



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de ácidos grasos saturados e
insaturados como inhibidores de la cadena
de transporte de electrones en la fotosíntesis**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSCAR LAURRABAQUIO RODRÍGUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Beatriz King Díaz
Ciudad Universitaria. CDMX. 2017.**



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.

Datos del alumno

Laurrabaquio

Rodríguez

Oscar

59 08 35 63

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

309166670

2. Datos del Tutor

M. en C.

Beatriz

King

Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Saúl

Gómez

Manzo

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Ángela

Forero

Forero

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Sobeida

Sánchez

Nieto

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Paulina

Mendoza

von der Borch

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de ácidos grasos saturados e insaturados como inhibidores de la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis.

57 Pp

2017

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	8
2.1 Malezas.....	8
2.2 Herbicidas.....	9
2.3 Fotosíntesis.....	12
2.3.1 Cloroplasto.....	14
2.3.2 Clorofila.....	15
2.3.3 Fotosistemas.....	16
2.4 Reacción de Hill.....	18
2.5 Transporte de electrones estado basal, fosforilante y desacoplado.....	19
2.6 Fluorescencia de la clorofila a.....	20
2.7 Curva de Kautsky.....	20
2.8 Prueba OJIP.....	22
2.9 Ácidos grasos.....	23
OBJETIVOS.....	25
HIPÓTESIS.....	25
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	26
5.1 Aislamiento de cloroplastos aislados a partir de hojas de espinaca (<i>Spinacia oleraceae. L.</i>).....	26
5.2 Medición de la concentración de clorofila a.....	26
5.3 Medición del transporte de electrones fotosintético no cíclico de agua a MV.....	27
5.4 Medición del transporte de electrones del fotosistema II.....	28
5.5 Medición del transporte de electrones del fotosistema I.....	29
5.6 Medición de las reacciones parciales del fotosistema II.....	29

5.7 Medición de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en cloroplastos aislados de hojas de espinacas (<i>Spinacia oleraceae</i>).....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1 Efecto de los ácidos grasos: palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquídico y araquidónico en la cadena transportadora de electrones.....	31
6.2 Efecto de los ácidos grasos sobre el transporte de electrones desacoplado de los FS II y I.....	35
6.3 Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	38
Conclusiones.....	46
Perspectivas.....	47
Referencias.....	48
Anexos.....	56

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
Cyt <i>b_{6f}</i>	Complejo Citocromo <i>b_{6f}</i>
DBMIB	2,5-Dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
D1	Proteína PsbA del centro de reacción del fotosistema II
D2	Proteína PsbD del centro de reacción del fotosistema II
DCMU	3-(3,4-Dibromo-fenil)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6-Dicloro fenol indofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
F	Fluorescencia
F ₀	Fluorescencia inicial
F _m	Fluorescencia final
FS I	Fotosistema I
FS II	Fotosistema II
LHCs	Complejo cosechador de luz
<i>μequiv</i>	Micro equivalentes
μg	Microgramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MSP	Proteína estabilizante de manganeso
MV	Metil Viológeno
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato estado oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato estado reducido
Nm	Nanometros
P ₆₈₀	Centro de reacción del FSII

P ₇₀₀	Centro de reacción del FSI
PC	Plastocianina
Phe	Feofitina
Pi	Fosfato inorgánico
Q _A	Plastoquinona A
Q _B	Plastoquinona B
PQ	Plastohidroquinona reducida
Q _K	Filoquinona
SiMo	Silicomolibdato
Yz	Tirosina

RESUMEN

Las plagas son poblaciones de animales, plantas o fúngicas que atacan y destruyen los cultivos, y son un tema de interés para los productores de alimentos, ya que sus efectos se traducen en pérdidas económicas si no son controladas o erradicadas. Los plaguicidas son sustancias químicas utilizadas para el control de las plagas y dentro de los plaguicidas encontramos a los herbicidas, sustancias químicas para el control de malezas, que son plantas que crecen donde no son deseadas por el hombre.

Los ácidos grasos son moléculas lipídicas que consisten de cadenas hidrocarbonadas de longitud variable con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo y un grupo metilo (-CH₃) en el extremo terminal, algunos de ellos como el ácido linoleico, el oleico, el mirístico y el esteárico, entre otros, han sido ensayados por diferentes autores para observar su efecto en la fase luminosa de la fotosíntesis, en especial como inhibidores de la reacción de Hill.

E inclusive el ácido pelargónico, un ácido graso alifático de 9 átomos de carbono que está presente en muchas plantas ha sido utilizado como herbicida en los Estados Unidos.

En nuestro laboratorio, en la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida, se encontró que las fracciones, hexánica de la planta *Cecropia obtusifolia* y clorofórmica de tallos de *Xylosma flexuosa*, dichas fracciones inhibían la fotofosforilación en cloroplastos aislados de hojas de espinaca con valores de I₅₀ de 94.2 y 8.5 µg/mL respectivamente, dichas mezclas contenían ácidos grasos como el esteárico (18:0), araquídico (20:0), láurico (12:0), palmítico (16:0) y linoleico (18:1).

