sobre la fluorescencia de la clorofila a en hojas de dos plantas modelo (<i>Lactuca sativa</i> y <i>Lolium perenne</i>).	40
5.9.1	Preparación de los compuestos con ciclodextrinas.	40
5.9.2	Medición de la fluorescencia de la clorofila a.....	42

5.10	Biomasa seca.....	42
6	RESULTADOS Y DISCUSION.....	44
6.1	Efecto pre-emergente de los compuestos ensayados sobre la germinación y crecimiento de plántulas de <i>Lactuca sativa</i>	44
6.1.1	Efecto pre-emergente de los compuestos sobre la germinación y crecimiento de plántulas de <i>Lolium perenne</i>	46
6.2	Efecto de la capsaicina y los ácidos tridecanoico y heptadecanoico sobre la cadena transportadora de electrones de las reacciones luminosas de la fotosíntesis... 48	
6.3	Sitios de acción de los compuestos inhibidores de la reacción de Hill. Medición de su efecto sobre los fotosistemas I y II y en sus reacciones parciales.....	49
6.4	Efecto de los ácidos grasos sobre la actividad de la H ⁺ -ATPasa dependiente de la luz en cloroplastos.	52
6.5	Análisis de la fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en cloroplastos tratados con la capsaicina y el ácido tridecanoico.....	53
6.6	Fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en hojas de dos plantas modelo	56
6.6.1	Efecto de los complejos de inclusión de los compuestos con ciclodextrinas (CD's) sobre la fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en plantas de <i>L. sativa</i> . 57	
6.6.2	Efecto de los complejos de inclusión de los compuestos con ciclodextrinas (CD's) sobre la fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en plantas de <i>L.perenne</i>	62
6.7	Biomasa seca.....	66
7	CONCLUSIONES.....	70
8	PERSPECTIVAS.....	71
	Referencias.....	72
	APENDICES.....	84

Lista de Abreviaturas

2h β -CD	(2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina
ADP	adenosin fosfato
ATP	Adenosin trifosfato
CD's	Ciclodextrinas
CF ₀	Parte lipofílica del complejo CF ₁ CF ₀ -ATPasa
CF ₁	Parte hidrofílica del complejo CF ₁ CF ₀ -ATPasa
Chl	Clorofila
Chl a	Clorofila a
CPO	Complejo productor de oxígeno
Cyt b6/f	Complejo Citocromo b6/f
DBMIB	2,5-Dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCMU	3-(3,4-Dicloro-fenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6-Dicloro fenol indifenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
F	Fluorescencia
F ₀	Fluorescencia inicial
Fd	Ferredoxina

F _m	Fluorescencia máxima
FS I	Fotosistema I
FS II	Fotosistema II
F _v	Fluorescencia variable
Mm	Milimolar
MV	1,1-Dimetil-4,4-bipiridinium dicloro "Metil viologeno"
Mβ-CD	Metil-β-ciclodextrina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
P ₆₈₀	Centro de reacción del FS II
P ₇₀₀	Centro de reacción del FS I
PC	Plastocianina
Pi	Fosfato inorgánico
PQ	Plastoquinona
Q _A	Aceptor de electrones primario del FS II
SiMo	Silicomolibdato de sodio
TRIS	Tris ([hidroximetil] metilamino propano)
β-CD	β- ciclodextrina

RESUMEN

El impacto de los plaguicidas en la salud humana y el ambiente, además de la preocupación por una agricultura no contaminante ha llevado a prohibir o poner restricciones a varios productos químicos, presionando así la búsqueda de herbicidas de origen natural.

En búsqueda de herbicidas de origen natural a partir de metabolitos secundarios aislados de plantas mexicanas, en el presente trabajo se ensayaron los efectos *in vivo* e *in vitro* de dos ácidos grasos (tridecanoico y heptadecanoico) y de la capsaicina identificados en plantas de *Capsicum annuum* en estudios previos en nuestro laboratorio, con el objeto de conocer si afectaban la fotosíntesis y/o la germinación y la elongación de las raíces y los tallos de dos plantas modelo: una dicotiledónea, *Lactuca sativa* (lechuga) y una monocotiledónea, *Lolium perenne* (pasto), y así conocer si estos compuestos de origen natural pueden tener posible actividad herbicida.

Los resultados de los ensayos pre-emergentes mostraron que en plantas de *Lactuca sativa* la capsaicina y el ácido tridecanoico inhibieron mayormente la elongación de tallos y la germinación respectivamente, mientras que el ácido heptadecanoico no presentó un efecto significativo. En cuanto a *Lolium perenne* el compuesto que causó mayor daño fue la capsaicina afectando la elongación de las raíces y la germinación, sin embargo los ácidos grasos, no tuvieron efecto. Al evaluar el efecto de los compuestos sobre el flujo de electrones fotosintético no cíclico en tres diferentes estados (basal, fosforilante y desacoplado) se encontró que estos se comportan tanto como inhibidores de la reacción de Hill y desacoplantes, siendo su efecto sobre el fotosistema II (FS II).

En los ensayos *in vivo* los compuestos no presentaron un efecto significativo en la disminución de la biomasa seca, por lo que no presentan un efecto como herbicidas.

1 INTRODUCCIÓN

Las malezas son aquellas plantas silvestres que interfieren con la actividad humana en las áreas cultivadas o no cultivadas. Ecológicamente se define como malezas a las especies pioneras de una sucesión secundaria, es decir, son plantas muy adaptadas que se establecen sobre las que ya existían y que fueron eliminadas por incendios, enfermedades, talas y cultivos.

Las malezas afectan los cultivos comerciales de manera directa, compitiendo en un espacio biológico por cuatro principales factores: nutrientes del suelo, luz solar, agua y espacio, algunas desarrollan alelopatía reduciendo el crecimiento de los cultivos, ya que algunos de los exudados de sus raíces y/o filtraciones de sus hojas pueden ser tóxicas para las plantas cultivadas. De manera indirecta también hospedan insectos y patógenos dañinos, fortaleciendo la densidad de otros organismos y plagas. Las semillas contaminan la producción reduciendo severamente la calidad del cultivo agrícola incrementando de esta manera los costos (Labrada y Parker, 1994).

Para evitar los problemas antes mencionados es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas, ya que el uso indiscriminado de los pesticidas en la agricultura, como los herbicidas, es un reto, dado que la mayoría de los herbicidas comerciales empleados actualmente han originado biotipos de malezas resistentes a ellos, además de que dañan otros organismos afectando el equilibrio ecológico. La preocupación por una agricultura no contaminante ha llevado a prohibir o poner restricciones a varios productos, presionando así la búsqueda de herbicidas de origen natural (Rojas y Gámez, 2002).

Se han hecho numerosos estudios sobre el efecto inhibitorio que pueden tener ciertos productos alelopáticos sobre algunas especies de malezas, como son los bioherbicidas que son ciertos metabolitos secundarios que poseen un efecto inhibitorio sobre algunas especies de malezas. Dichos metabolitos tienen importantes ventajas con respecto a los herbicidas sintéticos, ya que poseen nuevos modos de acción, alta biodegradabilidad y bajo impacto al ambiente (Rice, 1997).

Además la caracterización química y biológica de compuestos dinámicos novedosos representa una fuente inestimable de estructuras prototipo para el desarrollo de derivados sintéticos y semisintéticos con una actividad biológica selectiva y con una toxicidad reducida (Duke, *et al.*, 2004). El ácido pelargónico ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$), es un ácido monocarboxílico, alifático, de 9 átomos de carbono aislado del gluten de maíz, (Lederer, *et al.*, 2004), es empleado en Japón como un herbicida natural de amplio espectro, se utiliza para el control de malezas anuales, de musgos (*Bryum argenteum*) y briofitas (*Marchantia polymorpha*) (Dayan. *et al.*, 2009). Este ácido se encuentra presente en la mayoría de animales y plantas, es altamente biodegradable, tiene baja toxicidad (Fukuda, *et al.* 2004) y es de bajo impacto ambiental (Dayan. *et al.*, 2009). En Estados Unidos la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), aprobó el ácido pelargónico para ser usado en alimentos, ya que no tiene riesgo para los humanos ni para el ambiente, siempre y cuando sea utilizado de acuerdo a las instrucciones de la etiqueta, y generalmente es utilizado en cultivos orgánicos. Su acción herbicida se debe principalmente a la disgregación de la membrana tilacoidal causada por la peroxidación de los lípidos que la componen por efecto de los radicales originados por la luz al incidir en la clorofila (Lederer, *et al.* 2004).

2 ANTECEDENTES

2.1 *Capsicum annuum* L.

2.1.1 Clasificación Taxonómica

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Solanales

FAMILIA: Solanaceae

GÉNERO: *Capsicum* L., 1753

ESPECIE: *Capsicum annuum* L., 1753



Figura 1. Flor y fruto de *Capsicum annuum*.
Wikipedia, 2014.

2.1.2 Descripción

Las características tanto de las especies cultivadas de *Capsicum annuum* (Fig. 1) como de las silvestres son parecidas entre sí (Correll y Johnston, 1970; Nee, 1986; D'Arcy, 2001; Vibrans, 2005), es una hierba o arbusto (Fig. 2A), que mide entre 50 cm a 4 metros de alto, con el tallo muy ramificado que puede ser de hábito trepador o erecto. Las hojas alternas, ovadas y alargadas, varían en tamaño alcanzando hasta los 10 cm de largo, se pueden encontrar solitarias o en pares en cada nudo. Las flores son solitarias, raramente en pares y se encuentran en la unión del tallo con la hoja (axila). Los pedicelos curvados hacia el ápice, son más largos que las flores. El cáliz es acampanado y con cinco dientes; la corola varía de color, puede ser blanca o verde tenue, en ocasiones amarillentas o violeta con cinco pétalos poco triangulares, unidos en la base formando un tubo corto y

acampanado; cuenta con cinco estambres de anteras grandes unidas levemente entre sí, generalmente son azuladas (Fig. 2B). El fruto varía en cuanto a color, forma y tamaño, es carnoso, con placentación central y de sabor picante, contienen numerosas semillas, circulares, aplanadas y de color pardo-amarillentas (Fig. 2C y D).

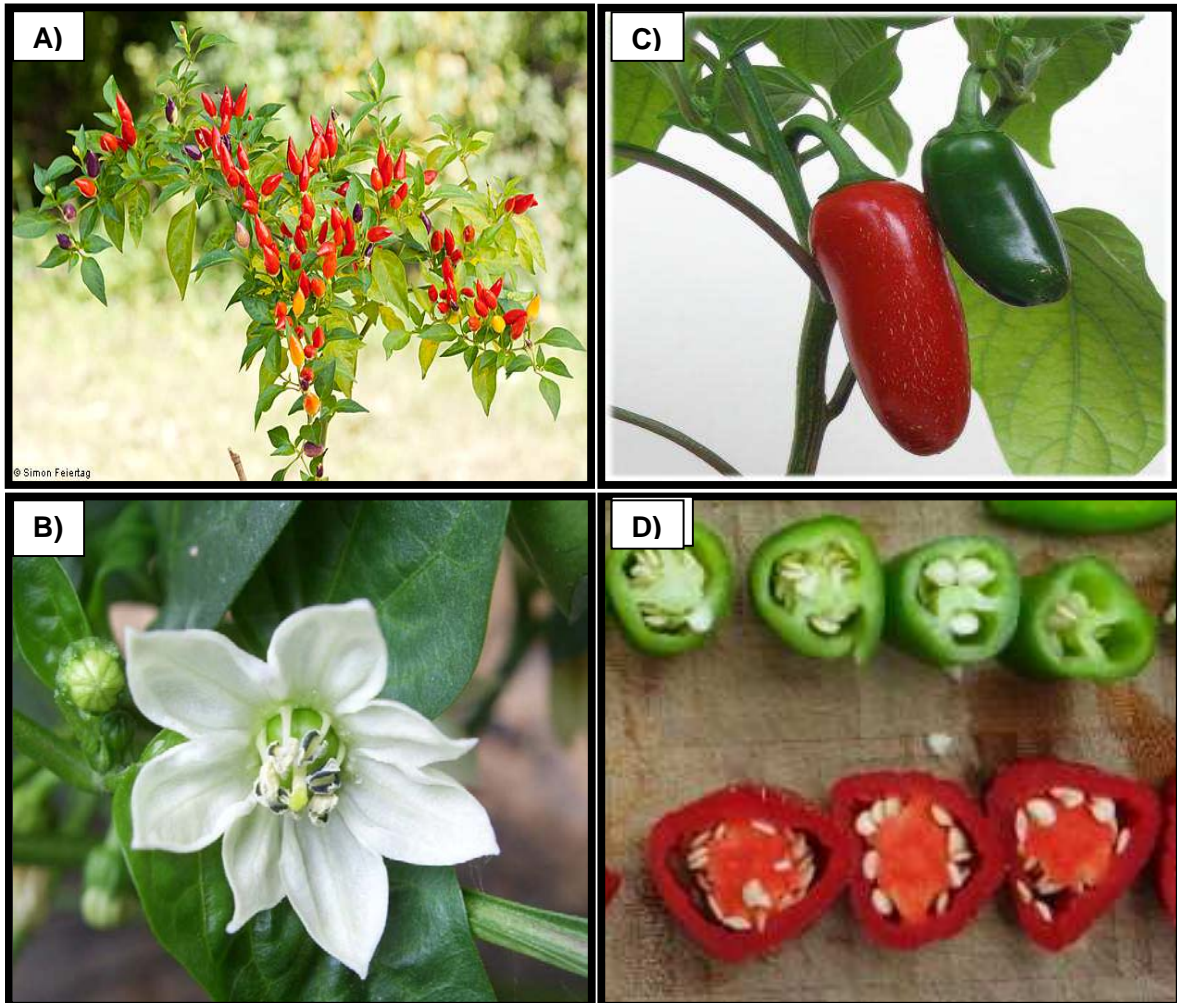


Figura 2. *Capsicum annuum* L. **A)** Arbusto con frutos, **B)** Flor, **C)** Fruto en distintos colores **D)** Placentación con semillas. Fuente: A) etno-botanik.org, 2014; B) Wikipedia, 2014; C) y D) dreamstime.

2.1.3 Usos

En la actualidad *Capsicum annuum* es una de las especies de mayor importancia económica y social en México (Montes, 2010), tiene un gran aprovechamiento ya que es utilizada en diversos sectores, en la cocina mexicana por contener vitaminas A, C, B₆, magnesio, potasio y contiene fibra (López, 2003). Además es utilizado en la industria alimentaria como condimento, en la industria fabricante de pinturas como repelente de caracolillos (Goycoolea, 2012) así como en la medicina contra diversas enfermedades ya que es antiinflamatorio, antioxidante, sirve para la pérdida de peso, previene el cáncer, es analgésico y beneficia el sistema gastrointestinal y cardiovascular por sus efectos farmacológicos y fisiológicos (Luo, *et al.*, 2010).

Dentro de la agricultura, los campesinos lo utilizan como insecticida natural (Waizel, 2011) y como repelente de animales intrusos en los cultivos, como son los coyotes y mapaches y de algunas plagas agrícolas (Moreno, *et al.*, 2012) y en la ganadería contra los mamíferos depredadores.

2.1.4 Compuestos identificados

En esta especie de chile se han encontrado diversos metabolitos secundarios como los que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Metabolitos secundarios encontrados en *Capsicum annuum*, de acuerdo a Waizel y Camacho 2011.

Clasificación	Metabolito	Clasificación	Metabolito
Alcaloides	✓ solanina ✓ solanidina ✓ solasodina ✓ escopelina ✓ capsaicina ✓ eugenol ✓ escopoletina	Volátiles	✓ Limoneno ✓ Linalool ✓ Lupeal ✓ Eugenol ✓ Cariofileno

Ácidos orgánicos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ascórbico ✓ Cafeico ✓ Pecumarico 	Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Capsantina ✓ Capsorubina ✓ Capsantinona ✓ β-caroteno
------------------	--	--------------	---

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio a través de un fraccionamiento biodirigido, del extracto hexánico de las partes aéreas de *C. annuum* se identificaron por primera vez los ácidos grasos de cadena impar (heptadecanoico y tridecanoico), a demás de alcoholes primarios y otras moléculas como tocoferol (vitamina E), fitonadiona (vitamina K) y el alquino 9-eicosino. (Domínguez Hernández, 2012).

2.2 Capsaicinoides

Los capsaicinoides (CAP's) de los géneros de *Capsicum*, es un grupo de amidas ácidas (Vázquez, *et al.*, 2007) biosintetizadas en el tejido de la placenta del chile por la condensación de ácidos grasos de 9 a 11 átomos de carbono (Cázares, *et al.* 2005) y la vanililamina (Luo *et. al.*, 2010), estos son los principales responsables de la pungencia en el fruto.

Se conocen entre 20 y 22 CAP's diferentes, cuya estructura química consiste en un compuesto vaniloide unido mediante un enlace amida a un ácido graso (Fig. 3) (Cazares, *et al.* 2005).

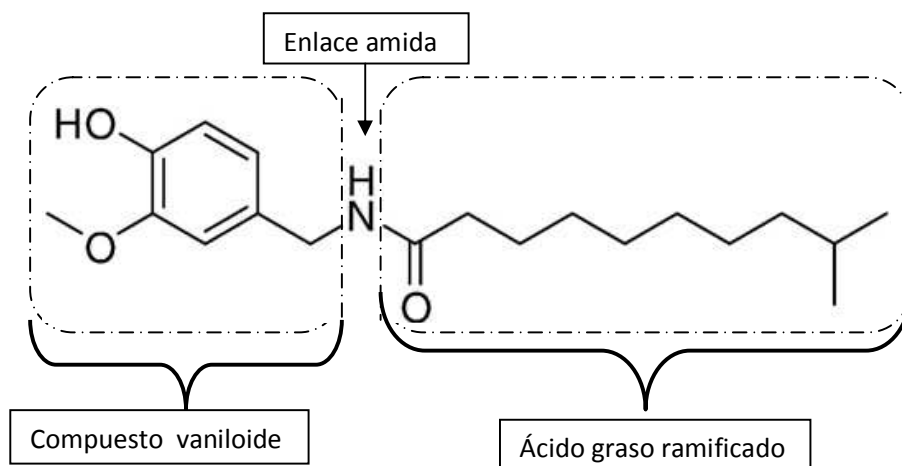


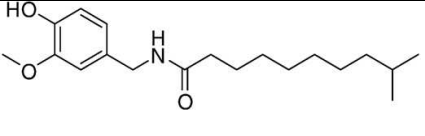
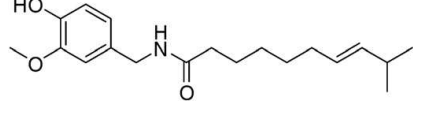
Figura 3. Estructura química general de los capsaicinoides (homodihidrocapsaicina).

Fuente: Luo *et. al.*, 2010.

En la Tabla 2 se muestran las estructuras químicas de los principales CAP's que componen el fruto de *Capsicum annuum*. El grado de picor de las diferentes especies de *Capsicum* varía de acuerdo a la capacidad de acumular CAP's.

Tabla 2. Principales capsaicinoides que componen el fruto de *Capsicum annuum*, de acuerdo a Luo *et al.*, 2010.

Nombre	Abreviatura	Estructura	% presente en <i>Capsicum</i>
Capsaicina	C		60
Dihidrocapsaicina	DHC		22
Nordihidrocapsaicina	NDHC		7

Homodihidrocapsaicina	HDHC		1
Homocapsaicina	HC		1

2.2.1 Capsaicina

El nombre de capsaicina fue aplicado en 1876 a un compuesto incoloro, aislado de la oleorresina de *Capsicum* y en 1930 fue sintetizada por primera vez por E. Spath y F.S. Darling (Peralta, 2007).

La capsaicina ó *trans*-8-metil-*n*-vanilil-6-nonamida (C₁₈H₂₇NO₃) es una amida derivada de vanillilamina y ácido 8-metil-*trans*-non-6-enólico (Ochoa y Salgado, 1992; Kato y Tanaka, 2003; Siddiqui y Zaman, 2005). Es poco soluble en agua, pero muy soluble en alcohol, grasas, y aceites (Peralta, 2007).

Dewitt *et al.* (2000) mencionan que la capsaicina ha demostrado ser antibacteriale e incluso fungicida.

2.3 Ácidos grasos

Los ácidos grasos o ácidos carboxílicos son componentes importantes de los lípidos en plantas, animales y microorganismos, generalmente consisten de una cadena hidrocarbonada lineal de átomos de carbono y en un extremo de la cadena un grupo funcional carboxilo (-COOH) (Fig. 4) que es el que le confiere las propiedades de ácido. Los ácidos grasos generalmente tienen un número par de átomos de carbono, pero también existen de número impar. Se conocen aproximadamente 70 ácidos grasos que se clasifican en dos grupos: saturados e insaturados

a) Saturados

Son ácidos grasos que sólo tienen enlaces simples entre los átomos de carbono, la mayoría son sólidos a temperatura ambiente. La fórmula básica que tienen es: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$. Los ácidos grasos saturados más comunes son los de 14 (mirístico), 16 (palmítico) y 18 (esteárico) átomos de carbono. Por su estructura, estos ácidos son sustancias extremadamente estables desde el punto de vista químico.

b) Insaturados

Los ácidos grasos insaturados tienen una monoinsaturación o varios enlaces dobles en su cadena (poliinsaturados), entre más enlaces dobles presente más reactivo será el ácido. En general los dobles enlaces tienen configuración *cis*, las insaturaciones presentan codos con cambios de dirección en la estructura del ácido insaturado de aproximadamente 30° en los lugares donde aparece un doble enlace y generalmente se encuentran en forma líquida a temperatura ambiente.

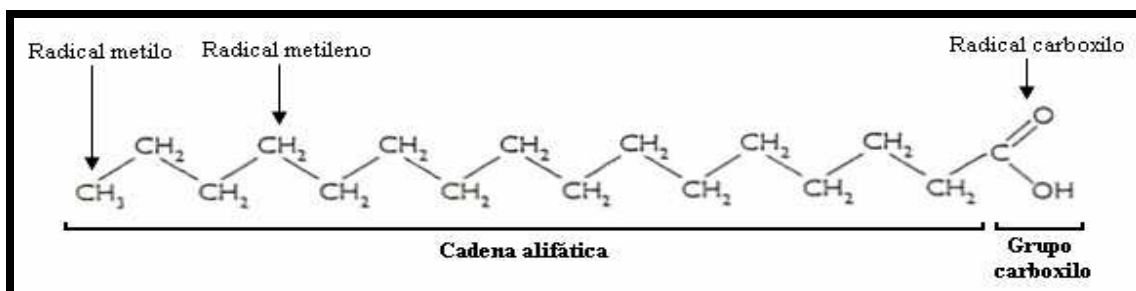


Figura 4. Ejemplo de un ácido graso, con las partes que lo componen. Fuente: Lípidos en: <http://lores2bach.weebly.com/aacutecidos-grasos.html>

2.3.1 Ácido heptadecanoico

El ácido heptadecanoico o ácido margárico es un ácido graso saturado cuya fórmula molecular es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$. Este ácido se encuentra presente como un componente traza de la grasa de la leche de los rumiantes (Hansen, *et al.*, 1957) y en diversos aceites y grasas (Badui, 1994) en cantidades bajas. Sin embargo también se ha encontrado en raíces, tallos, retoños y semillas de *Salicornia bigelovii* (Weete, *et al.*, 1970; Domínguez Hernández, 2012). En años recientes se ha encontrado en cantidades bajas en el aceite esencial de hojas de

Chansmanthera dependens, la cual es una planta utilizada en tratamientos de diversas enfermedades (Ogunlesi, *et al.*, 2010; Domínguez Hernández, 2010).

2.3.2 Ácido tridecanoico

El ácido tridecanoico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$) es un ácido graso saturado que tiene 13 átomos de carbono y se encuentra en los productos lácteos a bajas concentraciones (0.1%) como componente en la grasa butírica (Kuang, 1992), Mirsa y colaboradores (1987) lo reportaron en hojas de mangle. Además, este ácido junto con el heptadecanoico tienen actividad antioxidante, presentando mayor actividad el ácido tridecanoico (Henry, *et al.*, 2002).

En 2008 un grupo de investigadores dirigido por Liu menciona que en extractos de *Excoecaria agallocha*, el ácido tridecanoico junto con el palmítico, linoléico, mirístico, láurico, heptadecanoico, linoléico, pentadecanoico y esteárico presentaron actividad antibacteriana y antifúngica.

2.4 Malezas y métodos de control

Las malezas o malas hierbas, son especies de plantas silvestres que crecen en un determinado lugar y tiempo donde no son deseadas por el hombre, por lo que llegan a ser perjudiciales (Casanello, 2014) ocasionando daños económicos y sociales al agricultor (Mortimer, 2014)

De acuerdo a Urzúa (2014) las malezas se clasifican en tres tipos:

1. Arvenses: son plantas que crecen de forma espontánea en terrenos cultivados.
2. Ruderales: son aquellas que se desarrollan en áreas perturbadas fuera de los cultivos.
3. Viarias: crecen a orillas de vías de comunicación.

Las plantas arvenses compiten con las especies cultivadas por nutrientes, agua, luz y espacio y generalmente son más resistentes que los cultivos a los factores climáticos adversos como: sequías, lluvias prolongadas, bajas temperaturas,

vientos fuertes y heladas; así como también a factores desfavorables del suelo, como son el pH y el espesor de la tierra y a factores biológicos como el ataque de parásitos (Casanello, 2014). La resistencia a estos factores se debe a que, a lo largo del tiempo, las malezas arvenses han co-evolucionado junto con los cultivos (Urzúa, 2014) desarrollando sistemas de adaptación.

De manera general, las malezas ocasionan una pérdida directa aproximadamente del 10% de la producción agrícola (Mortimer, 2014) y dañan 42% de los cultivos si no son controladas (Arias, 2013).

Existen diferentes métodos para el control de las malezas, en la Tabla 3 se aprecian algunos de ellos.

Tabla 3. Métodos preventivos para el control y/o reducción de malezas (Labrada, *et al.*, 1996).

Método	Característica
Preventivo	Son procedimientos de cuarentena para minimizar la introducción, establecimiento y diseminación de las malezas a nuevas áreas.
Físicos	Arranque manual, con ayuda de herramientas (machete, coa).
Culturales	Se basa en la rotación de cultivos, preparación del terreno, distancia de siembra o plantación, policultivos y manejo del agua.
Basados en el control biológico	Empleo de enemigos naturales específicos (animales o plantas) para el control de distintas especies de maleza.
Basados en el control químico	Se utilizan herbicidas comerciales, que se basan en productos químicos para combatir las malezas.

2.5 Herbicidas

Los herbicidas son sustancias que se usan para inhibir total o parcialmente el crecimiento de las malezas y pueden clasificarse de acuerdo a su método de aplicación, selectividad, tipo de absorción y estructura química (Macías, 2012).

A. Método de aplicación

- **Pre-plantación:** el herbicida es aplicado en el suelo antes de la plantación del cultivo.
- **Pre-emergencia:** Son herbicidas que se aplican después de la siembra, pero antes de que emerja la maleza y el cultivo. Se requiere de un riego para que el herbicida entre en los primeros 5 cm de profundidad del suelo, que es donde germinan las semillas de las malezas, eliminándolas cuando comienza su germinación, evitando así la competencia con el cultivo.
- **Emergencia:** El herbicida se asperja cuando se encuentran brotando las plántulas del suelo.
- **Post-emergencia:** se aplica durante el crecimiento del cultivo y la maleza. Regularmente es un método más económico para el agricultor, ya que solo se aplican en la maleza, no en el cultivo.

B. Selectividad

- **Herbicidas selectivos:** son aquellos que al aplicarse solo dañan a cierto tipo de malezas sin causar algún efecto significativo a las demás especies que se puedan encontrar cercanas a ellas. Un ejemplo es la atrazina, un herbicida selectivo para las malezas de maíz y sorgo (Macías, 2012).
- **Herbicidas no selectivos:** Dañan cualquier tipo de maleza y por lo mismo deben ser utilizados con precaución, porque pueden terminar con el cultivo también. El glifosato es un tipo de herbicida no selectivo (Caseley, 1996; Macías, 2012).

C. Por su tipo de absorción

- **De contacto:** Destruyen el tejido de la planta al contacto, observándose a simple vista una necrosis o clorosis, actúan rápidamente y son menos efectivos en plantas perennes, ya que éstas se regeneran desde la raíz o desde los tallos
- **Sistemáticos:** son herbicidas translocados a través de la planta, aún si son aplicados en las hojas, en las raíces o en el suelo, no solo afectan al primer cultivo, sino que también tienen efectos en cultivos posteriores.

D. Mecanismo de acción

- **Inhibidores de la enzima Acetil coenzima A carboxilasa (ACCase),** un ejemplo es el clodinafop que es selectivo para plantas monocotiledoneas (Dayan, 2010).
- **Inhibidores de la enzima Acetolactato sintasa (ALS)** de la síntesis de aminoácidos ramificados (valina, leucina, e isoleucina). Ejem: Sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil oxi-benzoatos, y sulfonil aminocarbonil triazolinonas.
- **Inhibidores de la enzima Enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintasa (EPSPS)** de la ruta del ácido shiquímico que cataliza la reacción entre shiquimato-3-fosfato (S3P) y la (PEP) para producir 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato (EPSP) y Pi, en la síntesis de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina). Glifosato es un inhibidor sistémico de EPSPS.
- **Auxinas sintéticas** mimetizan a la hormona de la planta, presentando diferentes sitios de acción en la membrana celular y son efectivos en el control de plantas dicotiledóneas como el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenilacético) (Dayan, 2010).

La mayoría de los herbicidas, ejercen su efecto a través de la inhibición del transporte de electrones fotosintético, específicamente en el lado reductor del fotosistema II, inactivando o eliminando a algunos de los intermediarios del transporte de electrones en la región donadora de este sistema. Otros herbicidas

inhiben la fotofosforilación (síntesis de ATP), o pueden actuar como desacoplantes y aceptores de electrones (Moreland, 1980; Corbett, 1984; Sánchez, 2011).

En la siguiente Tabla 4 se muestran algunos herbicidas sintéticos y su sitio de acción.

Tabla 4. Herbicidas y sitio de acción que dañan.

Compuesto	Sitio de acción
Triazinas de azufre	Fotosistema II (Esser <i>et al.</i> , 1975).
Diquat y Paraquat (MV)	Fotosistema I (Calderback <i>et al.</i> , 1976).
Glifosfato	EPSP sintasa (Franz <i>et al.</i> , 1997)
Sulfonil ureas	Acetolactato sintasa (Beyer <i>et al.</i> , 1998).
Ariloxifenoxipropianatos	Acetil-CoA carboxilasa (Cobb <i>et al.</i> , 2000).
Atrazina	Oxidación de agua (Campell <i>et al.</i> , 2004).
Diuron	Transferencia de electrones a plastoquinona (Campell <i>et al.</i> , 2004)

2.6 Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias químicas que se agregan a las mezclas de aspersión de plaguicidas para mejorar la actividad o desempeño del plaguicida y minimizar o eliminar los problemas de aplicación, modificando las características físicas de la mezcla de aspersión (Chaco, 2012).

En los últimos años las compañías de fabricantes de agroquímicos, han utilizado la tecnología de los adyuvantes por tener una amplia aplicación en el área agroquímica, ya que reducen o eliminan muchos de los problemas en la aplicación de plaguicidas. Se necesita de la combinación de ellos, es decir, forman complejos de inclusión, resultando en mejoras en sus propiedades químicas y físicas

obteniéndose una mayor solubilidad y biodisponibilidad, un aumento en la estabilidad de los plaguicidas fotodegradables y/o inestables, disminuyen los efectos sobre su degradación, se inhibe su lixiviación en los suelos y reduce la toxicidad de contacto con los seres humanos para que se complementen entre si y puedan multiplicar sus efectos benéficos (Morales 2014).

Las ciclodextrinas (CD's) (Fig. 5) son adyuvantes importantes ya que (1) involucran interacciones entre moléculas, el reconocimiento molecular y la formación de agregados, (2) son productos semi-naturales producidos a partir de un material natural renovable: el almidón, (3) tienen alta solubilidad en agua, la cavidad interna de las CD's es apolar, por lo que son capaces de producir complejos anfitrión-huésped, mediante la inclusión de moléculas hidrófobas (Martínez y Gómez, 2007) y (4) la "encapsulación molecular" es altamente utilizada en productos industriales, tecnológicos y métodos analíticos (Szejtli, 1998). Además son compuestos biodegradables, no tóxicos para los microorganismos y por lo tanto no nocivos para el ambiente (Bardi, *et. al.* 2000; Jiradecha, 2002, Morales, 2014).

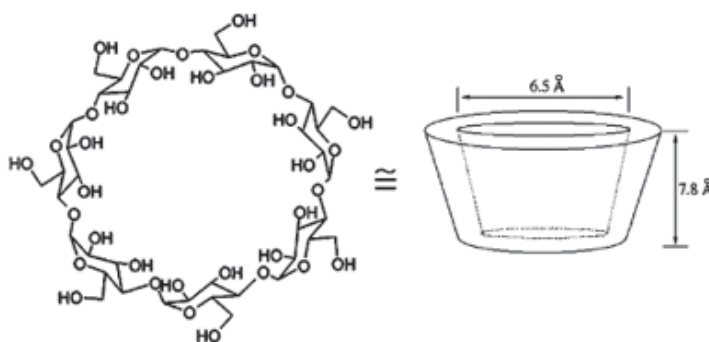


Figura 5. Estructura química y dimensiones aproximadas de la β -ciclodextrina. Fuente: Szejtli, 1998.

En la actualidad, la importancia de las ciclodextrinas se debe al rápido desarrollo de su mercado (Szejtli, 1997; Martínez y Gómez, 2007). Los campos de aplicación de las CD's son diversos, empezando por la industria farmacéutica (Frömring y Szejtli, 1993) donde son mayormente usadas, ya que muchos medicamentos son

poco solubles en agua, su absorción biológica es lenta y poco eficaz, al formar complejos con las ciclodextrinas mejorarán sus propiedades (Martínez y Gómez, 2007) además protegerse de la oxidación. Las CD's también se usan en la industria alimentaria y la cosmética (Walter, 2000; Buschmann y Schollmeyer, 2002), en química analítica, en la separación cromatográfica mediante reconocimiento molecular, incluyendo la diferenciación (Szejtli, 1998). Sin embargo hasta la fecha la aplicación de las ciclodextrinas en formulación de pesticidas es moderada.

2.7 Metabolitos secundarios de las plantas

Los metabolitos secundarios son productos de diferentes rutas biosintéticas, estos no son esenciales para las plantas porque no intervienen en el metabolismo primario, sin embargo los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y el ambiente y juegan un papel importante para defenderse contra patógenos o predadores actuando como agentes alelopáticos, ayudan a la planta a adecuarse a diversos ambientes, a competir e incluso atraer a diversos polinizadores para que dispersen semillas o polen y así tener éxito reproductivo (Raven, 1999).

2.8 Alelopatía

La Alelopatía se encarga del estudio de los procesos que involucran metabolitos secundarios de las plantas, algas, bacterias y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos y de la agricultura (Macias *et al*, 2014). Los metabolitos secundarios afectan a otras especies inhibiendo o interfiriendo en su germinación y/o el crecimiento o desarrollo.

La variedad de metabolitos secundarios liberados al ambiente por una planta, se debe a diferentes tipos de estrés (biótico y abiótico) como son: el ataque de patógenos, los cambios de temperatura, la falta de agua, la radiación solar, entre otros. Estos compuestos son liberados de diferentes formas: por volatilización, lixiviación de las hojas, exudación de las raíces y descomposición de residuos de la planta al suelo (Fig. 6) (Sampietro, 2007).

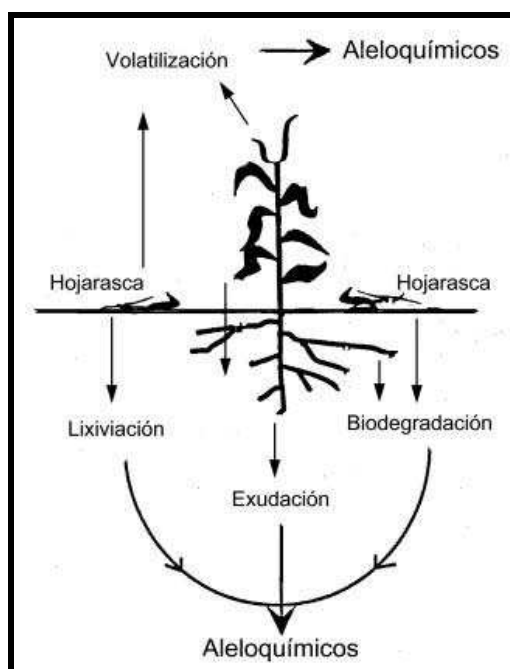


Figura 6. Vías principales para la liberación de metabolitos secundarios al ambiente.

Fuente: Sampietro, 2007.

El reconocimiento de las propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado a estudiar e investigar por varias décadas el desarrollo de la alelopatía, ya que es un buen campo para la búsqueda y la producción de nuevos productos naturales, para el desarrollo de drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas naturales.

2.9 Efectos alelopáticos de *Capsicum annuum* L. sobre otras plantas.

En 2003 Kato y Tanaka, observaron el efecto inhibitorio de la capsaicina sobre la elongación de la raíz y los tallos de seis especies de plantas: alfalfa (*Medicago sativa* L.), berro (*Lepidium sativum* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), digitaria (*Digitaria sanguinalis* L.), timotea (*Phleum pratense* L.) y raygras italiano (*Lolium multiflorum*), destacando su mayor efecto sobre las especies monocotiledóneas comparadas con las dicotiledóneas estudiadas.

Siddiqui y Zaman (2005) observaron que lixiviados de *Capsicum annuum* inhibían la germinación, la elongación de raíz, así como también la acumulación de clorofila en las hojas de *Vigna radiata*. En estudios previos de investigación en el

laboratorio realizados por Domínguez Hernández (2012), de plantas de *Capsicum annuum* de 25 días de crecidas en el invernadero, se encontró que el extracto hexánico de las partes aéreas mostraba efecto desacoplante en la fotosíntesis de cloroplastos aislados de hoja de espinaca. El estudio biodirigido de dicho extracto condujo a la identificación de los ácidos grasos: mirístico (C:14), palmítico (C:16), esteárico (C:18), araquidónico (C:20) heptadecanoico (C-17) y tridecanoico (C-13) así como los alcoholes primarios, tocoferol (vitamina E), fitonadiona (Vitamina K) y alquino 9-eicosano como responsables de dicha actividad.

2.10 Cloroplasto

En las hojas y en los tallos de las plantas superiores se encuentra el parénquima clorofiliano, el cual es un tejido que presenta células con cloroplastos (Monza, *et al.*, 2013).

Los cloroplastos (Fig. 7) son organelos de las células que están rodeados por una doble membrana. En el interior se encuentran vesículas o sacos membranosos aplanados llamados tilacoides, que contienen los pigmentos fotosintéticos, los tilacoides se encuentran agrupados y reciben el nombre de granas, también se localiza el estroma, en donde hay enzimas que catalizan la fijación del CO₂, moléculas de ADN y ribosomas, así los cloroplastos sintetizan las proteínas requeridas para algunas de sus funciones (Nelson y Coxx, 2009). En el cloroplasto tienen lugar las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis, aunque desde el punto de vista práctico, la hoja es la escala fundamental donde se mantiene la fotosíntesis (Baldocchi, 2004; Gracia, 2014), ya que es la estructura fundamental para soportar los conjuntos de cloroplastos que contienen los pigmentos que captan la luz (Gracia, 2014).

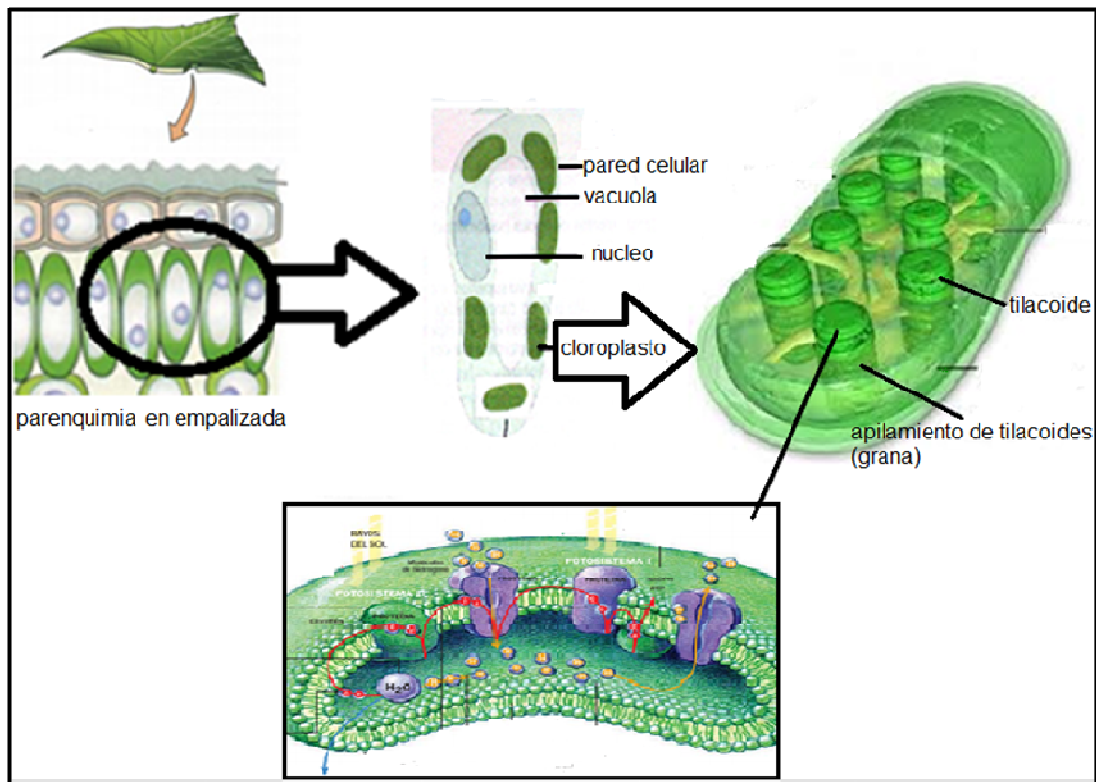


Figura 7. Acercamiento de una de las células del parénquima en empalizada, en donde se aprecia la localización de los cloroplastos, un cloroplasto aumentado mostrando las partes que lo componen y un acercamiento del tilacoide con los pigmentos fotosintéticos.
Fuente: <http://imgsoup.com/1/cloroplastos>

2.11 Fotosíntesis

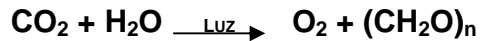
El proceso de la fotosíntesis es importante ya que mantiene a la mayoría de las formas de vida a nivel trófico, además es un mecanismo que sostiene la productividad primaria de todos los ecosistemas (Kozlovsky, 1968; Zavaleta, 2011).