Por esta razón, en este trabajo, se evaluaron los efectos de varios ácidos grasos como el palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquídico y araquidónico en cloroplastos aislados de espinaca, con la finalidad de determinar su efecto en la cadena transportadora fotosintética y conocer si estos ácidos grasos también pueden ser empleados como posibles herbicidas. Los ensayos se corroboraron con estudios de fluorescencia de la clorofila a (Chl a) y

los resultados encontrados se compararon con los resultados de estudios anteriores reportados en la bibliografía.

Se encontró que los ácidos grasos que resultaron activos como inhibidores del transporte de electrones fotosintético fueron aquellos que presentaban dobles enlaces en su estructura (desde uno hasta cuatro), los ácidos grasos saturados no presentaron efecto inhibitorio. Los ácidos más activos como inhibidores del transporte de electrones desacoplado fueron el oleico y el araquidónico, cuyos valores de I_{50} fueron de 13.12 ± 7.9 y $17.19 \pm 4.0 \mu\text{M}$ respectivamente. El sitio de inhibición encontrado para los ácidos grasos activos fue el lado aceptor de electrones del fotosistema II (FS II), similar al encontrado para el DCMU, sin embargo, el ácido oleico y el palmitoleico también inhibieron el lado donador de electrones del FS II, lo cual fue observado por medio de ensayos de fluorescencia.

INTRODUCCIÓN

Las malezas compiten con las plantas de interés agronómico por los nutrientes del suelo, agua y luz. Si las malezas no se controlan a tiempo pueden causar disminución en el rendimiento del cultivo y la superficie cultivable (Auld, 1996; Menalled, 2010).

En 1968, Katoh y Pietro propusieron que los ácidos grasos inducían la inhibición de la reacción de Hill como resultado de un daño en el fotosistema II. Dichos autores mostraron que el ácido linolénico aparentemente inhibía tanto el fotosistema II (FS II) como el fotosistema I (FS I), más tarde Cohen y colaboradores en 1969 corroboraron los resultados de Katoh y Pietro al añadir concentraciones crecientes de ácido linolénico a preparaciones de cloroplastos aislados de diferentes plantas y de algas como *Chlorella* y *Porphyridium*, midiendo la emisión de fluorescencia con un espectrofluorímetro en un cuarto frío a bajas temperaturas (-196 °C) y también a temperatura ambiente. Además, midieron el efecto de los ácidos grasos en la reducción del ferricianuro en estas mismas preparaciones, determinado como liberación de oxígeno. Otros ácidos grasos saturados como el láurico, el mirístico y el esteárico también fueron ensayados por Cohen y colaboradores en 1969, pero no mostraron efecto, o el efecto fue insignificante.

Se sabe que el estrés y la senescencia en las plantas inhiben el transporte de electrones fotosintético (Kaniuga *et al.*, 1986), esta inhibición ha sido correlacionada con la presencia de ácidos grasos, especialmente los poliinsaturados, los cuales son liberados desde los lípidos de las membranas, por la acción de las lipasas endógenas McCarthy y Jagendorf (1965), la adición de ácido linolénico a cloroplastos frescos y lisados causa un daño semejante al que ocurre cuando los cloroplastos son aislados a pH 6.0 o inactivados por un calentamiento ligero, sugiriendo que el calor también activa a las lipasas hidrolizando los lípidos de las membranas y liberando los ácidos grasos. (McCarthy y Jagendorf, 1965), también propusieron que los ácidos grasos disocian la actividad del flujo de electrones de la fotofosforilación actuando de este modo como desacoplantes, lo que posteriormente fue demostrado por Siegent en 1973,

quién encontró que algunos ácidos grasos (linolénico, linoleico y oleico) se comportaban como disociadores de la actividad del flujo de electrones de la fotofosforilación, actuando así como desacoplantes, encontrándose una correlación entre el daño a las membranas fotosintéticas durante el estrés y el envejecimiento con la presencia de ácidos grasos libres (Golbeck *et al.*, 1980).

En 1983, Vernotte y colaboradores demostraron que al adicionar ácido linolénico a tilacoides aislados de chícharo se inhibía el transporte de electrones fotosintético a nivel del FS II con un mecanismo similar al del diclorometil urea (DCMU).

En 2003, Peters y Chin, encontraron que el ácido palmitoleico (16:1), un ácido graso monoinsaturado inhibe el transporte de electrones, con una inhibición rápida (30 s aproximadamente), en el lado oxidante del FS II (~ 90 % de inhibición) sin inhibir el lado reductor. La actividad del FS I fue inhibida 65 % por este ácido, esta inhibición no correlaciona con la per-oxidación de los lípidos, pero si con la pérdida de proteínas de la membrana tilacoidal como la plastocianina (PC), la proteína estabilizante de manganeso (MSP), el citocromo *f* (Cyt *f*), proteína PsbA del centro de reacción del fotosistema II (D1) y proteína PsbD del centro de reacción del fotosistema II (D2).

Por otro lado, los ácidos caprílico y pelargónico de 8 y 9 átomos de carbono respectivamente son herbicidas efectivos, no selectivos de amplio espectro para especies de malezas anuales (Coleman y Penner, 2008).

En la búsqueda de compuestos naturales que inhiban la fotosíntesis, León (2009) encontró que la fracción clorofórmica de tallos de la planta *Xylosma flexuosa* y Morales-Flores (2010) que la fracción hexánica de la planta *Cecropia obtusifolia*, inhibían la fotofosforilación en cloroplastos aislados de hojas de espinaca con valores de I_{50} de 94.2 y 8.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, ambas fracciones compuestas por mezclas de ácidos grasos. Las mezclas estaban conformadas por ácidos grasos como el esteárico (18:0), araquídico (20:0), behénico (22:0), pero también contenían en menor cantidad, ácido láurico (12:0), palmítico (16:0) y linoleico (18:1). En este trabajo se ensayaron ácidos grasos con longitud de cadena desde 16 hasta 20 átomos de carbono sin y con insaturaciones

(desde uno hasta cuatro) para conocer su efecto en el transporte de electrones fotosintético utilizando las técnicas polarográficas y de la fluorescencia de la Chl *a* en cloroplastos frescos aislados de hojas de espinaca.

ANTECEDENTES

Malezas

Aquellas plantas que interfieren con la actividad humana en áreas cultivables son consideradas malezas (Labrada y Parker, 1996). La agrupación de las malezas es subjetiva y no hay clasificación absoluta, en la tabla 1 se muestran las diferentes maneras de cómo se pueden clasificar los tipos de malezas (Mortimer, 1996).

Tabla 1 Algunas clasificaciones de las malezas. Tomado de Mortimer, 1996.

<i>Clasificación</i>	<i>Incluyen</i>
Ciclo de vida	<ul style="list-style-type: none">• Anuales: Tiempo de vida menor a un año.• Perennes: Viven por más de un año.
Tipo de hoja	<ul style="list-style-type: none">• Hoja angosta: Como gramíneas y Ciperáceas.• Hoja ancha: Como el amaranto.• Rastreras: Tallo postrado en la superficie del suelo.
Hábitos de crecimiento	<ul style="list-style-type: none">• Erectas: Tallo vertical.• Trepadoras o enredaderas: Crecimiento sobre otras plantas teniendo como base el suelo.

El control de las malezas es indispensable para tener un mejor rendimiento en los cultivos. Para poder manejar adecuadamente cualquier tipo de maleza se deben de tener en cuenta factores como la identificación de la maleza y su grado de infestación; así como métodos de control efectivos, viables económicamente y con bajo impacto ambiental (Labrada y Parker, 1996; Menalled, 2010; Urzúa, 2016)

Los métodos de control de malezas de acuerdo con Labrada y Parker (1996) incluyen:

- Métodos preventivos: procedimientos de cuarentena, para prevenir la presencia de malezas al área de cultivo.
- Métodos físicos: procedimientos manuales con la ayuda de herramientas como la azada o el machete, así como labores de cultivo.
- Métodos culturales: como la rotación de cultivos, distancia de siembra, policultivos y manejo de agua entre otros.
- Control biológico: a través de enemigos naturales específicos para el control de las malezas.
- Control químico: mediante el uso de compuestos naturales o sintéticos llamados herbicidas.

Herbicidas

Un herbicida es una sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizada para erradicar o inhibir el crecimiento de poblaciones de malezas. Los herbicidas se clasifican de acuerdo a su aplicación, selectividad, tipo de absorción, comportamiento en el suelo, tipo de acción y familia química (Macías, 2012). En la tabla 2 se presenta la clasificación de herbicidas de acuerdo con Caseley (1996) y Macías (2012).

Tabla 2. Clasificación de los herbicidas (Caseley, 1996; Macías, 2012)

Clasificación por:	Tipos:
Método de aplicación	<ul style="list-style-type: none"> • Pre-emergencia: Aplicados después de la siembra pero antes de la emergencia de la maleza y del cultivo. • Emergencia: Solo aplicados cuando las plántulas de las malezas brotan del suelo. • Post-emergencia: Aplicados durante el crecimiento del cultivo y de la maleza.
Selectividad	<ul style="list-style-type: none"> • Selectivos: Eliminan malezas sin dañar significativamente al cultivo. • No selectivos: Ejercen su acción sobre las malezas pero también sobre el cultivo.
Comportamiento en el suelo	<ul style="list-style-type: none"> • Poco persistentes: De 1 a 2 meses • De persistencia media: Activos al menos la mitad del ciclo de cultivo • Persistentes: Todo el tiempo del cultivo y parte del tiempo de cosecha. • De largo poder residual: Un año o más.
Tipo de acción	<ul style="list-style-type: none"> • De contacto: Acción solo en área de la planta con la que entran en contacto. • De translocación o sistemáticos: Son transportados a toda la planta, raíces, tallos, hojas etc.
Familia química	<ul style="list-style-type: none"> • Compuestos orgánicos: En su mayoría compuestos sintéticos. • Compuestos inorgánicos: Generalmente sales de metales, actúan como herbicidas no selectivos.