Las plantas, las algas y las cianofitas (bacterias verde-azules), sintetizan materia orgánica a partir de moléculas inorgánicas que encuentren en el ambiente (Karp, 1996), es por ello que son organismos autótrofos.

La fotosíntesis es un proceso metabólico que requiere de energía lumínica y H_2O para sintetizar ATP y NADPH (reacciones luminosas), las cuales son usadas

posteriormente para producir carbohidratos a partir de CO₂, con la liberación simultánea de O₂ a la atmosfera (reacciones en la oscuridad).

La ecuación global de la fotosíntesis es:



Esta ecuación resume una reacción de oxido-reducción en la que el H₂O cede electrones (en forma de hidrógeno) para la reducción del CO₂ a glúcidos (CH₂O)_n, con liberación de O₂.

Como se menciona en el apartado anterior, el cloroplasto es el organelo donde se produce la fotosíntesis, específicamente en las membranas tilacoidales.

El proceso de la fotosíntesis comienza cuando en la membrana tilacoidal la energía de la luz es capturada por los electrones de las moléculas de la clorofila, produciendo una reacción química, a su vez los electrones excitados son transmitidos por medio de acarreadores a la cadena transportadora de electrones.

En este proceso una molécula de H₂O se divide y se libera O₂ a la atmosfera, al mismo tiempo los protones son bombeados hacia el interior de la membrana tilacoidal creando un gradiente de concentración, el cual proporciona la energía necesaria para que la ATP sintetasa fosforile al ADP y produzca ATP.

Los electrones excitados reducen el NADP⁺ a NADPH y la energía almacenada en forma de poder reductor se emplea en la segunda fase de la fotosíntesis.

Los productos (ATP y NADPH) son proporcionados a las vías metabólicas en el estroma en donde son usadas para las reacciones del ciclo de Calvin donde transforman el CO₂ y el H₂O en materia orgánica (Campbell y Farell, 2004).

2.11.1 Clorofilas

En el proceso de la fotosíntesis se utilizan como componentes esenciales de la maquinaria pigmentos fotoreceptores, llamados clorofilas, estos pigmentos son los responsables de la primera etapa en la transformación de la energía de la luz en energía química, además del color verde de las hojas.

La clorofila *a*, es un pigmento verde que se encuentra en plantas, algas y cianobacterias el cual es un elemento central en la fotosíntesis (Govinjee, 2004), y está asociada a proteínas del centro de reacción y a los pigmentos antena del fotosistema I (FS I) y fotosistema II (FS II) (Solarte, *et al.*, 2014), además se encarga de coleccionar fotones (Govinjee, 2004). Las clorofilas (*a* y *b*) absorben en la región roja y azul del espectro visible, respectivamente, la clorofila *a* absorbe a una longitud de onda de entre 600 a 700 nm (Fig. 8). En las plantas superiores, la clorofila *a* es la más abundante.

La clorofila es una molécula compleja, formada por carbono e hidrogeno, en el centro de la molécula se encuentra un átomo de magnesio, rodeado por cuatro anillos pirrólicos y una cadena hidrófoba (fitol) cuya función es mantener la clorofila integrada en la membrana fotosintética (Fig. 9).

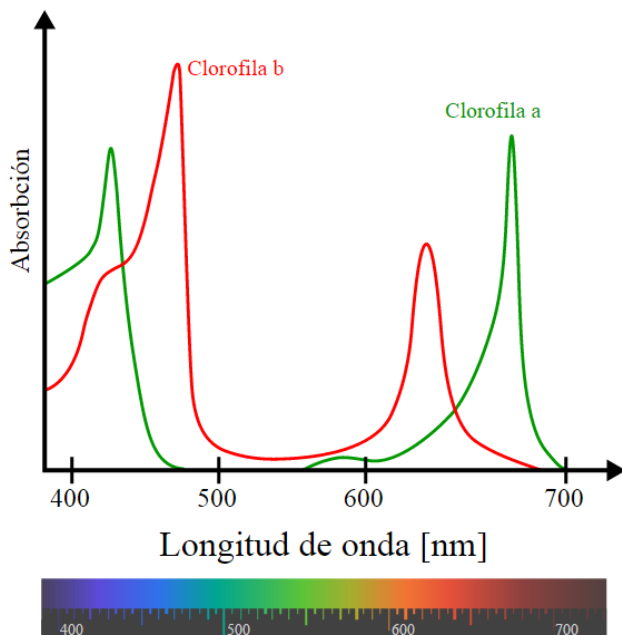


Figura 8. Espectros de absorción de las clorofilas: a y b. Fuente: Chemicals Analysis, 2014.

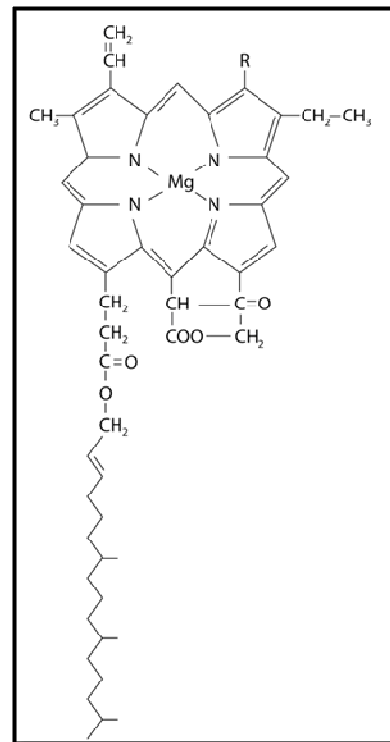


Figura 9. Molécula de la clorofila a. Fuente: Chemicals Analysis, 2014.

2.11.2 Fotosistemas

Son un conjunto de proteínas transmembranales donde se encuentran los pigmentos fotosintéticos, su función es captar la energía luminosa para utilizarla en el transporte de electrones. La longitud de onda a la cual absorbe el centro de reacción del fotosistema II es a 680 nm (P680) y para el centro de reacción del fotosistema I a 700 nm (P700).

2.11.3 Procesos de la fase luminosa de la fotosíntesis.

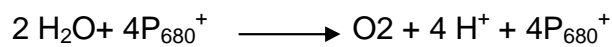
En la cadena transportadora de electrones se encuentran cinco complejos proteicos: FS II, citocromo b6f, FS I, NADPH reductasa y ATP sintasa; además de dos transportadores móviles (PQ y PC), estos complejos son indispensables para

que pueda ocurrir la fase luminosa de la fotosíntesis, la cual consta de tres pasos importantes que a continuación se describen y se ilustran en la Figura 10:

2.11.3.1 Fotólisis del agua o división del agua para producir oxígeno.

La oxidación del agua en el FS II produce oxígeno y constituye la fuente de electrones en la fotosíntesis.

Los electrones liberados por la oxidación del agua son transmitidos a una clorofila especial del FS II llamada P680, el cual se reduce:



Para que esta reacción suceda se necesitan pasos intermedios ya que se requieren cuatro electrones para la oxidación de agua, y P_{680}^+ solo puede aceptar un electrón a la vez; es por ello que varias quinonas que sirven como agentes intermediarios de transferencia de electrones para acomodar los cuatro electrones donados por una molécula de agua.

En el FS II la absorción de luz por la clorofila en el centro de reacción produce una clorofila en estado excitado, la cual transfiere un electrón al aceptor primario, la feofitina (Ph).

2.11.3.2. Síntesis de poder reductor (NADPH).

La excitación por un fotón absorbido por las clorofilas antena asciende los electrones del P_{700} desde un estado basal hasta un estado excitado, P_{700}^* . El fotón es capturado por un aceptor clorofilico A_0 , para formar A_0^- (un potente reductor) y P_{700}^+ captura un electrón de la plastocianina reducida para generar P_{700} . El siguiente aceptor de electrones en la serie es la ferredoxina enlazada, la cual a su vez transfiere su electrón a una molécula de ferredoxina soluble. A su vez la ferredoxina soluble reduce una enzima que contiene ferredoxina-NADP reductasa (FAD). La porción de FAD de la enzima reduce el NADP^+ a NADPH.

El NADPH producido por la oxidación de la ferredoxina se libera al estroma en donde será utilizado para la fijación del CO_2 (reacciones oscuras)

La reacción neta de los fotosistemas en conjunto es el flujo de electrones de agua a NADPH.

2.11.3.3. Síntesis de ATP o fotofosforilación.

Existen varias reacciones que se producen en la cadena transportadora de electrones que generan un gradiente de protones en las células que efectúan la fotosíntesis. Las reacciones descritas anteriormente dan como resultado que el pH del espacio del tilacoide sea inferior al del estroma.

La ATP sintetasa consta de dos partes (CF_1 y CF_0) y es un complejo enzimático en la membrana tilacoidal que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , con formación de agua. Al proceso de síntesis de ATP se le denomina fotofosforilación.

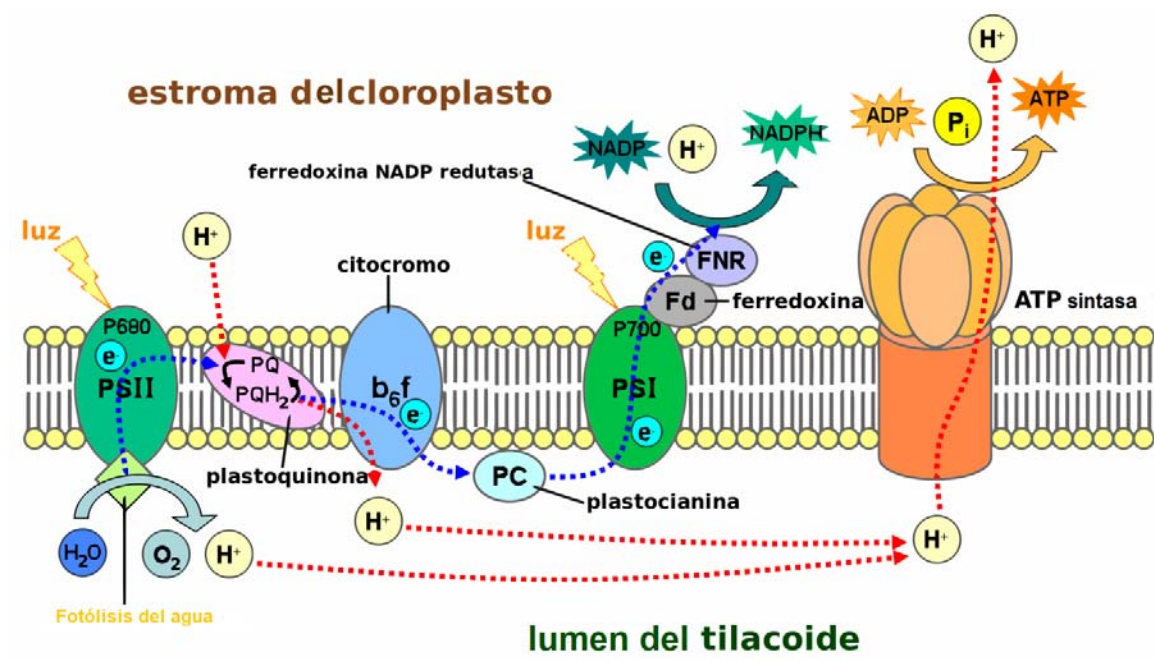


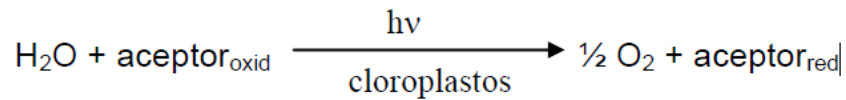
Figura 10. Esquema general de la fase luminosa de la fotosíntesis. Fuente: eltamiz.com

2.11.4 Reacción de Hill

En 1937 Robert Hill descubrió que cuando se iluminan cloroplastos en ausencia de CO_2 y en presencia de un aceptor de electrones artificial como ferricianuro, se

produce O₂ y se reduce el aceptor artificial y además, en la oscuridad no se desprendía O₂, lo cual evidenciaba que la luz hace que los electrones fluyan desde el agua a un aceptor electrónico artificial. En esta reacción se demostró que el CO₂ no participa directamente en la producción de O₂.

La reacción de Hill es la fotoreducción de un aceptor de electrones a expensas de agua.



Los inhibidores de la reacción de Hill son compuestos que afectan una o más enzimas transportadoras de electrones en la cadena fotosintética. El sitio más susceptible para la acción de estos compuestos se encuentra asociado al lado donador o aceptor del FS II (Beker y Percival, 1991; King, 1999). Los compuestos mostrados en la tabla 5 inhiben el transporte de electrones no cíclico y a su vez a la síntesis de ATP, ya que no permiten que se forme un gradiente electroquímico de protones (Beker y Percival, 1991; King, 1999; Morales, 2007) ya sea en presencia o ausencia de ADP y fosforo inorgánico (Pi), o en presencia de NH₄Cl.

Tabla 5. Ejemplos de compuestos inhibidores del transporte de electrones.

Compuestos	Sitio inhibido
Hidroxilamina	Fotólisis del agua
DBMIB	Inhibe la función de la plastoquinona
DCMU	Previene la reoxidación de Q _A

2.11.5 Desacoplantes

La mayoría de los desacoplantes son ácidos débiles, lipofílicos, los cuales en su forma iónica atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones del medio

interno; una vez protonados estos pasan a la parte externa del tilacoide donde liberan el protón mediante disociación (Beker y Percival, 1991).

2.12 Fluorescencia de la clorofila a

En las plantas las moléculas de clorofila *a* asociadas al FS I y FS II son responsables de la fluorescencia, sin embargo la contribución del FS I a la emisión total es mínima en comparación con la del FS II. *In vivo*, la emisión de fluorescencia de los sistemas fotosintéticos cambia continuamente siguiendo su adaptación al ambiente cambiante (González *et al.*, 2008).

La fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones de tipo ultravioleta, rayos catódicos, rayos X y luz visible (Lakowicz, 2006).

El proceso fotosintético se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, en su mayor parte, esta energía absorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por el centro de reacción, donde es utilizada para hacer trabajo químicamente útil, la otra parte es disipada como calor y en menor grado re-emitida como fluorescencia (González *et al.*, 2008).

Un fotón de luz roja (670 nm) contiene suficiente energía para excitar a una molécula de clorofila *a* a su primer estado excitado, llamado singulete. Esta molécula de clorofila excitada libera esta energía y regresa a su estado basal, esto sucede por al menos en 10^{-8} s (Bolhár, 1993, Morales, 2010). Durante este periodo ocurre una separación de cargas con el centro de reacción, lo que comprende el primer paso de la fotosíntesis. Si la separación de carga no se lleva a cabo, la energía absorbida es liberada como calor y/o fluorescencia cuando el electrón excitado regresa al estado basal (Bolhar, 1993).

La curva de inducción de fluorescencia, también llamada curva de *Kautsky* muestra una fase de incremento rápido de la fluorescencia de O a P, “llamada “fase rápida la cual ocurre durante el primer segundo de iluminación y es seguida de una fase lenta de declive de fluorescencia durante varios minutos (Fig. 11) (Bolhar, 1993; González *et al.*, 2008).

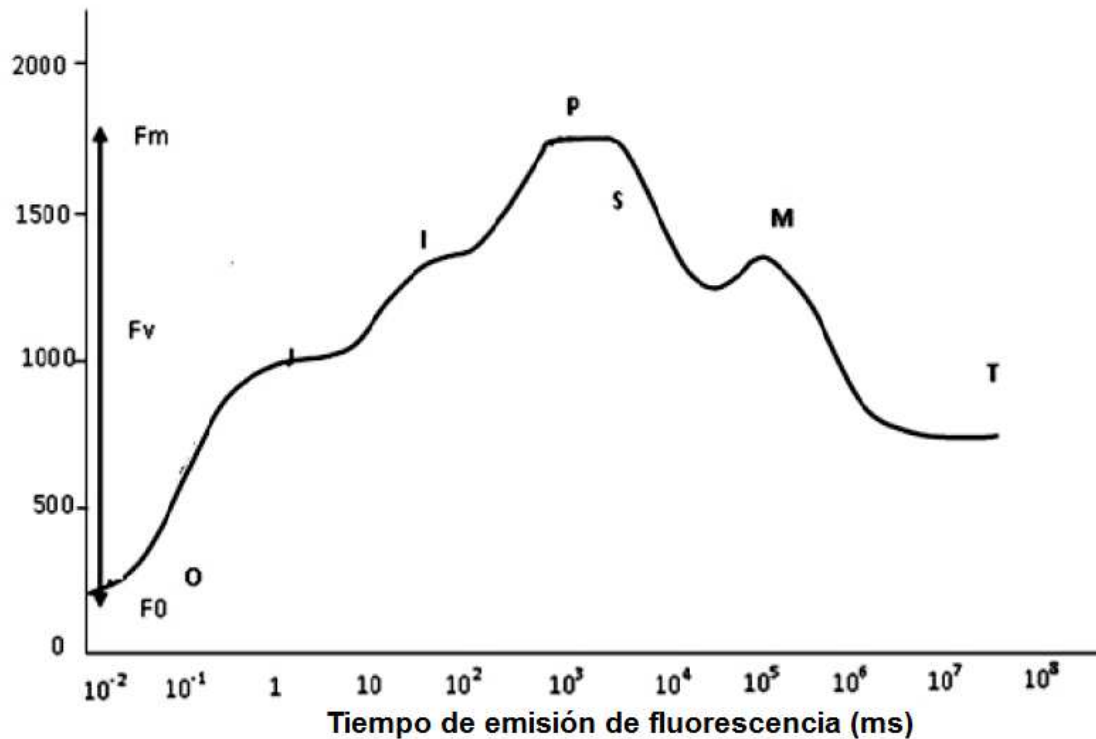


Figura 11. Curva de *Kautsky* de cloroplastos adaptados a la obscuridad y estimulados con un flash de luz roja (670 nm) por 2 segundos, donde se aprecian ambas fases, rápida (O-P) y lenta (S-T). (Modificada de Bolhar-Nordenkampf 1993).

La fase rápida, también llamada O,J,I,P está relacionada con eventos primarios del FS II. La fase lenta (P-S-M-T) está relacionada con interacciones entre procesos de las membranas de los tilacoides y los procesos metabólicos en el estroma del cloroplasto, relacionados con un incremento en la asimilación de CO₂ (González *et al.*, 2008).

En los años noventa se pudo detectar que existían mas bandas en la fase rápida (O-J-I-P), que están presentes en ciertos estados fisiológicos, denominándolos con las letras K, L, H y G (Strasser *et al.*, 1995).

Cada una de las fases esta correlacionada con procesos del flujo energético de la fotosíntesis.

Los cambios en la emisión de la fluorescencia, se utilizan para revelar diferentes tipos de estímulos: mecanismos de respuesta al estrés ambiental e identificación de contaminantes (González *et al.*, 2008).

3 Hipótesis

Si los ácidos grasos (heptadecanoico y tridecanoico) y la capsaicina, obtenidos de *Capsicum annuum* L. inhiben el transporte de electrones fotosintético y/o la germinación, el crecimiento de tallos y raíces de dos plantas modelo (*Lactuca sativa* y *Lolium perenne*) entonces podrán ser utilizados como posibles herbicidas.

4 Objetivos

4.1 General

- Evaluar el efecto herbicida de dos ácidos grasos (tridecanoico y heptadecanoico) y la capsaicina, sobre las reacciones del transporte de electrones fotosintético, la germinación y el crecimiento de *Lactuca sativa* y *Lolium perenne*.