Los herbicidas afectan en su mayoría la fotosíntesis, pero también afectan otros mecanismos como la división celular, el crecimiento, incluso algunos pueden

afectar más de un punto. En la tabla 3 se describen los puntos de acción de los herbicidas (Mendoza, 2011).

Tabla 3. Sitios de acción de los herbicidas (Caseley, 1996; Mendoza, 2011)

Sitio de acción	Descripción
Inhibidores de la fotosíntesis	<ul style="list-style-type: none"> • Desacoplantes y formación de radicales libres. • Destrucción de membranas. • Necrosis, apariencia mojada de la hoja y desecación.
Inhibidores de la síntesis de pigmentos	<ul style="list-style-type: none"> • Interferencia con enzimas de la síntesis de: clorofilas, y carotenos, pérdida de protección contra radicales y blanqueo (clorosis).
Inhibidores de la síntesis de lípidos	<ul style="list-style-type: none"> • Afectaciones a la membrana celular. • Pérdida de la cutícula de las hojas. • Aumento de la susceptibilidad a plagas. • Necrosis de meristemas.
Inhibidores de la división celular	<ul style="list-style-type: none"> • Interferencia en la mitosis, puntas de las raíces abultadas.
Inhibidores de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> • Mimetismo de hormonas. • Formación de tumores y callos. • Pérdida de los mecanismos de translocación y absorción.
Inhibidores de la síntesis de aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> • Afectaciones a la síntesis de proteínas y enzimas. • Alteración del metabolismo.

Los herbicidas disponibles comercialmente que interfieren con la fotosíntesis son presentados como desacoplantes o aceptores de electrones, generalizando el daño en el transporte de electrones fotosintético en el extremo reductor del FS II. En la tabla 4 se presentan algunos ejemplos de herbicidas sintéticos y su sitio de acción específico.

Tabla 4. Herbicidas y su sitio de acción. Tomado de Flores (2015)

Compuesto	Sitio de acción
<i>Triazinas de Azufre</i>	Fotosistema II (Esser <i>et al.</i> , 1975)
<i>Diquat y Paraquat (MV)</i>	Fotosistema I (Calderbank <i>et al.</i> , 1976)
<i>Glifosato</i>	EPSP sintasa (Franz <i>et al.</i> , 1997)
<i>Sulfonil ureas</i>	Acetolactato sintasa (Beyer <i>et al.</i> , 1988)
<i>Ariloxifenoxipropianatos</i>	Acetil-CoA carboxilasa (Cobb, 1992)
<i>Atrazina</i>	Oxidación del agua (Campbell <i>et al.</i> , 2004)
<i>Diuron</i>	Transferencia de electrones a plastoquinona (Campbell <i>et al.</i> , 2004)

Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas convierten la energía luminosa, CO₂ y H₂O en energía química, es un proceso fundamental para la vida (González *et al.*, 2008).

La fotosíntesis en las plantas comprende dos procesos: las reacciones dependientes de la luz que ocurren cuando las plantas son iluminadas y las reacciones de asimilación de carbono. En las reacciones dependientes de la luz, como su nombre lo indica, la Chl a y otros pigmentos fotosintéticos absorben la luz y conservan la energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), además se produce la liberación de O₂. En las reacciones de asimilación de carbono se utiliza el ATP y NADPH para reducir el CO₂, obteniendo como productos almidón y otros azúcares (Nelson y Cox, 2005).

Para explicar de manera general el fenómeno de las reacciones luminosas o reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis se utiliza el esquema Z (Figura 1), el cual nos muestra la manera en que la fotosíntesis oxigénica se lleva a cabo a través de dos fotosistemas (FS II y FS I) conectados en serie por medio del complejo citocromo (Cyt) b_6f . En el complejo Cyt b_6f está la proteína Rieske conocida por tener hierro-azufre (Fe-S), un citocromo f y dos moléculas de citocromo b , la molécula de plastocianina PC transfiere los electrones de Cyt b_6f a FS I.