4.2 Particulares

- Determinar el efecto pre-emergente de los compuestos sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *L. sativa* y *L. perenne*.

Evaluar el efecto post-emergente de los compuestos:

- En la fluorescencia de la clorofila *a in vivo* en hojas de plantas (*L. sativa* y *L. perenne*) crecidas en el invernadero.
- En la biomasa seca.
- Sobre la cadena transportadora de electrones en cloroplastos aislados de hojas de espinacas.
- Identificar el sitio de acción de los compuestos, midiendo su efecto en los fotosistemas II y I por separado, así como sus reacciones parciales.
- En la fluorescencia de la clorofila *a in vitro* en cloroplastos.

5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Preparación de los compuestos evaluados.

Los ácidos grasos de cadena impar tridecanoico y heptadecanoico, así como la capsaicina se adquirieron de manera comercial de Sigma-Aldrich.

Los dos ácidos utilizados, se disolvieron en DMSO para preparar una solución stock a una concentración de 20 mM. De igual manera la capsaicina se preparó a 20 mM, con la diferencia de que ésta se disolvió en EtOH.

Para obtener las concentraciones empleadas de los compuestos (25, 50, 100 y 150 μ M), se tomaron alícuotas de las soluciones stock y se agregaron en 10 ml de agua estéril, para los controles, en el caso de los ácidos se empleo DMSO y EtOH para la capsaicina. Para cada concentración y control se ajustó la cantidad de DMSO y EtOH a la misma que se empleó a 150mM.

5.2 Ensayos de germinación y crecimiento de raíz y tallo.

Para determinar el efecto de los compuestos en la germinación y elongación de los tallos y las raíces de las plántulas de *Lactuca sativa* y *Lolium perenne*, se eligieron manualmente 600 semillas de cada especie descartando las dañadas y se colocaron en tubos de ensayo (40 semillas x tubo), posteriormente se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% en agitación constante, al término de este tiempo se enjuagaron con agua esteril tres veces. La siembra se realizó en una campana de flujo laminar marca Veco la cual se limpió con etanol, esto con el fin de tener un ambiente estéril, para evitar la contaminación de las semillas. Posteriormente, las semillas, previamente lavadas se colocaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con papel filtro, después de realizar la siembra, las cajas se colocaron en una cámara de incubación Ambi-Hi-Lo chamber en la oscuridad por un periodo de 11 días en el caso de las semillas de pasto y de 6 días para las de lechuga. El ensayo consistió en 5 tratamientos y cada tratamiento se evaluó por triplicado, para cada uno de los compuestos evaluados.

(4 conc.+ 1 ctrl.)x 3 repeticiones= 15 cajas petri x 40 semillas cada una= 600 semillas desinfectadas

Transcurrido el tiempo, se procedió a medir la longitud del tallo y de la raíz de cada semilla y las semillas germinadas por caja, los resultados se graficaron con el programa Origen 6.0 profesional.

5.3 Aislamiento de cloroplastos de hojas de espinaca (*Spinacea oleraceae* L.) y cuantificación de clorofila.

Nota: el siguiente ensayo se realiza en la obscuridad y a 4° C.

El ensayo para el aislamiento de cloroplastos se realizó con hojas de espinacas, obtenidas de manera comercial, aproximadamente entre 40 y 60 gramos, seleccionando las hojas de buena consistencia, turgentes, frescas, no maltratadas, de color verde fuerte y eliminando las deterioradas: las hojas se lavaron varias veces cuidadosamente en una charola con agua de la llave, quitando los excesos de tierra y evitando que el chorro de agua cayera sobre ellas, para no dañarlas, seguidamente se escurrieron y se colocaron en hojas de papel (sanitas) para quitar el exceso de humedad, se separo la nervadura y el ápice de cada hoja, el resto se corto en trozos pequeños y se colocaron en una licuadora (Modelo L-21, Osterizer), la cual contenía 250 ml de medio de aislamiento de cloroplastos (Apéndice 1), posteriormente se comenzó la molienda, dando pequeños impulsos para no dañar los cloroplastos.

Una vez homogenizadas las hojas se filtraron a través de 8 capas de gasa, con ayuda de un embudo el homogenizado se colocó en tubos para centrífuga, se balancearon los tubos y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C en una centrifuga Universal 320R Hettich Zentrifugen, transcurrido el tiempo se elimino el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en 2 ml del mismo medio, la suspensión de cloroplastos se guardo en baño de hielo a 4° C.

La cuantificación de la clorofila se realizo según el método de Arnon (Arnon, 1949), a matraces aforados de 5 ml se les agrego acetona al 80% y una alícuota de 20 µl de cloroplastos re-suspendidos, se incubaron en la obscuridad y a 4° C por 5 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugaron 5 minutos a 4000 rpm en una centrifuga clínica (Modelo EBA 8S Hettich), con la finalidad de precipitar las proteínas y membranas. Con el sobrenadante se cuantificó la clorofila a dos

longitudes de ondas, 663 y 645 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S Thermo Scientific. El blanco utilizado fue de acetona al 80%. La concentración de clorofila se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

[Chl]= µg de clorofila por µL.

8.05 y 20.29 = constantes establecidas de manera experimental a partir de los coeficientes de extinción para cada longitud de onda.

A= absorbancia leída a las longitudes de onda indicada.

5.4 Medición de la velocidad del transporte de electrones fotosintético no cíclico.

Las reacciones parciales descritas a continuación se muestran en la figura 12.

El flujo de electrones fotosintético no cíclico (A) se monitoreo en presencia de metilviológeno (MV), el cual es un aceptor artificial de electrones del fotosistema I (FS I), para lo cual se utilizo un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro YSI (Yellow Spring Instrumental), Modelo 5300 A.

La medición se realizo en sus tres estados, según los métodos descritos en la literatura (Morales, 2014), que a continuación se detalla:

- I. Transporte de electrones basal: en una cubeta de reacción se colocaron 3 ml de medio de transporte de electrones con MV (Apéndice 1), los compuestos a diferentes concentraciones (25, 50, 100, 150 y 200 µM) y 60 µg de clorofila, para el control no se agrego ninguna concentración del compuesto; la mezcla de reacción se ilumino durante 3 minutos empleando una lámpara de diodos de luz azul y se monitorearon los cambios en el consumo de oxígeno.

- II. Transporte de electrones fosforilante: Se midió empleando el mismo medio del transporte antes descrito más 3 mM de ADP y 3 mM de fosforo inorgánico (Pi) y se procedió a iluminar la cubeta de reacción.
- III. Transporte de electrones desacoplado: para realizar este transporte se utilizaron 3 mL del medio de transporte basal y se adiciono a la cubeta de reacción además de 6 mM de NH₄Cl el cual actúa como desacoplante.

Los compuestos que inhibieron los transportes se les determino el valor de I₅₀, el cual es la concentración a la que inhibe el 50% del transporte.

5.5 Medición de la velocidad del transporte de electrones del Fotosistema II y I

El transporte de electrones desacoplado del FS II (B) se midió polarográficamente de H₂O a DCBQ (Yruela, *et al.*, 1991). En la cubeta de reacción se agregaron 3 ml del medio de transporte para FS II (Apéndice 1) junto con 1 μM de DBMIB, el cual actúa como inhibidor del paso de electrones al FS I y 100 μM de DCBQ, aceptor de electrones artificial.

El flujo de electrones desacoplado del FS I (C), se realizo polarográficamente utilizando 3ml de medio de transporte de electrones para FS I (Apéndice 1) y 10 μM de DCMU (Allen, *et al.*, 1994).

5.6 Medición de las reacciones parciales de los Fotosistemas II.

Las reacciones parciales del FS II se midieron de H₂O a SiMo (D). A la cubeta de reacción se le agregaron 3 ml de medio de transporte de electrones para H₂O-SiMo (Apéndice 1) y 10 μM de DCMU (Hauska y Trebs, 1977).

Para medir la reacción parcial de DPC a DCPIP (E), se realizo la medición con cloroplastos tratados con Tris 0.8 M pH 8.0.

Para tratar los cloroplastos con Tris, se incubaron 300 μg de cloroplastos por mL de disolución de Tris 0.8 M en la obscuridad por 30 minutos a 4 °C, posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm en una centrifuga Universal 320R Hettich Zentrifugen por 1 minuto y se re-suspendieron en medio de aislamiento de

cloroplastos (Apéndice 1) (Ouitrakul e Izawa, 1973), finalmente se cuantifica la clorofila.

En una celda espectrofotométrica de 5 ml se colocaron 3 ml del medio de transporte de electrones sin MV (Apéndice 1) más 6 mM de NH_4Cl , 200 μM de DPC, 100 μM de DCPIP y 45 μg de clorofila y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm, la celda se sacó del espectrofotómetro y se iluminó por 2 minutos con una lámpara IPSA 60Hz-120 leds y se volvió a medir la absorbancia a la misma longitud de onda. El blanco que se utilizó, fue la misma mezcla de reacción solo que sin DCPIP.

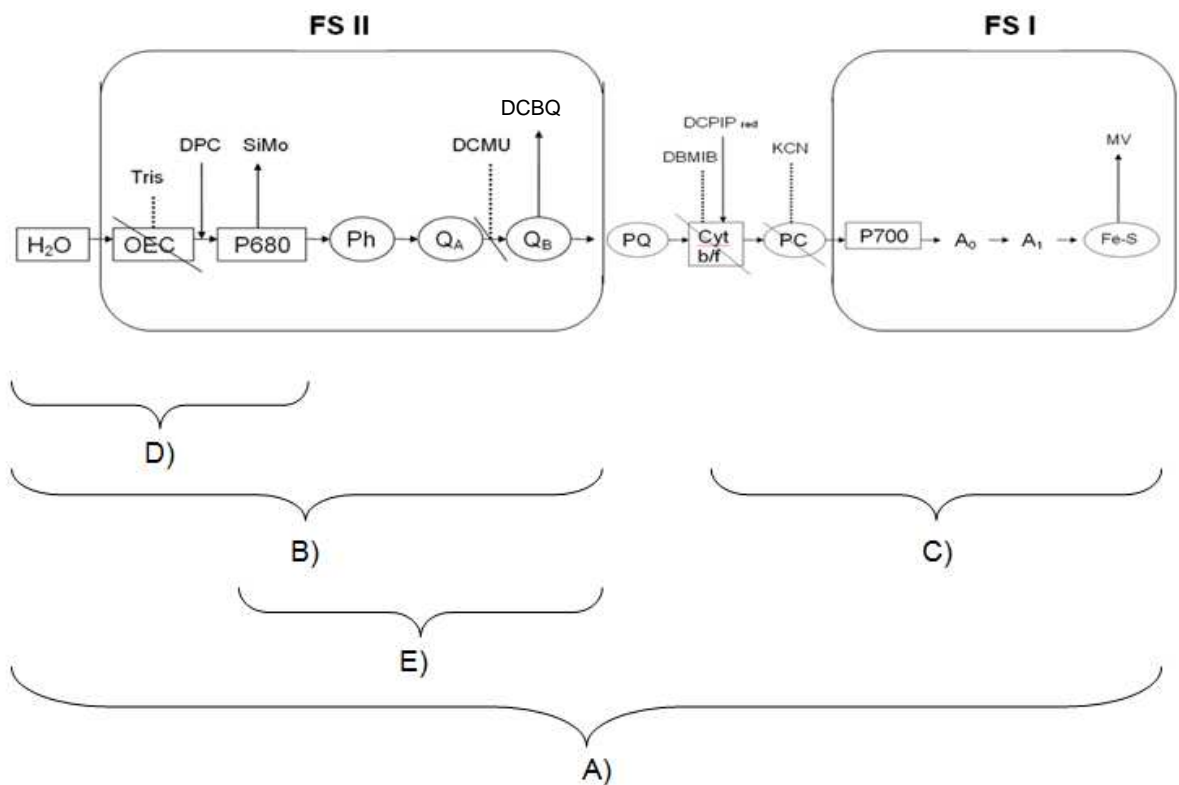


Figura 12. Esquema del transporte de electrones en cloroplastos, mostrando los sitios de inhibición con línea punteada (.....) y los sitios de donación y aceptación de electrones con flechas (→). Las letras indican el segmento evaluado de la cadena transportadora de electrones. Fuente: Morales Flores, 2007.

5.7 Efecto de los compuestos ensayados en la fluorescencia de la clorofila a en cloroplastos aislados de hojas de espinacas.

Para realizar las mediciones se emplearon alícuotas de cloroplastos que contenían 60 µg de clorofila, las cuales se transfirieron sobre pequeños cuadros de papel filtro (1 cm²) con una micropipeta, asegurándose de tener una distribución homogénea. El papel filtro que contenía los cloroplastos se introdujo en tubos de ensayo que contenían 3 ml de medio de transporte sin MV (Apéndice 1) y las diferentes concentraciones de los compuestos ensayados (25, 50 y 100 µM), los tubos con los papeles filtro se incubaron por 5 minutos en la oscuridad. Como control positivo se empleo DMCU (50 µM), un herbicida comercial.

I. Transcurrido el tiempo se midieron las curvas de inducción de la fluorescencia de la clorofila a con la ayuda de un equipo Handy PEA (Plant Efficient Analyzer) marca Hansatech como lo describe Strasser *et al.* (1995), y las curvas de inducción fueron procesadas con el programa Biolyzer HP3.

5.8 Medición de la actividad ATPasa en cloroplastos aislados de hojas de espinacas (*Spinacea oleraceae* L.)

Nota: todo el material utilizado estuvo libre de fosfatos, incluyendo los frascos en donde se almacenaron los medios.

Para realizar la medición de la actividad ATPasa, se aislaron cloroplastos de hojas de espinaca con el procedimiento de Mills y Mitchel (1980). En este caso se utilizó el medio de aislamiento de cloroplastos para ATPasa y el medio de re-suspensión para ATPasa (Apéndice 1).

En tubos de ensayo se agregaron 0.25 mL de medio de activación 1 (Apéndice 1) y 0.65 mL de medio de activación 2 (Apéndice 1) más 300 µg de clorofila, el cual sirvió como control, los otros tubos contenían además los compuestos a concentraciones de 50, 100 y 200 µM, se iluminaron los tubos por 2 minutos y en seguida se tomo de cada tubo una alícuota de 100 µl que se agregaron a otros tubos que contenía 900 µl de medio de hidrolisis de ATP (Apéndice 1). Esta mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 2 minutos, inmediatamente después se agregaron 500 µl de ácido

tricloroacético al 20%, con la finalidad de parar la reacción. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga clínica.

Se tomaron alícuotas de 1.3 ml de la mezcla anterior, evitando tomar la pastilla que quedo abajo, y se colocaron en tubos que contenían 500 µl de H₂O. Posteriormente, a estos tubos se les agregaron molibdato de amonio al 6.6%, ácido sulfúrico 7.5 N, se agitaron con un vortex y en seguida se les adicionaron 200 µl de sulfato de hierro al 10%, nuevamente se agitaron y se dejaron reposar por 20 minutos para el desarrollo del color. La concentración de fosfatos se determinó a 660 nm (Mills-Mitchell, 1980).

5.9 Medición *in vivo* de los compuestos evaluados sobre la fluorescencia de la clorofila a en hojas de dos plantas modelo (*Lactuca sativa* y *Lolium perenne*).

Para el sustrato que se utilizo, se preparó una mezcla de tierra, peat moss y agrolita (50:25:25).

Se pesaron 0.3403 semillas de *L. perenne* (equivalente a 200 semillas en promedio) y 0.1762 de *L. sativa* (equivalentes a 40 semillas en promedio), se colocaron en tubos de ensayo, y se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% con agitación constante durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua desionizada previamente esterilizada, para remover el hipoclorito.

Las semillas desinfectadas se colocaron en el sustrato en macetas de plástico de 12 cm de diámetro a una profundidad no mayor a la equivalente de la altura de la semilla (0.5 cm), las macetas se colocaron en un invernadero a temperatura ambiente (25-30°C) y se regaron tres veces por semana.

5.9.1 Preparación de los compuestos con ciclodextrinas.

Cada uno de los compuestos empleados (tridecanoico, heptadecanoico y capsaicina) se disolvieron en EtOH para tener soluciones stock a concentración 40 mM y el DCMU a 3 mM (control positivo).

Se prepararon independientemente soluciones acuosas de los compuestos con tres diferentes ciclodextrinas: β -ciclodextrina (β CD), metil- β -ciclodextrina (M β CD) y 2-hidroxiopropil- β (HP β) a una concentración 10mM las cuales se diluyeron en agua desionizada (Gines, *et al.*, 1996; Lucas *et al.*, 2008), dichas ciclodextrinas sirvieron como adyuvantes.

Posteriormente se prepararon los complejos de inclusión, en una proporción 1:1, para lo cual se tomaron alícuotas de cada uno de los compuestos para obtener las concentraciones deseadas (150 y 300 μ M) en diferentes soluciones acuosas, que contenían, de manera independientes, alícuotas de cada una de las diferentes ciclodextrinas empleadas, en una solución que contenía Tween 20 (0.05%) para abolir la tensión superficial. Tanto para el control positivo DCMU (50 μ M) como para el control se prepararon tres soluciones acuosas con cada una de las ciclodextrinas de manera independiente y se le agregó Tween 20. Para todas las muestras el volumen de EtOH se ajustó a la cantidad empleada en la máxima concentración. Se ha demostrado que la cantidad de EtOH empleada en el control positivo no tiene un efecto significativo sobre la fluorescencia de la clorofila *a* al ser evaluada en las plantas modelo (Morales Flores, 2014).

Las soluciones preparadas se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente durante 72 horas para favorecer la formación de los complejos de inclusión (Gelb, *et al.*, 1979; Gines, *et al.*, 1996).

Después de 15 días de que las semillas ya habían germinado, se escogieron las macetas a emplear tomando en cuenta que estas fueran de tamaño uniforme y se asperjaron con 10 ml de las disoluciones antes preparadas. Las macetas seleccionadas al azar se agruparon en: control negativo (disolvente EtOH), concentraciones a probar (150 y 300 mM) y control positivo (DCMU, el cual es un herbicida post-emergente de uso comercial) todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.9.2 Medición de la fluorescencia de la clorofila a.

Después de haber asperjado las plantas con los compuestos, se midió la fluorescencia de la clorofila *a* en las hojas de las plantas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas); para lo cual las plantas se adaptaron a la oscuridad por un lapso de 1 hora, a temperatura ambiente, posteriormente fueron irradiadas empleando un aparato Hansatech Handy PEA (plant efficient analyzer) y una pinza especial para hojas la cual permite la adaptación a la oscuridad y define el área de la medición en la hoja (Fig. 13).



Figura 13. Fluorómetro y pinzas para medir la fluorescencia en las hojas. Fuente: Hansatech Instruments.

Las curvas de inducción de la fluorescencia de la clorofila *a* se procesaron de acuerdo a las ecuaciones de prueba de JIP (Arnon, 1949) y se graficaron con ayuda del programa Biolyzer HP3 (Strasser, *et. al.* 2004).

5.10 Biomasa seca

Después de las 72 horas de haber medido la fluorescencia de la clorofila *a*, las plantas permanecieron en el invernadero por 15 días más, pasado este tiempo se procedió con su cosecha, se cortaron las plantas de cada maceta a nivel de suelo, se colocaron en sobres rotulados y se secaron en una estufa Binder a 65°C hasta

peso constante. La biomasa seca fue determinada empleando una balanza analítica OHAUS (Modelo AP-210-0) (González, *et. al.*, 2005).

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Efecto pre-emergente de los compuestos ensayados sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Lactuca sativa*.

Para conocer el efecto de los tres compuestos en la pre-emergencia, se realizaron pruebas de germinación y medición de la elongación de raíces y tallos de semillas de lechuga (*L. sativa*), a diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos (Fig. 14) muestran que la capsaicina afectó mayormente las tres pruebas realizadas, con la concentración más alta (150 μM), ya que inhibió la elongación de los tallos en un 57.7% siendo los más afectado, el crecimiento de las raíces (37.7%) y la germinación de las semillas en un 35.9%.

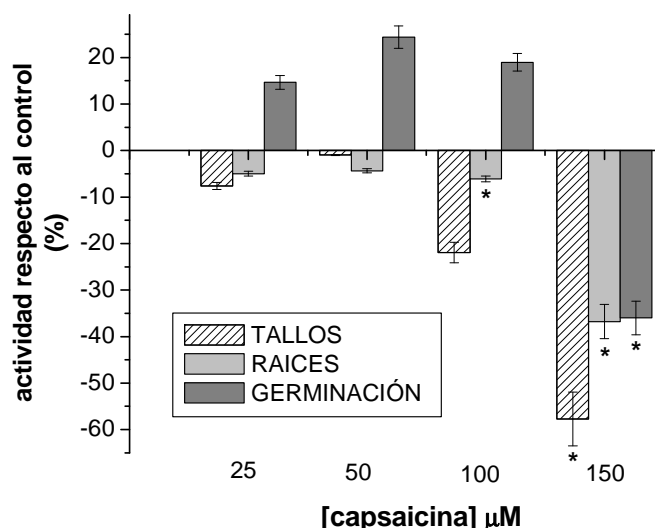


Figura 14. Efecto de la capsaicina en la elongación de tallo y raíces, así como en la germinación de *L. sativa*. Los datos son presentados en porcentajes y el valor del control es 0%. Los valores positivos indican un incremento, mientras que los valores negativos indican inhibición. El asterisco (*) sobre las columnas son valores estadísticamente significativos respecto al control, ANOVA ($p < 0.05$), representan el promedio de tres repeticiones.