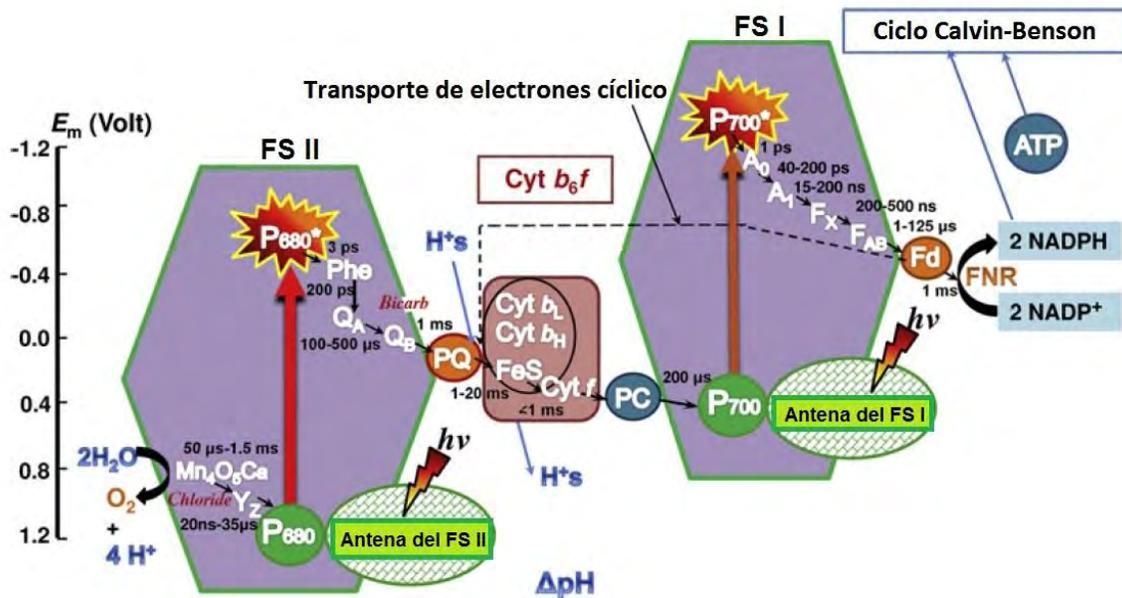


Figura 1. Esquema Z para el transporte de electrones en la fotosíntesis de agua a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$). Se muestran el FS II y FS I conectados a través del Cyt b_6f , así como el sistema oxidante del agua, que produce O_2 y la producción final de NADPH. En el sistema oxidante del agua y en el Cyt b_6f se produce un gradiente de pH que favorece la síntesis de ATP. Los componentes redox se encuentran acomodados según su participación en el transporte de electrones fotosintético y sus valores de potencial de reducción, lo que resulta en un esquema que parece una zeta. Modificado de Stirbet, Govindjee (2011).

Cloroplasto

Los organismos capaces de realizar el proceso de la fotosíntesis son muy diversos, pero podemos distinguir una particularidad ya que mientras los procariontes fotosintéticos realizan dicho proceso en las membranas plasmáticas, los eucariontes fotosintéticos lo hacen en membranas localizadas dentro de organelos conocidos como cloroplastos (Garrett y Grisham, 2005).

Un cloroplasto presenta una doble membrana (interna y externa), la membrana interna envuelve una sustancia llamada estroma, en la cual se encuentran embebidos las granas que están conformadas por los tilacoides, los tilacoides son pequeñas vesículas membranales aplanadas y apiladas una encima de otra (Figura 2), el interior del tilacoide se denomina lumen tilacoidal, las membranas tilacoidales se encuentran llenas de pigmentos fotosintéticos, por ello las reacciones de la fotosíntesis ligadas a la luz tienen lugar en los tilacoides (Garrett y Grisham, 2005; Nelson y Cox, 2005).

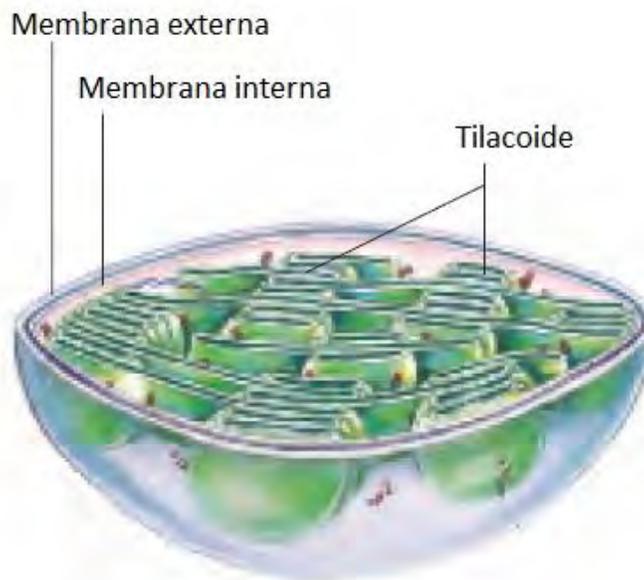


Figura 2. Imagen de un cloroplasto con sus componentes principales señalados. Figura adaptada de Nelson y Cox (2005).