El ácido tridecanoico al igual que la capsaicina, afectó mayormente a 150 μM , pero únicamente presentó mayor efecto en la germinación de *L. sativa* inhibiendo 69%, en el caso de la elongación de las raíces fue inhibida ligeramente (19.1%),

mientras que la elongación de los tallos no se afectó (Fig. 15 A), sin embargo estadísticamente los resultados son significativos respecto al control.

El ácido heptadecanoico fue el compuesto que no tuvo un afecto inhibitorio alto en ninguna de las tres actividades evaluadas, como se muestra en la figura 15B, sin embargo estadísticamente afecto en la germinación y en la elongación de raíces con la concentración más alta (150 μM), respecto al control.

Este resultado quizá se deba a que el ácido heptadecanoico tiene un valor de Log P (Tabla 9) que indica que es más lipofílico comparado con los otros dos compuestos evaluados, lo que hace que para las semillas sea más difícil absorberlo.

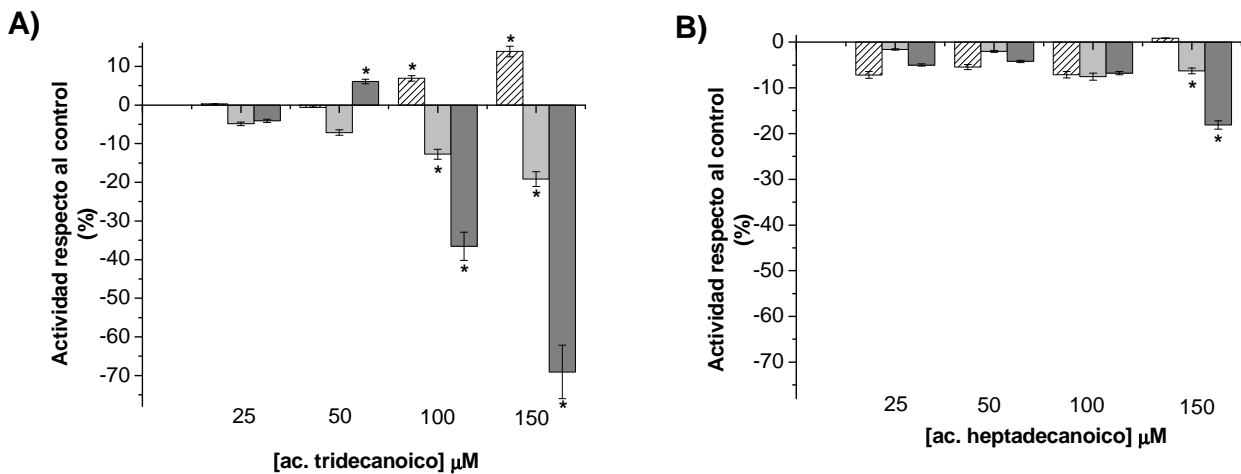


Figura 15. Efecto de los ácidos grasos ensayados a diferentes concentraciones, sobre la elongación de tallos (\square) y raíces (\square), así como en la germinación (\square) de *L. sativa*. Los datos son presentados en porcentajes y el valor del control es 0%. Los valores positivos indican un incremento, mientras que los valores negativos indican inhibición. El asterico (*) sobre las columnas son valores estadísticamente significativos respecto al control, ANOVA ($p < 0.05$), representan el promedio de tres repeticiones.

El hecho de que el porcentaje de los tallos con el ácido tridecanoico y la germinación de semillas con capsaicina hayan aumentado más que el control puede explicarse a partir del fenómeno hormesis, el cual es un proceso en el que

la exposición a una dosis baja de un agente químico o un factor ambiental, que es dañino a dosis altas induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo (Calabrese, *et. al.*, 2007; Mattson, 2008; López, *et. al.*, 2013), es decir es una respuesta adaptativa de las células y de los organismos a un estrés. En donde existe una relación dosis- respuesta.

6.1.1 Efecto pre-emergente de los compuestos sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Lolium perenne*.

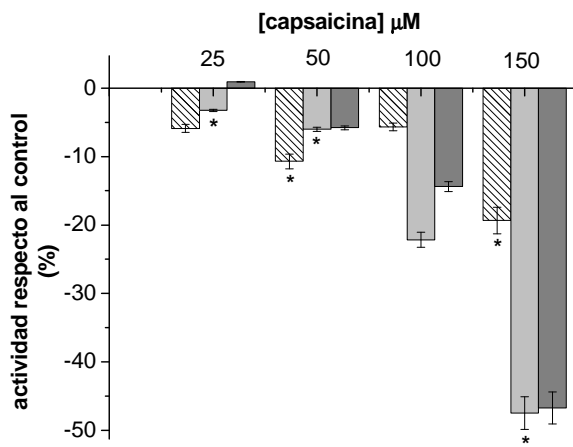
Las concentraciones en este ensayo son las mismas que las usadas con las semillas de *L. sativa*. En la figura 16 se muestra el efecto de los tres compuestos sobre la germinación y crecimiento de los tallos y las raíces.

Los resultados muestran que la capsaicina inhibió mayormente la germinación con un 46.7% y la elongación de las raíces con 47.4%, mientras que en la elongación de los tallos fue ligera la inhibición que presento (18%) en *L. perenne* con la concentración mayor, 150 μ M (Fig. 16A). Sin embargo con concentraciones bajas (25 y 50 μ M), muestran estadísticamente una diferencia significativa respecto al control.

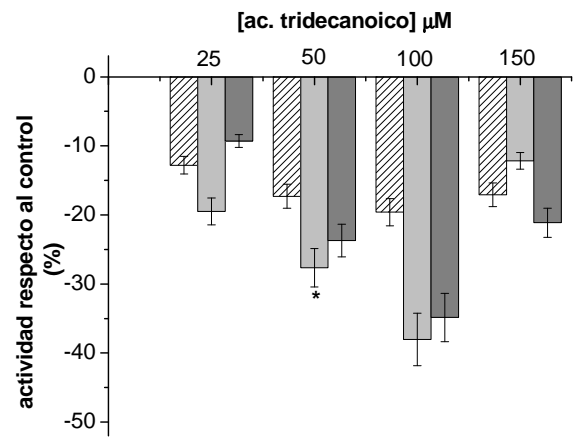
Estos resultados coinciden con los estudios reportados por Kato y Tanaka (2003) en donde observan que el efecto inhibitorio de la capsaicina sobre la elongación de las raíces tienen mayor efecto sobre especies monocotiledóneas, como es *Lolium perenne*. Asi como también Siddiqui y Zaman (2005) reportan la inhibición de germinación y elongación de raíces.

El ácido tridecanoico, presentó una inhibición muy ligera, en las tres actividades y a una concentración de 100 μ M. Con este ácido graso, la elongación de las raíces y la germinación fue la que tuvo mayor inhibición con un 38 y 37% respectivamente, mientras la elongación de los tallos 19.4 %, siendo este último el de menor inhibición (Fig. 16B).

A)



B)



C)

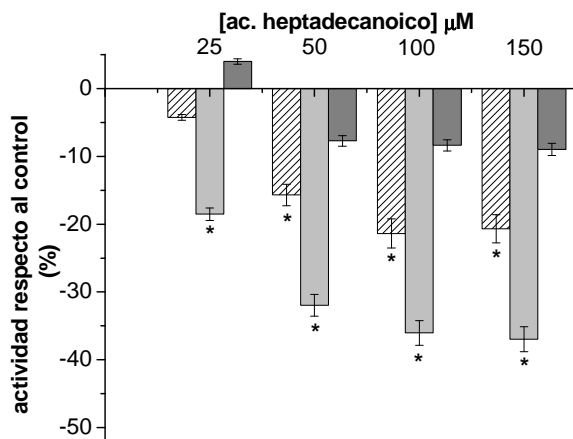


Figura 16. Efecto de los tres compuestos ensayados a diferentes concentraciones, sobre la elongación de tallos (▨) y raíces (▩), así como en la germinación (■) de *L. perenne*. Los datos son presentados en porcentajes y el valor del control es 0%. Los valores positivos indican un incremento, mientras que los valores negativos indican inhibición. El asterisco (*) sobre las columnas son valores estadísticamente significativos respecto al control, ANOVA ($p < 0.05$), representan el promedio de tres repeticiones.

En el caso del ácido heptadecanoico comparado con los resultados en *L. sativa*, en donde no tuvo efecto, en *L. perenne* presentó actividad inhibitoria dependiente de su concentración con la mayor concentración (150 μM), inhibiendo la elongación de las raíces en 37% y la elongación de los tallos 20% mientras que en la germinación actuó ligeramente, inhibiendo el 9%, lo cual no es un daño significativo.

6.2 Efecto de la capsaicina y los ácidos tridecanoico y heptadecanoico sobre la cadena transportadora de electrones de las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

Para conocer el efecto de los compuestos en el transporte de electrones fotosintético, se midió su efecto a concentraciones crecientes sobre la actividad en la cadena transportadora de electrones medida de agua a MV en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado) (Fig. 17)

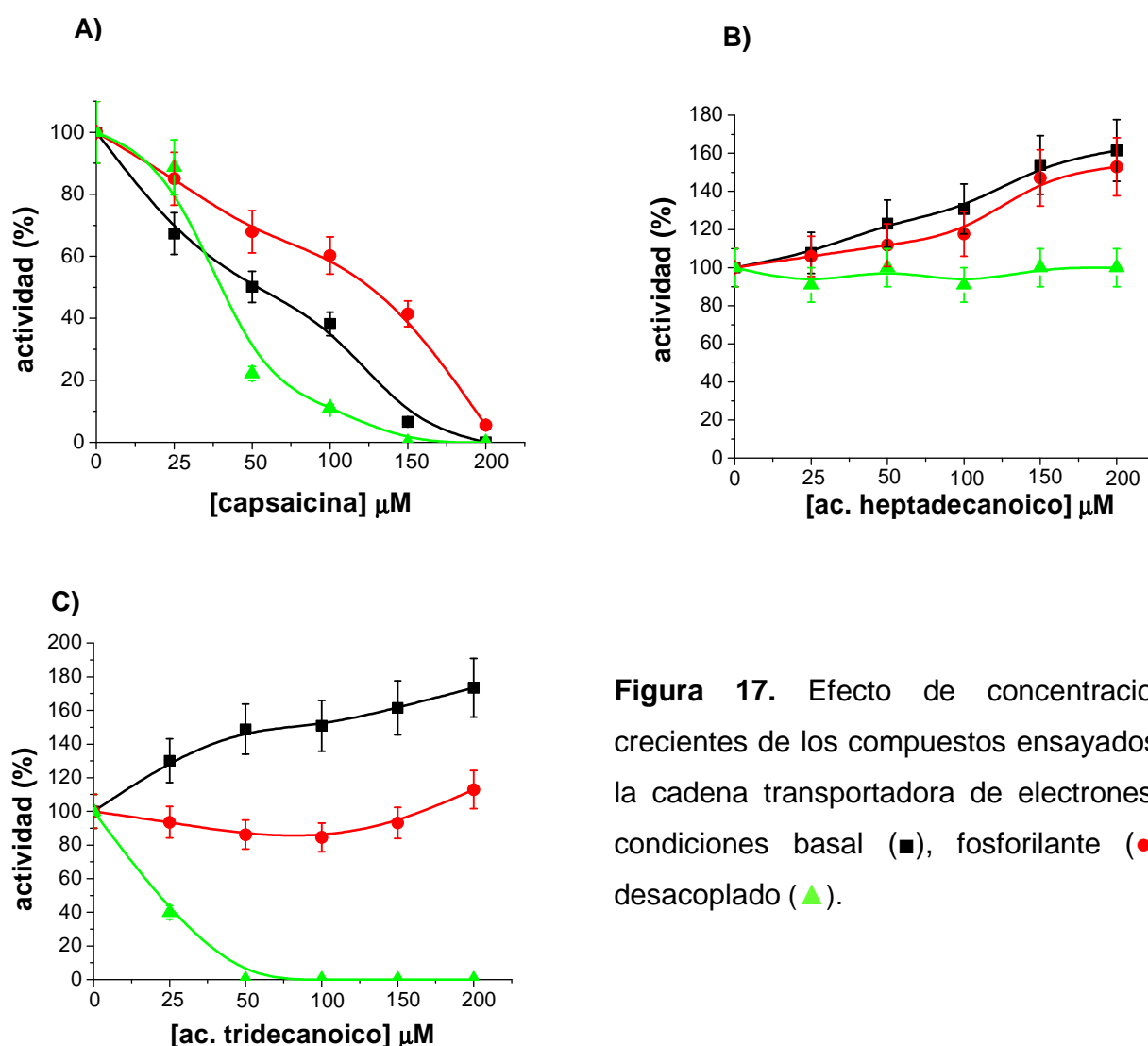


Figura 17. Efecto de concentraciones crecientes de los compuestos ensayados en la cadena transportadora de electrones en condiciones basal (■), fosforilante (●) y desacoplado (▲).

La gráfica de la figura 17A muestra que la capsaicina inhibió el transporte de electrones en sus tres estados medidos de H₂O a MV en una manera dependiente de la concentración, comportándose así como inhibidor de la reacción de Hill, los valores de I₅₀ (concentración a la cual el compuesto inhibe 50%) para los transportes basal, fosforilante y desacoplado son 21, 50 y 16 μM, respectivamente.

Los ácidos heptadecanoico y tridecanoico (Fig. 17B y C) aumentaron la velocidad del transporte de electrones basal y fosforilante, actuando como desacoplantes; sin embargo el ácido tridecanoico también inhibió el transporte de electrones desacoplado, comportándose como desacoplante y como inhibidor de la reacción de Hill con un valor de I₅₀ para el transporte desacoplado de 8.80 μM.

De los compuestos que inhiben la reacción de Hill, el compuesto que presentó una mayor actividad fue el ácido tridecanoico, ya que fue dos veces más activo que la capsaicina en el transporte desacoplado, sin embargo ambos compuestos se comportan como inhibidores de la reacción de Hill, lo cual nos sugiere que están afectando una o más enzimas dentro de la cadena transportadora de electrones fotosintética (King, 1999).

En el caso del ácido heptadecanoico y el tridecanoico, los cuales se comportaron como desacoplantes, puede deberse a que son ácidos grasos muy lipofílico (el heptadecanoico mas que el tridecanoico), que de acuerdo a Beker y Percival (1991) son compuestos que atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones del medio interno, los cuales una vez protonados pasan a la parte externa del tilacoide donde liberan el protón mediante disociación.

6.3 Sitios de acción de los compuestos inhibidores de la reacción de Hill.

Medición de su efecto sobre los fotosistemas I y II y en sus reacciones parciales.

Para localizar los posibles sitios de inhibición de la capsaicina y del ácido tridecanoico (compuestos que inhibieron la reacción de Hill), se midió su efecto en el transporte de electrones en los fotosistemas I y II por separado, utilizando

donadores y aceptores de electrones artificiales así como los inhibidores adecuados.

Los resultados obtenidos indicaron que el fotosistema II medido de H₂O a DCPIP (Fig. 18) fue inhibido completamente por la capsaicina y el ácido tridecanoico, dicho sitio es más susceptible para la acción de compuestos que inhiben la reacción de Hill (Beker y Percival, 1991), sin embargo en el caso del fotosistema I los compuestos no lo afectaron ni a bajas ni a altas concentraciones (300 μM) (datos no mostrados).

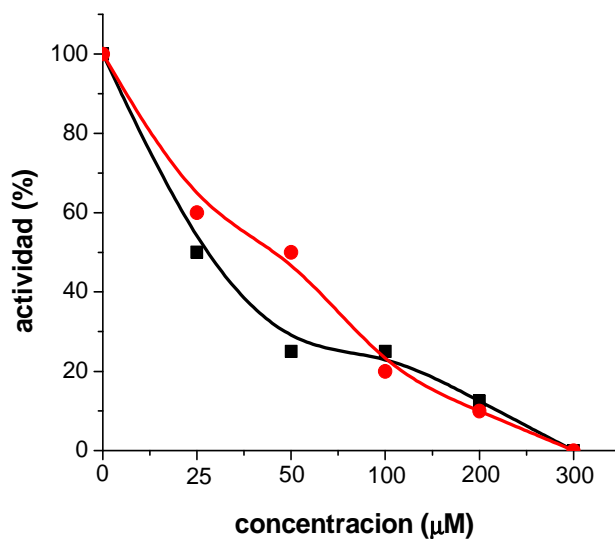


Figura 18. Efecto de la capsaicina (■) y el ácido tridecanoico (●) en el transporte de electrones del Fotosistema II, medido de H₂O a DCPIP.

Para conocer con mayor precisión el sitio de acción de los compuestos en el FS II, se midió su efecto en las reacciones parciales de este fotosistema empleando métodos polarográficos en el caso del lado donador de electrones (Agua a a Simo) y por métodos espectroscópico en el lado aceptor de electrones (DPC a DCPIP).

Tabla 6. Efecto de la capsaicina y el ácido tridecanoico en la reacción parcial de agua a SiMo, medido en cloroplastos.

Compuesto		capsaicina		ácido tridecanoico	
Transporte de electrones medido de H₂O a SiMo					
Conc. [μM]		μg* e- / mg Ch * H	%	μg* e- / mg Ch * H	%
0		199.8	100	233.1 ± 42.65	100
200		199.8	100	133.2 ± 28.57	57.14
300		199.8	100	66.6 ± 20.20	28.57
400		199.8	100	0	0
Transporte de electrones medido de DPC a DCPIP					
ácido tridecanoico					
0		207.3 ± 75.87	100		
300		199.2 ± 72.90	96.09		

Los resultados de la Tabla 6 muestran que al aumentar la concentración de la capsaicina de 0 a 400 μM no mostró efecto inhibitorio el segmento de la cadena redox de agua a SiMo; este resultado indica que el sitio de acción de la capsaicina, se encuentra en el lado aceptor del fotosistema II, entre Q_A y Q_B. En cambio el ácido tridecanoico, inhibió la reacción de agua-SiMo al 100% a la concentración de 400 μM, por lo que se procedió a medir su efecto en el transporte de electrones de DPC a DCPIP en un espectrofotómetro a 600 nm, y los resultados mostraron que este compuesto no inhibe este tramo de la cadena transportadora de electrones (Tabla 6), este resultado indica que el sitio de

interacción del ácido tridecanoico se encuentra del lado donador de electrones del fotosistema II, probablemente en la enzima que fotolisa el agua.

6.4 Efecto de los ácidos grasos sobre la actividad de la H⁺-ATPasa dependiente de la luz en cloroplastos.

Para corroborar el efecto desacoplante de los ácidos grasos, su efecto sobre la actividad de la H⁺-ATPasa fue medido, para lo cual, se utilizó el desacoplante cloruro de amonio (NH₄Cl) como control positivo.

Los resultados que se muestran en la Tabla 7 indican que al aumentar la concentración de los ácidos grasos, aumentan la actividad de la H⁺-ATPasa comportándose como desacoplantes.

Tabla 7. Actividad de la ATPasa, medida a diferentes concentraciones con los ácidos grasos ensayados, comparados con NH₄Cl.

Compuesto	Concentración μM	μM Pi / μg Cl * H	%
ácido heptadecanoico	0	114.70 ± 10.39	100
	50	120.70 ± 10.93	105.23
	100	125.35 ± 11.36	109.28
	200	134.55 ± 12.1	117.30
ácido tridecanoico	0	59.3 ± 28.77	100
	50	58.59 ± 28.63	99.09
	100	63.92 ± 31.02	107.79
	200	65.69 ± 34.67	114.73
NH ₄ Cl	0	90.91 ± 47.80	100
	1000	104.4 ± 29.2	202.79
	2000	187.3 ± 108	311.05
	3000*	193.15 ± 0	499.09

El asterico (*) a lado de cada concentración, son valores estadísticamente significativos respecto al control, ANOVA ($p < 0.05$), representan el promedio de tres repeticiones.

El efecto desacoplante de los ácidos grasos, es bajo comparado con el NH_4Cl . Sin embargo el efecto observado en el transporte de electrones fue desacoplante, aunque al evaluarlo en la actividad de la H^+ ATPasa presenta un efecto ligero lo cual corrobora su baja actividad como desacoplantes.

En el análisis estadístico los valores no fueron significativamente diferentes respecto al control.

6.5 Análisis de la fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en cloroplastos tratados con la capsaicina y el ácido tridecanoico.

Para corroborar los sitios de inhibición de los compuestos, capsaicina y ácido tridecanoico en el FS II, se midió la fluorescencia de la clorofila a en cloroplastos aislados, frescos y lisados al momento de usarse, además se empleo DCMU como control positivo. En la figura 19 se muestran las curvas de inducción de fluorescencia doblemente normalizadas de F_1 a F_M obtenidas a diferentes concentraciones de capsaicina.

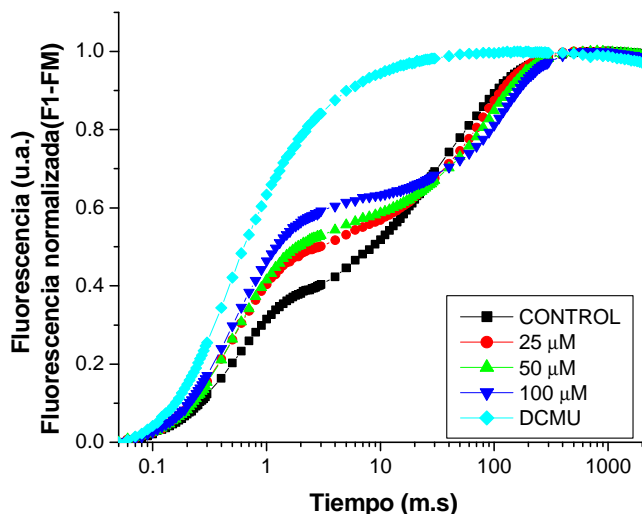


Figura 19. Curvas de inducción normalizadas de la fluorescencia de la clorofila a de cloroplastos tratados con diferentes concentraciones de capsaicina y con 30 μM de DCMU.

La diferencia de los transientes normalizados obtenidos con los cloroplastos control y con los tratados con diferentes concentraciones de capsaicina, mostraron la aparición de una banda “J” (aumento de intensidad a 2 ms) (Fig. 20), las cuales aumentaron de intensidad al aumentar la concentración de capsaicina, alcanzando la mayor intensidad con 100 μ M de capsaicina y con 30 μ M de DCMU (herbicida comercial). La aparición de una banda “J” indica un daño en el lado aceptor del Fotosistema II, lo cual demuestra que la capsaicina inhibe el flujo de electrones entre las plastoquinonas Q_A y Q_B , tal como lo hace DCMU (Strasser, 2004) y corrobora los resultados obtenidos por polarografía, indicando que el daño se encuentra en el lado aceptor del FS II.

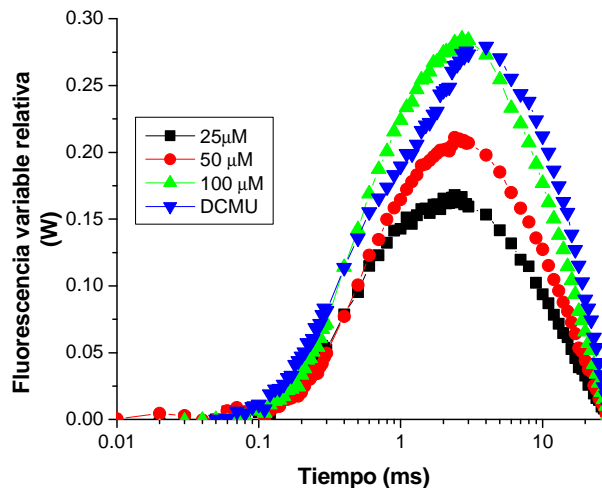


Figura 20. Aparición de las bandas J, con diferentes concentraciones de capsaicina, comparadas con un herbicida comercial, el DCMU.

En el caso del ácido tridecanoico, se muestran las curvas de inducción doblemente normalizadas de F_1 a F_M obtenidas a diferentes concentraciones de ácido tridecanoico, empleando DCMU como control positivo (Fig. 21A). La diferencia entre los transientes de los tratamientos normalizados de F_1 a F_4 menos los transientes normalizados del control, mostraron la aparición de una banda K a los 0.3 ms (Fig. 21B).

A diferencia de la banda "J" de la capsaicina, las intensidades de estas bandas son más pequeñas, lo cual se puede deber a que el compuesto no penetra bien en los cloroplastos debido a su valor de Log *P* (Tabla 8), que indica que el ácido graso es más lipofílico que la capsaicina.

La aparición de una banda "K", puede ser explicada por un desbalance entre el flujo de electrones que salen del centro de reacción (CR) hacia el lado aceptor y el flujo de los electrones que le llegan del lado donador al CR del FS II. Lo que permite una oxidación estable del donador secundario de electrones, la tirosina Z (Yz), y posiblemente una acumulación de P680⁺ (Strasser, 1977; King, *et. al.*, 2014); confirmando que el sitio de acción del ácido tridecanoico se encuentra en el lado donador de electrones del FS II, afectando la fotólisis del agua y corroborando así los resultados de polarografía.

Tabla 8. Valores de Log *P* para cada uno de los compuestos ensayados

Compuesto	Log <i>P</i>
Capsaicina	3.2 +/- 0.37
ácido tridecanoico	4.53 +/- 0.28
ácido heptadecanoico	6.66 +/- 0.28

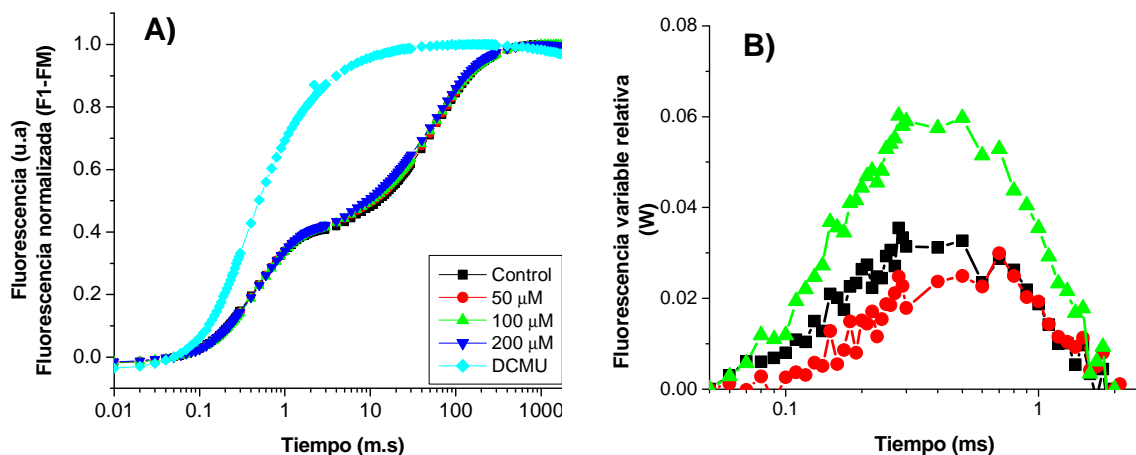


Figura 21. **A)** Normalización de F_1 a F_M y **B)** aparición de banda K (0.3 ms) a concentraciones 50 (■), 100 (●) y 200 (▲) en cloroplastos tratados con ácido tridecanoico.

6.6 Fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en hojas de dos plantas modelo.

Para saber si los compuestos presentaban actividad *in vivo*, se midió la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas de plantas de *L. sativa* y *L. perenne* de 15 días de crecidas en el invernadero 24, 48 y 72 horas después de haber sido asperjadas con los compuestos a concentraciones 150 y 300 μM, también se midió la biomasa seca de las plantas 15 días después de haber sido medida la fluorescencia, los resultados no fueron significativos (datos no mostrados), lo que sugiere que probablemente los compuestos no llegan a su sitio de acción ya sea porque no penetraron las hojas o se metabolizan rápidamente (Morales, 2014), en menos de 24 h.

Debido a estos resultados, utilizamos tres ciclodextrinas (CD's) diferentes como adyuvantes, con la finalidad de que estas ayudaran a los compuestos a penetrar.

6.6.1 Efecto de los complejos de inclusión de los compuestos con ciclodextrinas (CD's) sobre la fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en plantas de *L. sativa*.

Por experimentos ya realizados anteriormente en el laboratorio (Morales-Flores, 2014), se sabe que las ciclodextrinas (CD's) por si solas no modifican los resultados en la medición de la clorofila a del Fotosistema II, además de que en los últimos años han despertado interés en el campo agroquímico, ya que muchos pesticidas sintéticos forman complejos de inclusión con ellas, mejorando sus propiedades físicas y químicas y además reducen la toxicidad de contacto para los seres humanos (Abellan, *et. al.*, 2008, Morales, 2014).

Por lo anterior se modifico el experimento utilizando las siguientes ciclodextrinas (CD's): β -CD, metil- β -CD (**M β -CD**) y (2-hidroxipropil)- β -CD (**2h β -CD**) como adyuvantes para formar complejos con los tres compuestos (capsaicina, ácido tridecanoico y heptadecanoico) a concentraciones de 150 y 300 μ M, formando complejos 1:1. El DCMU se utilizo como control positivo.

La fluorescencia de la clorofila a en hojas de *L. sativa*, se midió 24, 48 y 72 horas después de haber sido asperjadas con los complejos formados por la capsaicina y ácidos grasos (heptadecanoico y tridecanoico) con las CD's.

Los complejos de los compuestos ensayados con β -CD no mostraron efecto significativo en las plantas de *L. sativa* a ninguna concentración ensayada (datos no mostrados), lo que nos indica que probablemente no se formo el complejo o que no penetro las hojas de la planta.

Sin embargo, los resultados del complejo **capsaicina:2-h β -CD**, después de 24 y 48 horas de haber sido asperjado en hojas de *L. sativa*, la fluorescencia se afecto mostrando la aparición de un aumento cercano a 100 ms (banda "G") a las dos concentraciones utilizadas (150 y 300 μ M). La capsaicina mostró la mayor banda "G" a las 24 horas con la menor concentración utilizada (150 μ M), y a las 48 h esta banda disminuyó, lo cual sugiere que el compuesto probablemente fue degradado,

ya que a las 72 h la banda desapareció totalmente, lo mismo ocurrió con la concentración de 300 μM (Fig. 22).

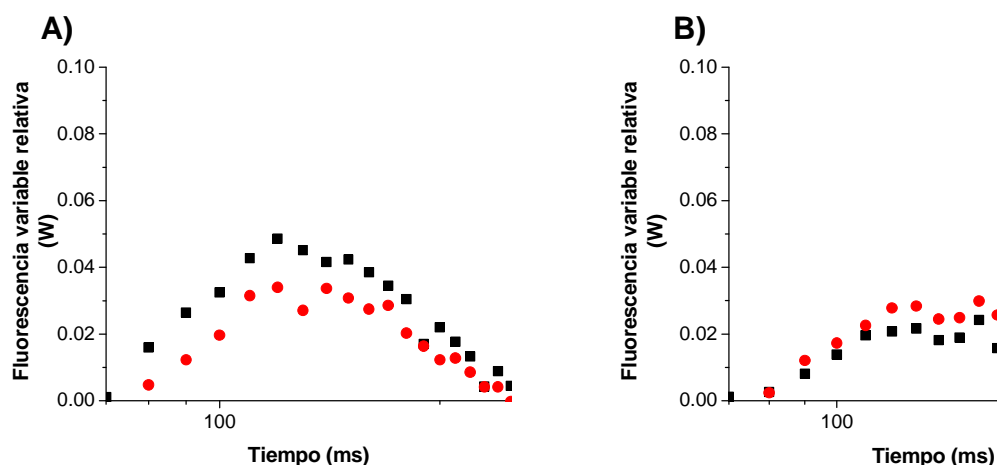


Figura 22. Banda “G” obtenida con el complejo capsaicina: 2-h β -CD después de haber sido asperjado en hojas de *L. sativa*. **A)** 24 h y **B)** 48 h después, a concentraciones 150 (■) y 300 μM (●).

Los complejos formados con los ácidos grasos y la ciclodextrina 2- β hidroxipropil, también presentaron banda “G”.

El complejo del ácido **tridecanoico:2-h β -CD** fue el que presentó una banda “G” de mayor intensidad a las 24 h a una concentración de 300 μM , la cual disminuyó a las 48 h y finalmente a las 72 h desapareció (Fig. 23). Con la concentración de 150 μM , también apareció una banda “G”, más pequeña, lo que sugiere que a mayor concentración actúa mejor el compuesto, dañando por más tiempo la fluorescencia de la clorofila *a* (Fig. 23).

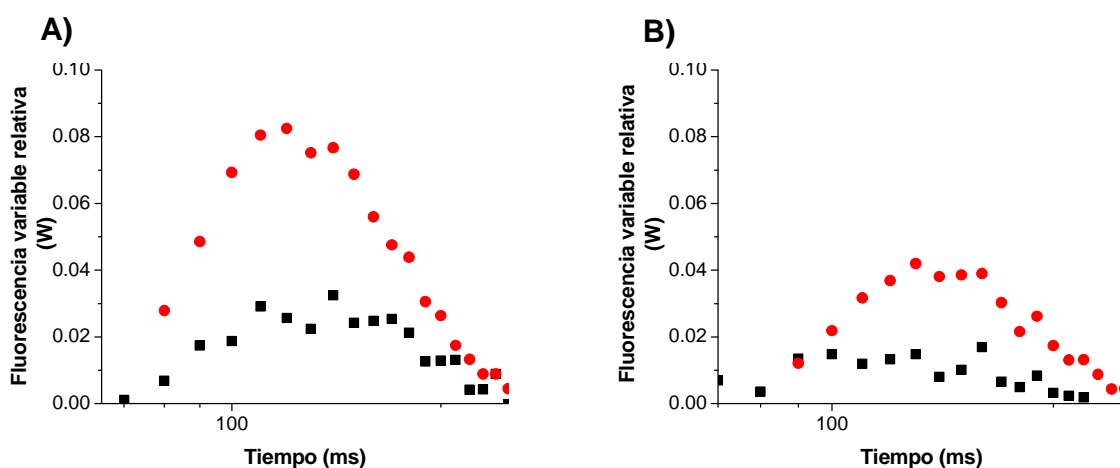


Figura 23. Banda “G” mostrada con el complejo ácido tridecanoico:2-hβ-CD, después de **A)** 24 h y **B)** 48 h de haber sido asperjado en hojas de *L. sativa* a las concentraciones 150 (■) y 300 μM (●).

En el caso del complejo del ácido **heptadecanoico:2-hβ-CD**, la aparición de la banda “G” es pequeña a comparación de los otros dos compuestos probados, sin embargo se encuentra presente a las 24 y 48 h (Fig. 24).

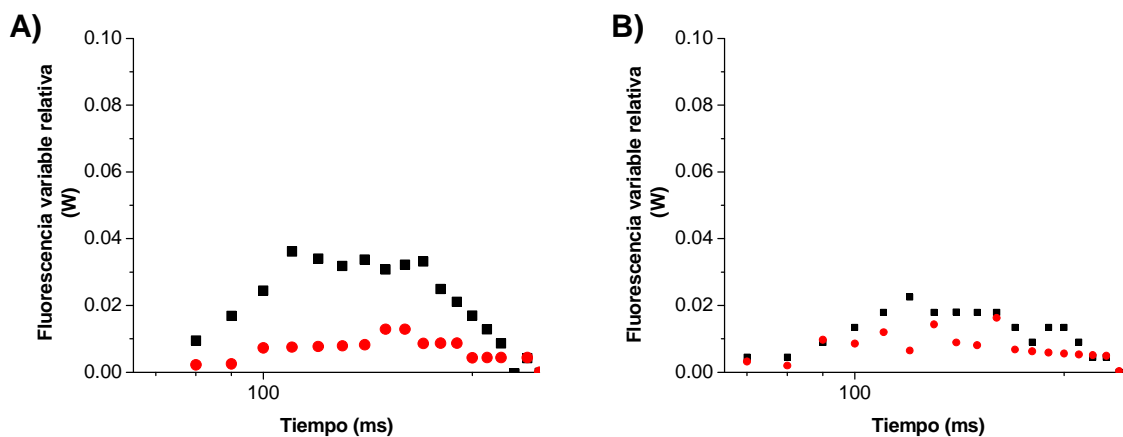


Figura 24. Banda “G” mostrada con el complejo ácido heptadecanoico: 2-hβ-CD asperjado en hojas de *L. sativa* y medidas a las **A)** 24 h y **B)** 48 h a concentraciones de 150 (■) y 300 μM (●).

La metil-β ciclodextrina (Mβ-CD) fue el tercer adyuvante que se probó, con los tres compuestos ensayados se observó una banda “G”.

El complejo **capsaicina:M β -CD** mostró una banda “G” (Fig.25) a las 24 horas con ambas concentraciones ensayadas (150 y 300 μ M) y disminuyendo la banda con el paso del tiempo, sin embargo no desaparece a las 72 horas, lo que sugiere que el compuesto es degradado lentamente por la planta.

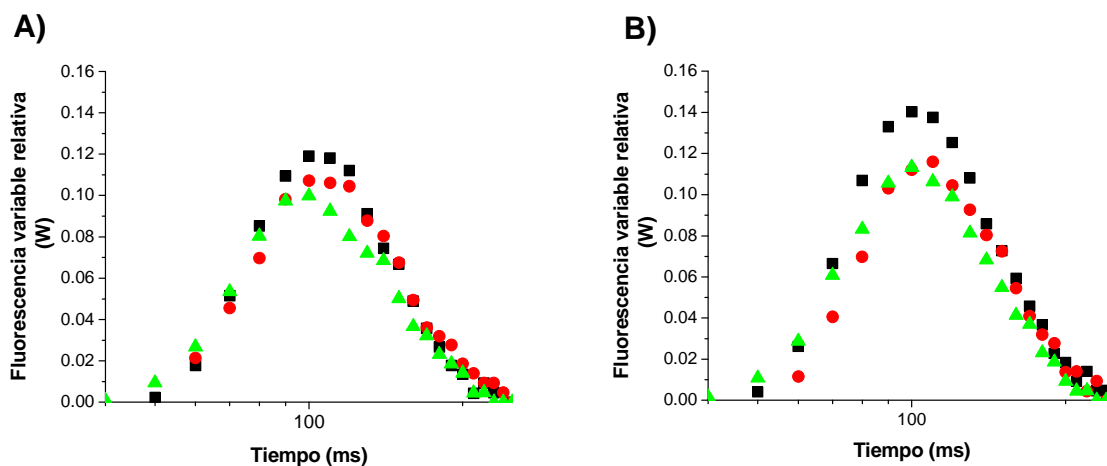


Figura 25. Bandas “G” mostradas por el complejo capsaicina:M β -CD asperjado en hojas de *L. sativa*, a concentraciones **A)** 150 y **B)** 300 μ M, medida a 24 (■), 48 (●) y 72 h (▲).

En el caso del complejo ácido **tridecanoico:M β -CD** actuó de manera similar a la capsaicina, obteniendo una banda “G” con ambas concentraciones. La aparición de esta banda con la concentración 150 μ M (Fig. 26A), fue más intensa 24 h después de haber asperjado las hojas de *L. sativa*, la cual disminuyó con el paso del tiempo, sin embargo con la concentración más alta (300 μ M) (Fig. 26B), el mayor aumento de la banda “G” se notó a las 48 h, disminuyendo con el tiempo, sin embargo la banda no desaparece, lo que indica que el compuesto tarda más de 72 h en ser degradado por la planta.

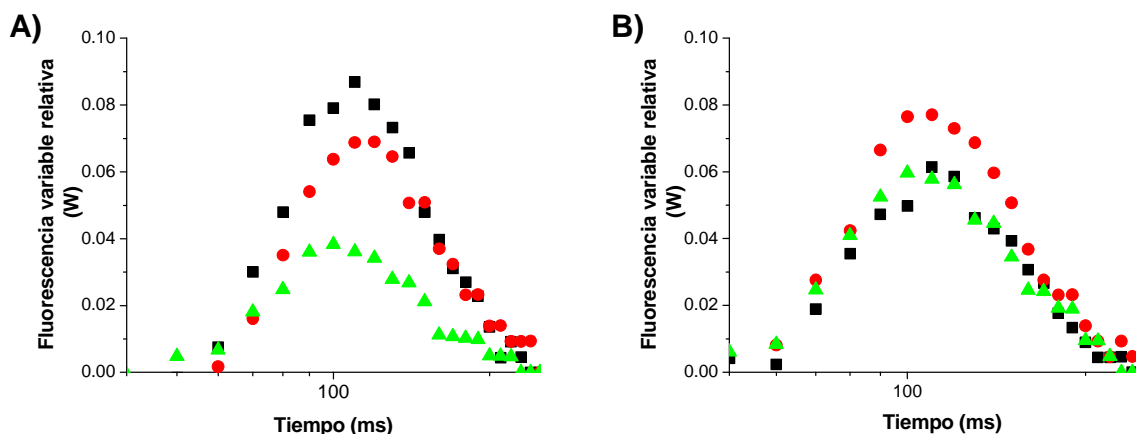


Figura 26. Bandas “G” mostradas con el complejo de ácido tridecanoico:Mβ- CD 24 (■),48 (●) y 72 h (▲) después de haber sido asperjado en hojas de *L. sativa*, a concentraciones **A)** 150 y **B)** 300 μM.