Clorofila

La clorofila es un pigmento fotosintético contenido en los cloroplastos, existen dos tipos la clorofila: *a* (Chl *a*) y *b* (Chl *b*), aunque las dos sean de color verde su espectro de absorción es suficientemente distinto para complementar el rango de absorción lumínica uno al otro. La estructura de la molécula de clorofila consiste en un sistema heterocíclico de cuatro anillos unidos por enlaces sencillos y dobles de manera alternada rodeando un núcleo de Mg^{2+} , además de una cadena de fitol (alcohol de cadena larga) esterificada a un grupo carboxilo sustituido en el anillo IV (Figura 3). La clorofila siempre está asociada con proteínas específicas formando parte de los complejos cosechadores de luz (LHCs), en estos complejos las moléculas de clorofila están agrupados en relación con otros complejos semejantes dentro de una membrana (Nelson y Cox, 2005).

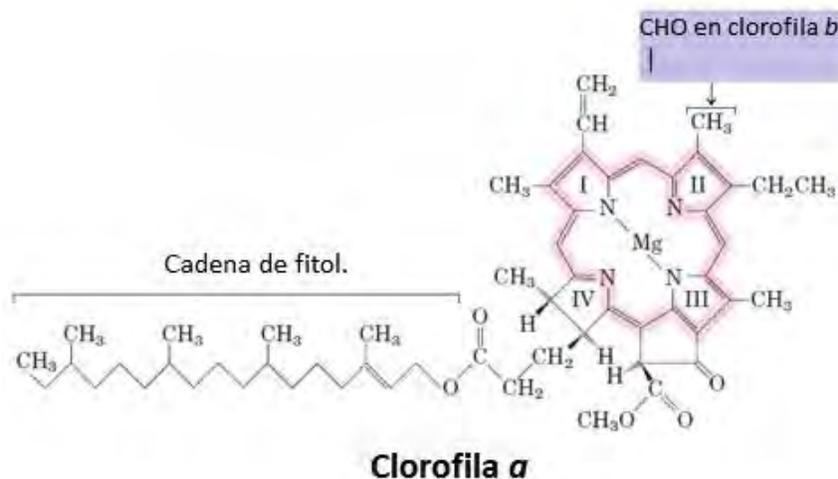


Figura 3. Estructura de una molécula de Chl a, se observa el anillo rodeando el núcleo de magnesio y la cadena de fitol en el anillo IV, la Chl b solo cambia en el anillo II ya que CHO sustituye al CH_3 original de la clorofila a. Figura adaptada de Nelson y Cox, 2005

Fotosistemas

En los centros de reacción, donde se reciben los fotones, se encuentran dos tipos de complejos proteicos asociados a Chl *a* y *b*, el FS II y el FS I, aunque ambos fotosistemas contienen el mismo dímero de clorofila, los picos de absorción son distintos, ya que mientras el FS I absorbe longitudes de onda de 700 nm (conocido como P₇₀₀) el FS II absorbe longitudes de onda de 680 nm (P₆₈₀). El FS II cuenta con un LHCs para las primeras etapas del transporte de electrones no cíclico. El FS I también cuenta con un LHCs, y lo utiliza para la segunda etapa del transporte de electrones no cíclico, además recoge electrones energéticos de la primera etapa proveniente del FS II. La energía lumínica es utilizada en este FS I para potenciar la energía de los electrones y proveer de energía en forma de coenzimas reducidas al ciclo de Calvin (Olmo y Nave, 2016).

El centro de reacción P₆₈₀ es el primer donador de electrones de FS II (Figura 4), como primer paso hay una molécula de feofitina (Phe), molécula de clorofila pero sin el grupo Mg²⁺ en el centro, como primer aceptor de electrones del FS II, posteriormente se encuentra P_{QA} como la primera plastoquinona aceptora de electrones y P_{QB} como la segunda plastoquinona aceptora de electrones, separando a ambas plastoquinonas se encuentra un ion de bicarbonato sujeto a hierro, una vez que la P_{QB} toma el electrón esta se separa del FS II (Stirbet y Govindjee, 2011). FS II cuenta con un clúster tetranuclear de Manganeso-Calcio-Oxígeno (Mn₄O₅Ca) y Yz (tirosina-161 de la proteína D1), ya que después de que cede un electrón y queda como P₆₈₀⁺ debe volver a su estado reducido recuperando un electrón para poder capturar otro fotón; entonces Yz que es su donador inmediato, recupera su falta de electrones y protones oxidando el clúster tetranuclear al llevar a cabo la fotólisis del agua tomando cuatro electrones de un par de moléculas de agua, liberando cuatro moléculas de hidrógeno y una de oxígeno, y llenando así con el electrón faltante a la clorofila del FS II (Nelson y Cox 2005).