Con el complejo ácido **heptadecanoico:Mβ-CD**, la banda “G” aparece a las 24 h con ambas concentraciones (150 y 300 μM) (Fig. 27A y B) alcanzando su mayor aumento a las 48 horas después de ser asperjado el complejo, a las 72 h la banda va disminuye nuevamente, comportándose como en los casos anteriores.

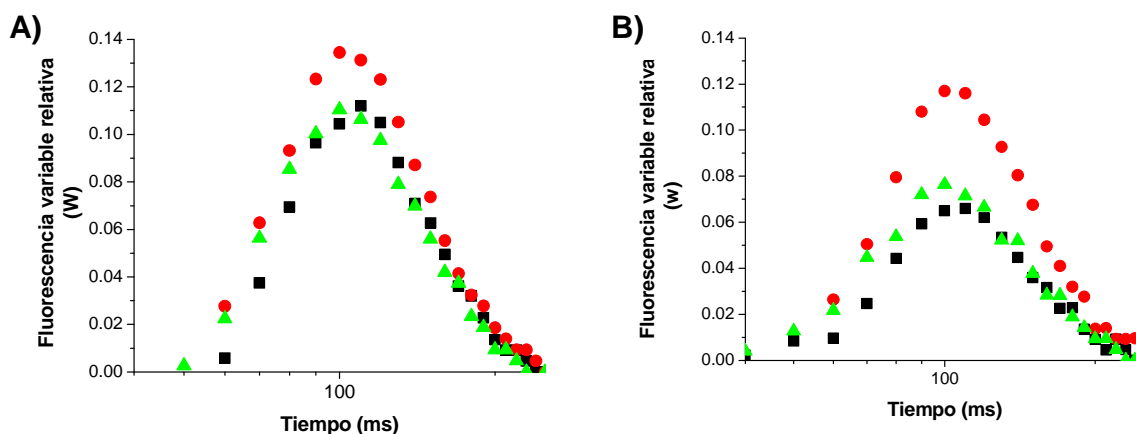


Figura 27. Bandas “G” mostradas con el complejo ácido heptadecanoico:Mβ-CD 24 (■), 48 (●) y 72 h (▲) después de haber sido asperjado en hojas de *L. sativa*, a concentraciones **A)** 150 y **B)** 300 μM.

Con el uso de los adyuvantes (**2-β-hidroxipropil-CD** y **metil-β-CD**), se pudo conocer el sitio de acción de los compuestos en ensayos *in vivo*, ya que los

adyuvantes permitieron que la molécula del compuesto pudiera penetrar las hojas de *L. sativa* y así detectar el sitio de acción. La aparición de la banda “G”, nos indica que el sitio de inhibición de los compuestos está más allá del pool de plastoquinonas (Tóth, *et al.*, 2005), lo que sugiere que el mecanismo de acción en plantas difiere del mecanismo de acción en cloroplastos aislados, probablemente debido a que los compuestos son metabolizados por la planta.

A pesar de que la banda “G” ha sido bien caracterizada, aun no se conocen los procesos por los cuales aparece (Tsimilli y Strasser, 2008).

6.6.2 Efecto de los complejos de inclusión de los compuestos con ciclodextrinas (CD's) sobre la fluorescencia de la clorofila a del Fotosistema II en plantas de *L. perenne*.

La fluorescencia de la clorofila a también fue medida en hojas de pasto (*L. perenne*), 24, 48 y 72 h después de haber asperjado las hojas se probaron los complejos formados con los compuestos (capsaicina, ácido tridecanoico y heptadecanoico) y los tres adyuvantes (**β -CD, M β -CD y 2h β -CD**), teniendo como resultado que los complejos con M β -CD y 2h β -CD mostraron efecto en la fluorescencia de la clorofila a únicamente, como ocurrió en *L. sativa*, mientras que los complejos con β -CD, no tuvieron efecto (datos no mostrados), posiblemente este complejo no llegó a su sitio de acción en ninguna de las dos plantas modelo o muy probablemente no se formó en complejo de inclusión.

En los tres complejos ensayados (**capsaicina:2h β -CD, heptadecanoico:2h β -CD y tridecanoico:2h β -CD**), se observó la aparición de bandas “G” en ambas concentraciones (150 y 300 μ M), las cuales aparecieron a las 48 h después de haber sido asperjados en las plantas.

El complejo **capsaicina:2h β -CD**, mostró la mayor banda a la concentración 150 μ M a las 48 h (Fig 28A), sin embargo, a las 72 h y en ambas concentraciones la banda disminuyó (Fig. 28B), pero no desaparece.

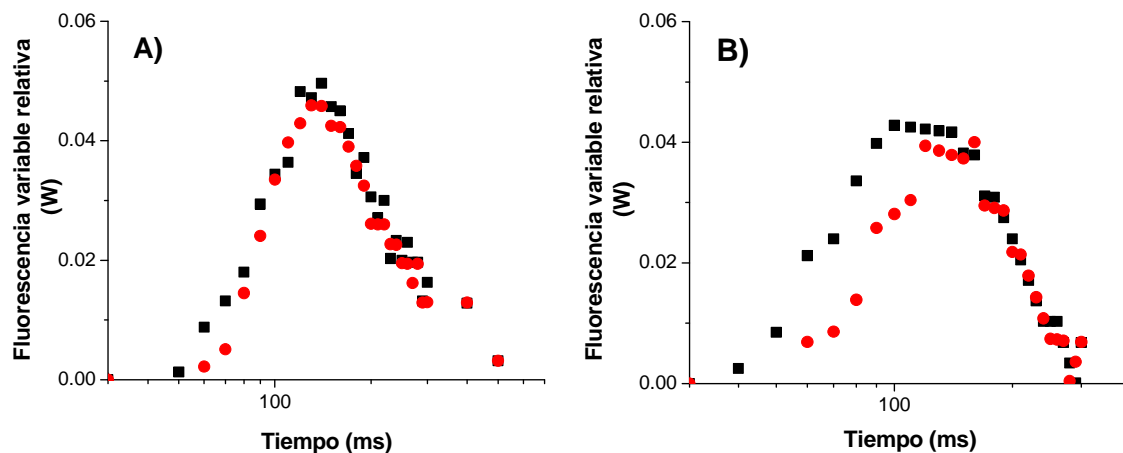


Figura 28. Bandas “G” mostradas con el complejo capsaicina:2hβ-CD, **A)** 48 y **B)** 72 h después de haber sido asperjado en hojas de *L. perenne* a concentraciones de 150 (■) y 300 μM (●).

En el caso del complejo ácido **heptadecanoico:2hβ-CD**, únicamente a la concentración de 150 μM se observó la banda “G” aumentando ligeramente a las 48 h y desapareciendo a las 72 h, lo cual sugiere que en el pasto a comparación de la lechuga, este complejo se degrada en menor tiempo (Fig. 29).

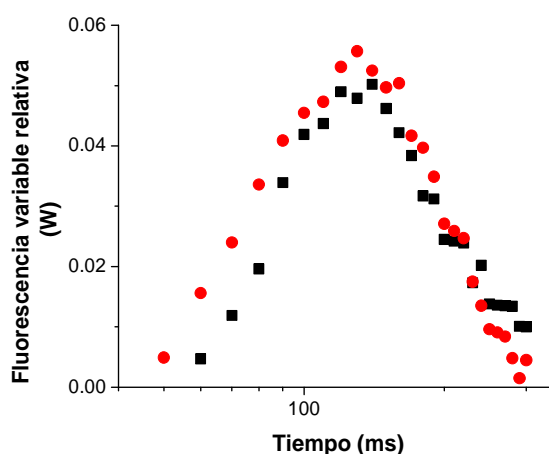


Figura 29. Bandas “G” mostradas por el complejo del ácido heptadecanoico:2hβ-CD 24 (■) y 48 h (●) después de haber sido asperjado en hojas de *L. perenne*, a concentración de 150 μM.

El complejo ácido **tridecanoico:2h β -CD** mostró la aparición de una banda “G” pero a diferencia del mismo complejo con ácido heptadecanoico, ocurre lo contrario, esta banda aparece a 300 μ M a las 48 h como se aprecia en la Figura 30 y permanece con la misma intensidad a las 72 h después de haber sido asperjadas.

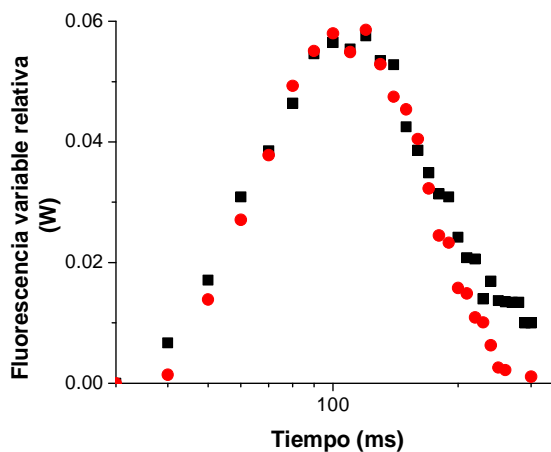


Figura 30. Bandas “G” mostradas con el complejo ácido-tridecanoico:2h β -CD 24 (■) y 48 h (●) después de haber sido asperjado en hojas de *L. perenne*, a concentraciones de 300 μ M.

Los resultados de estos experimentos sugieren que de los ácidos grasos ensayados (tridecanoico y heptadecanoico), el ácido tridecanoico por ser menos lipofílico y con la ayuda de la (2- β -hidroxipropil)-CD tarda menos tiempo en penetrar las hojas del pasto, sin embargo este es degradado después de las 48 h. En el caso del ácido heptadecanoico, que es un ácido graso más lipofílico, ocurrió lo contrario, lo que ocasiona que tarde más tiempo en penetrar las hojas de la planta y que por lo tanto su efecto permanezca hasta las 72 h.

Los complejos de inclusión de la metil- β -ciclodextrina con los ácidos grasos ensayados tuvieron la aparición de diferentes bandas: “I” y “G” (Fig. 31 y 32 respectivamente) 48 horas después de haber sido asperjados sobre las hojas de pasto, en el caso del complejo **capsaicina:M β -CD** no tuvo efecto con ninguna concentración y en ningún tiempo medido, lo cual refiere que el complejo

capsaicina: M β -CD probablemente no llegue a su sitio de acción en la planta o fue degradado antes de las 24 h.

El complejo ácido **tridecanoico:M β -CD** mostró la aparición de una banda "I" (10 ms) con ambas concentraciones, 48 h después de haber sido asperjadas las hojas, dicha banda se muestra con mayor intensidad en la concentración más alta (300 μ M), lo cual nos habla de que el sitio de acción del complejo es en el pool de plastoquinonas (Strasser y Stirbet, 2000). El hecho de que solo se observe a las 48 h sugiere que el compuesto fue degradado por la planta en poco tiempo, afectando en menor tiempo la fluorescencia (Fig. 31).

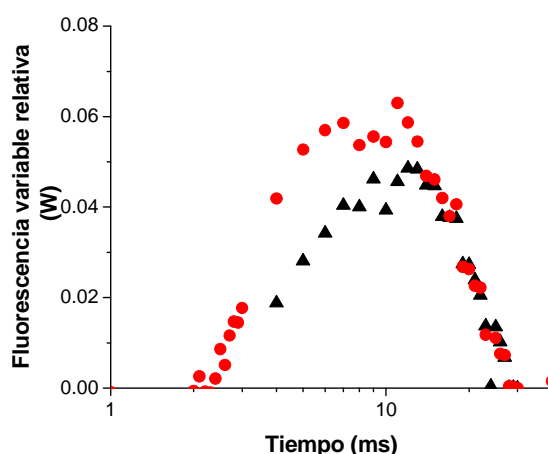


Figura 31. Banda "I" mostrada 48 h después de haber asperjado las plantas de *L. perenne* con el complejo ácido tridecanoico:M β -CD, a concentraciones 150 μ M (▲) y 300 μ M (●).

En el caso del complejo **ácido heptadecanoico:M β -CD** se observó la aparición de la banda "G" solo a las 72 h a ambas concentraciones probadas. En la Figura 32 se observa un aumento ligero en la intensidad de la banda con 300 μ M, este hecho puede ser debido a que el ácido heptadecanoico es más lipofílico y por lo tanto es más difícil que pueda penetrar las hojas de pasto. La aparición de una banda "G" nos indica que el sitio de acción de este complejo puede encontrarse más allá del pool de plastoquinonas (Tóth, *et al.*, 2005).

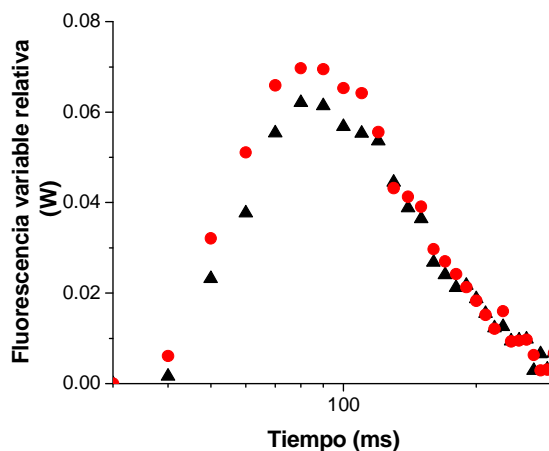


Figura 32. Aparición de la banda G 72 h después de haber asperjado el complejo de inclusión del ácido heptadecanoico:Mβ-CD, a concentraciones 150 μM (▲) y 300 μM (●).

6.7 Biomasa seca

La biomasa seca se determinó 15 días después de haber asperjado las plantas con los complejos de inclusión formados con los compuestos ensayados en ambas concentraciones ensayadas.

La Tabla 9 muestra el efecto de los complejos de inclusión formados con el adyuvante metil-β-ciclodextrina y los tres compuestos ensayados, en hojas de *Lactuca sativa*.

Se observó que el complejo que tuvo una disminución respecto al control fue el complejo capsaicina:Mβ-CD el cual disminuyó ligeramente (10%) a la concentración de 300 μM. En el caso de los ácidos grasos la disminución de la biomasa seca fue mínima (3%), lo que nos indica que ninguno de los tres compuestos afecta significativamente.

Estadísticamente estas diferencias que existen entre los compuestos y el control no son significativas.

Tabla 9. Efecto de los complejos de los compuestos con el adyuvante metil- β -CD en la biomasa seca de *L. sativa*.

Tratamiento	Peso en g	%
Control	0.7208 \pm 0.0389	100a
ac. tridecanoico 150 μ M	0.6949 \pm 0.0446	96.40a
ac. tridecanoico 300 μ M	0.6813 \pm 0.0405	94.52a
ac. heptadecanoico 150 μ M	0.6739 \pm 0.0641	93.49a
ac. heptadecanoico 300 μ M	0.7208 \pm 0.0223	100a
capsaicina 150 μ M	0.6698 \pm 0.0523	92.92a
capsaicina 300 μ M	0.6477 \pm 0.0749	89.86a
DCMU	0.3545 \pm 0.0445	49.17b

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ANOVA, Dunn ($p < 0.05$).

En el caso de *L. perenne* solo los complejos de inclusión capsaicina:M β -CD y del ácido heptadecanoico:M β -CD disminuyeron la biomasa seca en 12.68 y 11.67% con las concentraciones de 300 y 150 μ M respectivamente, aunque existe una diferencia mayor que con *L. sativa*, estadísticamente estos resultados no son significativos respecto al control.

Tabla 10. Efecto de los complejos de los compuestos con el adyuvante metil- β -CD en la biomasa seca de la biomasa seca de *L. perenne*.

Tratamiento	Peso en g	%
Control	0.5300 \pm 0.0636	100a
ac. tridecanoico 150 μ M	0.505 \pm 0.0406	95.27a
ac. tridecanoico 300 μ M	0.5069 \pm 0.0497	95.64a
ac. heptadecanoico 150 μ M	0.4845 \pm 0.0520	91.41a
ac. heptadecanoico 300 μ M	0.4681 \pm 0.0228	88.32a
capsaicina 150 μ M	0.4623 \pm 0.0794	87.22a
capsaicina 300 μ M	0.5239 \pm 0.0392	98.84a
DCMU	0.3603 \pm 0.0171	67.98b

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ANOVA, Dunn ($p < 0.05$).

Los complejos de inclusión formados con la (2- β -hidroxipropil)-ciclodextrina y los compuestos ensayados, los resultados en *L. sativa* se muestran en la Tabla 11.

Se observa una ligera disminución en la biomasa seca del ácido tridecanoico (18.5%) y de la capsaicina (17.1%) con la concentración más baja (150 μ M). No existe una diferencia estadística de la capsaicina respecto al control, sin embargo con el ácido tridecanoico si se encuentra dicha diferencia estadística.

Tabla 11. Efecto de los complejos de inclusión con el adyuvante (2-hidroxipropil- β)-CD en la biomasa seca de *L. sativa*.

Tratamiento	Peso en g	%
Control	0.7452 \pm 0.0729	100a
ac. tridecanoico 150 μ M	0.6069 \pm 0.0179	81.44a
ac. tridecanoico 300 μ M	0.6322 \pm 0.0959	84.83b
ac. heptadecanoico 150 μ M	0.6506 \pm 0.0578	87.30a
ac. heptadecanoico 300 μ M	0.7286 \pm 0.0577	97.77a

capsaicina 150 μ M	0.6172 \pm 0.0704	82.82a
capsaicina 300 μ M	0.6531 \pm 0.0392	87.64a
DCMU	0.3916 \pm 0.0301	52.54b

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ANOVA, Dunn ($p < 0.05$).

En la biomasa seca de *L. perenne*, solo el complejo de inclusión de la capsaicina con la (2- β hidroxipropil)-CD mostro una disminución ligera de la biomasa seca de 13% únicamente a 300 μ M (Tabla 12). Sin embargo esta diferencia no es significativa respecto al control.

Tabla 12. Efecto de los complejos de inclusion con el adyuvante (2-hidroxipropil- β)-CD en la biomasa seca de *L. perenne*.

Tratamiento	Peso en g	%
Control	0.5090 \pm 0.04939	100a
ac. tridecanoico 150 μ M	0.4845 \pm 0.05497	95.18a
ac. tridecanoico 300 μ M	0.4655 \pm 0.0275	91.45a
ac. heptadecanoico 150 μ M	0.4881 \pm 0.0398	95.89a
ac. heptadecanoico 300 μ M	0.4633 \pm 0.0295	91.02a
capsaicina 150 μ M	0.4425 \pm 0.0204	86.93a
capsaicina 300 μ M	0.4683 \pm 0.0362	92.00a
DCMU	0.3635 \pm 0.0527	71.41b

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ANOVA, Dunn ($p < 0.05$).

7 CONCLUSIONES

- En los ensayos de germinación, se observó que la capsaicina y el ácido tridecanoico se comportaron como inhibidores pre-emergentes en la germinación de las semillas de *L. sativa*, siendo más activo el ácido tridecanoico al afectar la germinación en un 69%. También la capsaicina afectó significativamente la elongación de tallos. En la germinación de *L. perenne* la capsaicina fue el único compuesto que presentó un efecto pre-emergente en la germinación. Además de afectar la elongación de raíces. El ácido heptadecanoico afectó la elongación de las raíces y los tallos únicamente en *L. perenne*, comportándose como un inhibidor pre-emergente selectivo.
- De los resultados *in vitro*, en el transporte de electrones fotosintético, se observó que la capsaicina y el ácido tridecanoico se comportan como inhibidores de la reacción de Hill, con sitio de acción en el lado aceptor y donador (respectivamente) del FS II corroborado con la fluorescencia de la clorofila *a*. También el ácido tridecanoico al igual que el ácido heptadecanoico se comportan como desacoplantes.
- En los ensayos *in vivo*, en la fluorescencia medida en las plantas de *L. sativa* se aprecia la aparición de la banda "G" con los tres compuestos ensayados, sugiriendo que su blanco de acción está más allá del pool de plastoquinonas.
- En el caso de los ensayos de la fluorescencia de la clorofila *a*, medidos en *L. perenne*, se apreció la aparición de bandas "G" con los tres compuestos ensayados, además de una banda "I" con el ácido tridecanoico. El tiempo que permanecen las bandas, difiere al de *L. sativa*, debido a que la lechuga es más sensible que el pasto.
- En cuanto a la biomasa seca, los tres compuestos no tuvieron un efecto significativo en esta actividad.