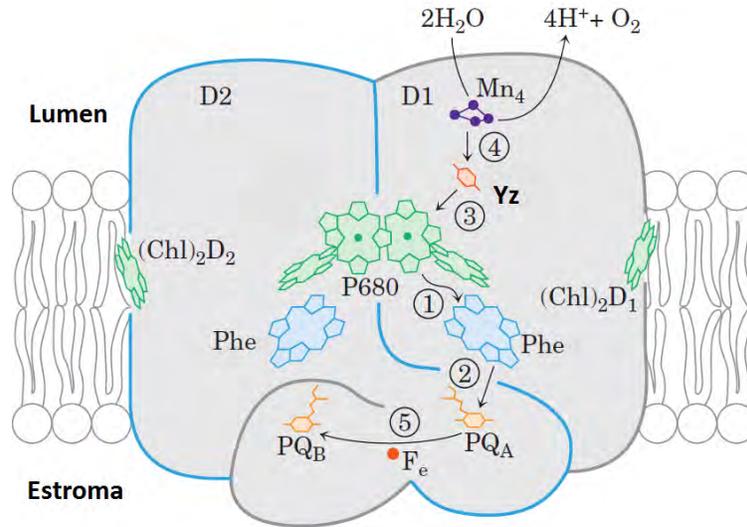


Figura 4. Fotosistema II conformado por dos proteínas (D1 y D2). Enumerado en círculos la figura muestra las secuencias de la ocurrencia de los eventos fotoquímicos en el transporte de electrones, se observa la fotólisis del agua número 4 en la que toman lugar el clúster tetra nuclear de Manganeso-Calcio-Oxígeno (Mn_4) y la tirosina (Yz), con el número 3 se observa el reemplazo de los electrones perdidos por parte del FS II (P_{680}), con el número 1 se observa el paso de los electrones de P_{680} a la feofitina (Phe), el número 2 representa la entrega de la entrega de electrones a las plastoquinonas A y B (PQ_A y PQ_B) para su posterior transporte al complejo citocromo y después al FS I. Figura tomada de Nelson y Cox (2005).

Las reacciones que se llevan a cabo en el FS I (Figura 5) son similares a las que suceden en el FS II, el centro de reacción excitado P_{700}^* cede un electrón pero en este caso a $(Chl)A_0$, que es una molécula especial de clorofila con un funcionamiento homólogo a la Phe del FS II, $(Chl)A_0$ pasa su electrón a filoquinona (Q_K), posteriormente Q_K transfiere el electrón a una proteína hierro-azufre (Fe-S) mediante tres centros Fe-S (F_X , F_A y F_B), de aquí el electrón se mueve a la flavoproteína ferredoxina que transfiere electrones a $NADP^+$ para producir NADPH (Nelson y Cox, 2005).

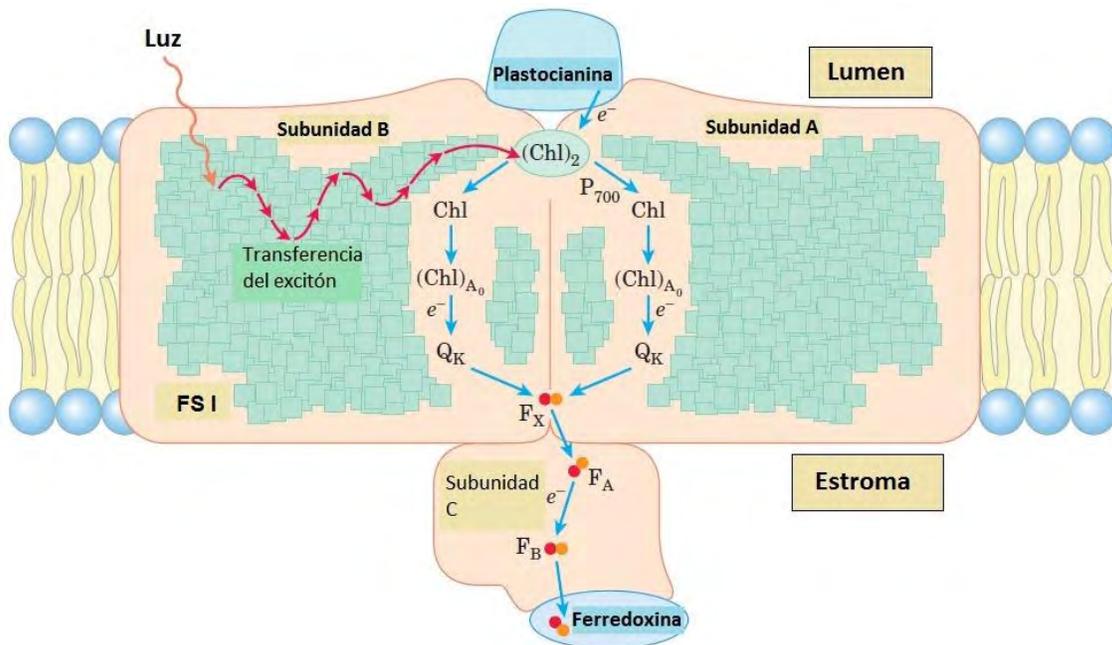
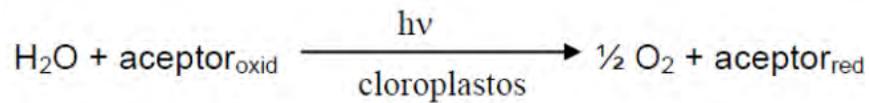