8 PERSPECTIVAS

- Evaluar los compuestos con y sin adyuvantes *in vivo* en otras especies de plantas (mono y dico) que sean tanto malezas como especies agrícolas.
- Medir su efecto en la fluorescencia de la clorofila *a* y en biomasa seca.
- Evaluar en ensayo pre-emergencia *in vivo*.
- Evaluar el efecto de los compuestos sobre la raíz después de la aspersión de los compuestos.

Referencias

1. Abellan, C.; Gabaldón Hdz., J.A.; Penalva J.; Fortea, M. I. y Nuñez Delicado, E. 2008. Preparation and characterization of the inclusión complex of chloropyrifos in ciclodextrin to improve insecticide formulations. *J. Agric. Food Chem.* 56:8081-8085.
2. Allen J. F y Holmes N. G. 1994. Electron transport partial reaction. In photosynthesis, Energy trasduction. A practical approach. IRL. Press: Oxford, U.K .Pp. 119-128.
3. Alonso O., Sánchez S., Berrios M. C. y Delgado A. 1996. El extracto oleoso de cayeput, un bioinsecticida-repelente contra *Andrector ruficornis*. En: pastos y forrajes, Vol. 16, No. 2. Cuba. Pp. 2-5.
4. Arias R. R. 2013. Malezas reglamentadas. Departamento de Sanidad Vegetal, SENASICA (Servicio Nacional de Calidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). [Consultada: abril 2014]. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4522>
5. Arnon D. I. 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts polypenoxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, Vol 24. Pp. 1-15.
6. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Biblioteca digital de la Medicina tradicional Mexicana. UNAM. México. Consultada en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
7. Badui S. D. 1994. Química de los alimentos. 3° edición. Alhambra Mexicana. México. Pp. 218.
8. Baker N. R. y Percival M. P. 1991. Herbicides and Photosyntesis. En: Herbicides Baker N.R., y Percival M. P. (Eds). *Elsevier SciencePublisher*. Netherlands. Pp. 1-26.

9. Beyer J. E., Duffy M. S., Itay J. V. y Shlueter D. D. 1988. Sulfonylureas. En: Kearney P C, Kaufman D. D. (eds). Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action, Macel Dekker, New York Vol. 3. Pp 117-189.
10. Bolhár-Nordenkamp H. R. y Öquist G. 1993 Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall DO, Scurlock JMO Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC and Longs SP (eds) Photosynthesis and production in a Changing Enviroment. A Field and laboratory Manual. Chapman and Hall, London United Kingdom. pp 193-205.
11. Buschmann H. J. y Schollmeyer E. J. 2002. Cosmet. Sci., 53, 185.
12. Calderbank A. y Slade P. 1976. Diquat y Paraquat. En Kearney P C, Kaufman D A (eds). Herbicides Chemistry, degradation and mode of action. New York, Vol. 2. Pp. 501-539.
13. Campbell M. K. y Farell S. O. 2004. Bioquímica. Internacional Thompson. Australia. Pp. 615-627.
14. Casanello F. Conceptos básicos sobre malezas y su control mediante la utilización de herbicidas. Pp. 220- 227. [consultada: marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.bse.com.uy/almanaque/Almanaque%201982/pdf/0%20-%20050.pdf>
15. Caseley J. C. 1996. Herbicidas. En: Producción y Protección Vegetal Vol. 120. Roma. Pp. 401.
16. Cázares S. E., Ramírez V. P., Castillo G. F., Soto H. M., Rodríguez G. M. T. y Chávez S. J. L. 2005. Capsaicinoids and preference of use in different morphotypes of chili peppers (*capsicum annuum* L.) of east-central Yucatán. Revista Agrociencia Vol. 39. México. Pp.627-638.
17. Chacon M. 2012. Práctica o prueba de adyuvantes. Facultad de Ciencias agrícolas y ambientales. Argentina.

18. Cobb A. H. y Kwood R. C. 2000. Challenges for herbicides development. En: Cobb A H and Kikwood R C (eds) Herbicides and their mechanism of action. Sheffield Academic Press, Sheffield, U. K. Pp. 1-24.
19. Corbett J. 1984. Herbicides interfering with photosynthesis. The Biochemical Mode of action of pesticides. 2nd edition, Academic Press, London. Pp. 50-98.
20. Correll D. S. y Johnston M. C. 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Texas Research Foundation. Renner, Texas, USA.
21. D'Arcy W. 2001. Solanaceae. En W. D. Stevens, C. Ulloa U., A. Pool y O. M. Montiel (eds.). Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 85, tomo III. St. Louis, Missouri.
22. Dayan F. B., Cantrell C. L. y Duke S. O. 2009. Natural products in crop protection. Biorganic and Medicinal Chemistry. Vol. 17. Pp. 4022-4034.
23. Dayan F. B., Duke S. O. y Grossman K. 2010. Herbicides as probes in plant biology. Weed Science. Vol 58, No. 3. Pp. 340-350.
24. Domínguez Hernández, M. 2012. Ácidos grasos de cadena impar aislados de *Capsicum annum* L. inhibidores de la fotofosforilación. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. Pp. 67.
25. Esser H. U., Dupuis G., Ebert E., Vogel C. y Moreo G. J. 1975. S-triazines. En: Kearney P C, Kaufman D A (eds). Herbicides Chemistry, degradation and mode of action. New York, Vol. 1. Pp. 129-208
26. Franz J. E., Mao M. K. y Sikorski J. A.. 1997. Glyphosphate: a unique global herbicide. ASC Monograph 189, American Chemical Society. Washington, USA.
27. Frömring K. H. y Szejtli J. 1993. Cyclodextrins in Pharmacy. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.

28. Fukuda M., Tsujino Y., Fujimori T., Wakabayashi K. y Böger P. 2004. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids I: effects on cell constituents. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. 80. Pp. 143-150.
29. Gelb R. I., Schwartz L. M., Johnson R. F. y Laufer D. A. 1979. The complexation chemistry of cyclohexaamylose. 4. With formic, acetic, and benzoic acids and their conjugate bases. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 101. Pp. 1869-1874.
30. Gines J. M., Pérez M. J., Arias M. J., Moyano J. R., Morillo E., Ruiz C. A. y Sánchez P.J. 1996. Inclusion of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with β -cyclodextrin by different processing methods. *Chemosp.* Vol. 33. Pp. 321-344.
31. González I. M., Farfán N., Trejo C., Uribe S. y Lotina H. B. 2005 Selective Herbicide Activity of 2,5-Di(benzylamine)-p-benzoquinone against the Monocot Weed *Echinochloa crusgalli*. An *in vivo* Analysis of Photosynthesis and Growth *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53. Pp. 3415-3420.
32. González Moreno S., Perales Velas H., Salcedo Álvarez M. 2008. La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *REB* 27 (4). Pp. 119-129.
33. Govinjee, P. 2004. Chlorophyll a fluorescence a bit of basics and history. En: chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. *Advances in photosynthesis and respiration*. Papageorgiou G. C y Govinjee. (Eds). Alemania. Pp. 321-362.
34. Goycoolea Nocetti E. 2012. Chile, usos y propiedades [consultada: marzo 2014]. Disponible en: <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article7315>
35. Gracia C. En preparación *Ecología forestal: Estructura, funcionamiento y producción de las masas forestales*. Curso teórico-práctico sobre modelización del crecimiento de los bosques y su respuesta a la gestión y al cambio

climático. [Consultado: Junio de 2014]. Disponible en:
<http://www.ub.edu/ecologia/Carlos.Gracia/inicio.htm>

36. Hansen R. P.; Shorland F. B. y Cooke J. N. 1957. Occurrence in Butterfat of n-Heptadecanoic Acid (Margaric Acid). *Nature*, Vol. 179. Pp. 98.
37. Hauska G. y Trebs A. 1977. Artificial acceptor and donors In: *Enciclopedia of Plant Physiology. News series*, Vol 5. Nueva York, USA. Pp. 226-282.
38. Henry G. E.; Momin R. A.; Nair M. G. y Dewitt D. L. 2002. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *Journal Agriculture. Food chemistral*, Vol. 50. Pp. 2231-2234.
39. Karp C. 1996. *Biología Celular y Molecular*. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
40. Kato Noguchi H. y Tanaka Y. 2003. Effects of capsaicin on plant growth. *Biologia plantarum* Vol. 47 (1). Pp 157-159.
41. King Díaz. B. 1999. Bioactividad de compuestos de coordinación de Co (II) Ni(II) y Zn (II) con el ligante emizco en la fotosíntesis y en la germinación y crecimiento de semillas. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM. México. Pp. 72.
42. King Díaz B., Soares M., Das G. F., Da Silva M. F., Lotina Hensen, B y Moura Veiga, T. 2014. Triterpenes from *Cabralea canjerana* as in Vitro Inhibitors to Light Reactions of Photosynthesis. *American Journal of Plant Sciences* Vol. 5, No. 5. Pp. 2528-2540.
43. Kozlovsky D. G. 1968. A critical evaluation of the trophic level concept. I. Ecological efficiencies. *Ecology*, Vol 40. Pp. 48-60.
44. Kuang C. C. 1992. *Fatty acids in Foods and their health implications*. Marcel Dekker, Inc. USA.
45. Labrada R. y Parker C. 1994. *Weed Control in the context of Integrated Pest Management. Weed Management for Developing Countries*. Edited R.

- Labrada, J. C. Caseley y C. Parker, Plant Production and Protection Paper No. 120, FAO, Roma, pp. 3-8.
46. Labrada R., Caseley J .C. y Parker C. 1996. Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. En: Producción y Protección Vegetal Vol. 120. Roma. Pp. 401.
47. Lakowicz. J. R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3era. Edicion, Plenum Press, EUA. Pp. 1-25.
48. Lederer B., Fujimori T., Tsujino Y., Wakabayashi K. y Böger P. 2004. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. Pesticide Biochemistry and Phisiology. Vol. 80. Pp. 151-156.
49. Liu S., Ruan W., Li J., Xu H., Wang J. y Gao Y. 2008. Biological control of phytophogenic fungi by fatty acids. Mycophatology, Vol. 166. Pp. 93- 102.
50. López Riquelme G. O. 2003. Chilli la especia del Nuevo Mundo. Faculta de de Ciencias. Vol. 69. UNAM. México. Pp. 67-75.
51. Lucas A. C., Gabaldón J. A., Penalva J., Fortea M. I. y Núñez D. E. 2008 Preparation and characterization of the inclusión complex of chlorpyrifos in ciclodextrin to improve insecticide formulations. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 56. Pp. 8081-8085.
52. Luo X. J., Peng J., y Li Y. J. 2010. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. European Journal of pharmacology, 650. China. Pp. 1-7.
53. Macías H. P. G. 2012. Herbicidas orgánicos Vs. Herbicidas químicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. Poza rica, México. Pp. 87.
54. Martínez G. y Gómez, M. A. 2007. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. Revista Iberoamericana de polímeros. Vol. 8 (4). Pp. 300-312. Madrid, España.

55. Mill J. D., Michael P. y Schürmann P. 1980. Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplast. *Febs Letters*. Vol. 112., No. 2. Elsevier North. Holland Biomedical Press. Pp. 173-177.
56. Mirsa S., Datta A. K., Chattopadhyay S., Choudhury A. y Ghosh A. 1987. Hydrocarbons and wax esters from seven species of mangrove leaves. *Phytochemical*, Vol. 26. Pp. 3265-3268.
57. Montes H. S. 2010. Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México, informe final. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) México, D.F.
58. Monza J., Signorelli S., Borsani O. y Sainz M. Fotosíntesis. 2013. Pp 26-36. [Consultado: junio 2014]. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~bioquimica/docencia/material%20nivelacion/FOTOS%CDNTESIS.pdf>
59. Morales Flores F. 2007. Fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico de tallos de la planta *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. Para la obtención de agentes herbicidas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México
60. Morales Flores F. 2010. Fraccionamiento biodirigido de la planta *Cecropia obtusifolia*. B. para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. Tesis de Maestría, Facultad de Química. UNAM. México.
61. Morales Flores F. 2014. Síntesis de derivados de metabolitos secundarios aislados de plantas y evaluación de su efecto como posibles herbicidas. Tesis de Doctorado, Facultad de Química. UNAM. México. Pp. 157.
62. Moreland D. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Annual review of Plant Physiology*, Vol. 31. Pp 597-638.

63. Mortimer A. M. Capítulo 2. La clasificación y ecología de las malezas. En: Manejo de malezas para países en desarrollo. Departamento de agricultura. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Pp 13-30. [Consultada: abril 2014]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s06.htm>
64. Nee M., 1986. Solanaceae I. En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 49. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.
65. Nelson D, Cox M. M. 2009 Lehninger principles of biochemistry. 5ta ed. Ed.W.H. Freeman and Company, New York
66. Ochoa Alejo N. y Salgado Garaciglia R. 1992. Phenylalanine ammonia-lyase activity and capsaicin precursor compounds in p- fluorophenylalanine resistant and sensitive variant calls of chili pepper (*Capsicum annum*). *Physiology Plant.*, 85:173-79.
67. Ogulensi M., Okiei W., Ademoye M., Osibote E. A. 2010. Analysis of esencial oil from the stem of *Chansmanthera dependens*. *Journal of Natural Products*, Vol. 3. Pp. 47-53.
68. Ouitrakul R. e Izawa S. 1973. Electron transport and photophosphorilation in chloroplast a funtion of electron acceptor. *Biochemical Biophys. Acta*, Vol 305. Pp. 105-118.
69. Peralta Calito G. M. 2007. Determinación del nivel de pungencia en unidades scoville para *capsicum annum var. Aviculare* procedente de regiones productoras de Guatemala. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. Pp. 66.
70. Raven P. H., Evert R. F y Eichorn. 1999. *Biology of plants*. 6° edición. Freeman and company. New York, New York.

71. Rice L. E. 1997 Biological control of weeds and plant diseases: Advances in applied allelopathy. *Brittonia a Journal of Systematic Botany*. Vol. 49. Oklahoma, pp. 70.
72. Rojas Garcidueñas M. y Gámez González H. 2002. Herbicidas de origen natural. *Ciencia UANL*. Vol. V, No. 2. México, pp 160-164.
73. Rosales R. E. y Medina C. T. Manejo de malezas en cultivos básicos. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). Pp. 26. [consultada: marzo de 2014]. Disponible en: www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento
74. Sampietro D. 2007. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. En: Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho. Argentina. [Consultado: Mayo 2014]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/plantas/alelopatia.htm>
75. Sánchez B. A. 2011. Actividad Herbicida del β -cariofileno aislado de la planta *Senecio salignus*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México. Pp. 80.
76. Siddiqui S. Z. y Zaman A. 2005. Effects of *Capsicum* leachates on germination seedling growth and chlorophyll accumulation in *Vigna radiata* (L.) wilczek seedling. *Journal Botanic* Vol. 37 (4). Pp. 941-947.
77. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. 2009. Base de información SIOVM-CONABIO. México. Consultada en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/21864_sg7.pdf
78. Solarte M. E., Moreno L. y Melgarejo M. Fotosíntesis y Pigmentos vegetales. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia. [Consultado: Junio 2014].

Disponible

en:

http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap02/aneo_13.htm

79. Strasser B. J. 1977. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence, *Photosynthesis Research* 52: 147–155.
80. Strasser R. J. y Stirbet A.D. 2000. Energetic connectivity creates heterogeneity of PS II centres in plants probed by the fluorescence rise O-J-I-P. Fitting of experimental data to three different PS II models. Pp. 81-93. University of Geneva, Department of botany and plant biology.
81. Strasser R. J., Srivastava A. y Govindjee P. 1995. Poliphasic chlorophyll a fluorescence transient in plant and cyanobacteria. *Photochemical Photobiology*, Vol. 66. Pp. 32-45.
82. Strasser R. J., Srivastava A. y Tsimilli M. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. En: Papagero G. C. y Govindjee (Eds), *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Pp. 321-362.
83. Strasser, R.J., Tsimilli- Michael, M. y Srivastava, A. 2004. Analysis of the fluorescence transient. En: *Chlorophyll Fluorescence: a signature of photosynthesis*. Papageorgiu, G. y Govindjee (Eds). Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
84. Szejtli J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* Vol. 98 (5). Pp. 1743-1753.
85. Tóth S., Schansker G., Strasser R. J. 2005. In intact leaves, the maximum fluorescence level (F_M) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: a DMCU inhibition study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1708, 275-282.

86. Trebs A. 1972. Measurement of Hill reactions and Photoreduction. Methods in Enzymol Vol. 24. Pp. 146-153.
87. Tsimilli M. M. y Strasser R. J. 2008. In vivo assessment of stress impact on plant vitality: applications in detecting and evaluation the beneficial role of mycorrhization on host plant. En: Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Ecofunction, Biotechnology, Eco-physiology, Structure and Systematic, 3era Ed. Varma A (Ed) Springer, Alemania. Pp. 679-703.
88. Tsimilli- Michael, M. y Strasser, R.J. 2008. Experimental resolution and theoretical complexity determine the amount of information extractable from the chlorophyll fluorescence transient OJIP. En: Allen, J. F.; Gantt E., Golberck J. H. y osmond, B. (Eds). Photosynthesis. Energy from the sun, 14th International congress on photosynthesis; Springer Netherlands, pp. 697- 701.
89. Urzúa S. F. 2014. Principios del manejo integrado de malezas. Parasitología agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo. México. Pp. 14
90. Vázquez Flota F., Miranda Ham M. L., Monforte González M., Gutiérrez Carbajal G., Velázquez García C. y Nieto Pelayo Y. 2007. Biosynthesis of capsaicinoids, the pungent principle of peppers. Revista Fitotecnología Vol. 30 (4). CICY. Mérida, Yucatán, México. Pp. 353- 360.
91. Vibrans H. 2009. Malezas de México. *Capsicum annum* L. México. Consultada en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/capsicum-annuum/fichas/ficha.htm#9>
92. Waizel B. J. y Camacho M. R. 2011. El genero *Capsicum spp.* ("Chile"). Una versión panorámica. Revista de divulgación científica y tecnológica, Alep Zero Año 16, número 60. Universidad de las Américas Puebla. México. Pp. 1-13.

93. Walter R. H. 2000. Polysaccharide Association Structures and Methods in Supramolecular. Chemistry. John Wiley & Sons, New York.
94. Weete J. D., Rivers W. G. y Weber D. J. 1970. Hydrocarbon and fatty acid distribution in the halophyte, *Salicornia bigelovii*. Phytochemical, Vol. 9. Pp.2041-2045.
95. Yruela I., Montoya G., Alonso P. J. y Picorel L. 1991. Identification of the pheophytin QA-Fe domain of the reducin side of the photosystem II as the Cu(II) inhibitory binding side. Journal Biology Chemicals, Vol. 266. Pp. 22847-22850.

APENDICES

Apéndice 1

Medios

- Medio de Aislamiento de cloroplastos

Compuesto	Concentración (mM)
Sacarosa	400
KCl	20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5
Tricina	15

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- Medio de transporte de electrones con MV

Compuesto	Concentración (mM)
Sacarosa	100
KCl	10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5
Tricina	1
KCN	0.5
MV	50 µM

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- Medio de transporte de electrones sin MV

Compuesto	Concentración (mM)
Sacarosa	100
KCl	10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5

Tricina	1
KCN	0.5

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

- **Medio de transporte de electrones para Fotosistema II**

Compuesto	Concentración
Medio de transporte sin MV	Aforo
NH ₄ Cl	6mM
DCPIP*	100 µM
K ₃ [Fe(CN) ₆]	300 µM

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

*se prepara el mismo día

- **Medio de transporte de electrones para Fotosistema I**

Compuesto	Concentración
Medio de transporte de electrones	Aforo
NH ₄ Cl	6mM
DCPIP*	100 µM
Ascorbato de Sodio	300 µM

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

*se prepara el mismo día

- **Medio de transporte de electrones de H₂O-SiMo**

Compuesto	Concentración
Medio de transporte de electrones sin MV	Aforo

NH ₄ Cl	6mM
SiMo*	200μM

Ajustar el pH a 8.0 con KOH

*se prepara el mismo día

Medios para Actividad de H⁺-ATPasa

- Medio de aislamiento de cloroplastos

Compuesto	Concentración
Sorbitol	0.35 M
Ácido ascórbico	5 mM
MES	20 mM

Ajustar el pH 6.5 con KOH

- Medio de re-suspensión

Compuesto	Concentración
Sorbitol	0.35 M
EDTA	2 mM
MgCl ₂	1 mM
MnCl ₂	1 mM
Hepes	50 mM

Ajustar pH=7.6 con KOH

- Medio de activación 1 (i)

Compuesto	Concentración
Sorbitol	1.2 M
Hepes	100 Mm

Ajustar pH= 8.0 con KOH

- **Medio de activación 2 (ii)**

Compuesto	Concentración (mM)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5
Hepes	15

Ajustar pH= 8.0 con KOH

- **Medio de hidrolisis de ATP**

Compuesto	Concentración (mM)
NH ₄ Cl	1.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2
Hepes	15
ATP	2.2

Ajustar pH= 8.0 con KOH