Figura 5. Fotosistema I y la continuación del flujo de electrones proveniente del FSI, en esta imagen se observa el flujo de electrones llegados P_{700} para posteriormente ser entregados en cadena a $(Chl)A_0$ (clorofila análoga a la Phe), después a la filoquinona (Q_K), luego a una proteína hierro-azufre (Fe-S) conformada por tres centros Fe-S (F_X , F_A y F_B) y por último a la ferredoxina, el punto final del trabajo de ambos FSI y FSII es la entrega de recursos energéticos en forma de NADPH para que pueda llevarse a cabo el ciclo de Calvin. Figura tomada de Nelson y Cox 2005.

Reacción de Hill

En 1937 Robert Hill encontró que una suspensión de cloroplastos iluminada en presencia de un aceptor de electrones liberaba O_2 , al mismo tiempo el aceptor de electrones se reducía. Como aceptor natural de electrones tenemos a $NADP^+$, pero en el laboratorio se suele utilizar ferricianuro de potasio como aceptor artificial de electrones que se reduce a ferrocianuro, ya que cualquier reactivo utilizado como aceptor de electrones en esta reacción se puede considerar como reactivo de Hill. (Reacción 1) (Cobb y Kirkwood, 2000; Lallana y Lallana, 2001; Taiz y Zeiger, 2006).



Reacción 1. Ecuación que muestra la reacción de Hill como la fotorreducción de un aceptor de electrones a de una molécula de agua. Fuente (Lallana y Lallana, 2001).

Transporte de electrones estado basal, fosforilante y desacoplado

La acción de los inhibidores fotosintéticos se ha podido monitorear *in vitro* midiendo la liberación de O₂ por parte de la reacción la reacción de Hill. La diferencia en la cantidad oxígeno puede ser monitoreada mediante el uso de un oxímetro.

Saha y colaboradores en 1971 estudiaron los efectos de los diferentes aceptores de electrones en el transporte de electrones no cíclico y como estos afectaban la fosforilación, ellos encontraron que al usar una serie de aceptores de electrones convencionales como: ferricianuro, metilviológeno, algunas flavinas, etc. Todos eran reducidos a bajas velocidades en ausencia de la fosforilación (estado basal), esta velocidad de reducción aumentaba considerablemente cuando ADP y Pi se añadían (transporte fosforilante), y al agregar desacoplantes tales como la metilamina incrementaban la velocidad de reducción de los aceptores todavía más que con ADP y Pi (transporte desacoplado). Así, las máximas velocidades del transporte de electrones, ya sea fosforilante, no fosforilante o desacoplado eran las mismas con cualquier aceptor de electrones eficiente, independientemente de la concentración del aceptor. Así, para dilucidar el mecanismo de acción de compuestos que inhiben la síntesis de ATP, se estudian sus efectos en el transporte de electrones bajo las condiciones fosforilante, no fosforilante y desacoplado, indicando si se comportan como inhibidores del transporte de electrones, inhibidores de la transducción de energía o desacoplantes (González-Vázquez et al., 2006).

Fluorescencia de la clorofila a

En los complejos antena, la energía de un fotón absorbido se suma a la de la molécula del pigmento que lo absorbe, quedando así el pigmento en un estado excitado y con la tendencia a ceder el exceso de energía. Esta des-excitación se efectúa por tres rutas: a) pérdida de energía en forma de calor, b) como transferencia de energía a otras moléculas cercanas y c) liberación de la energía radiante (fluorescencia); la transferencia de energía va de las clorofilas de las antenas hacia los centros de reacción y al perder la clorofila el electrón y transferirlo a los aceptores de electrones se produce el fenómeno de separación de carga eléctrica resultando una clorofila a oxidada ($\text{Chl } a^+$) y una molécula de feofitina aceptora del electrón reducida (Phe^-), esto se conoce como evento fotoquímico primario y utiliza aproximadamente el 97 % de la energía de los fotones absorbidos. Del 3 % restante, 2.5 % son transformados en calor y 0.5 % son re-emitidos como luz fluorescente roja. Si los centros de reacción del fotosistema II están cerrados, es decir la Q_A se encuentra reducida, no ocurre la separación de la carga y el 95-97 % de la energía luminosa absorbida se libera como calor y 2.5-5.0 % como fluorescencia (Pérez-Urria, 2009; González *et al.*, 2008; Bolhàr-Nordenkamf *et al.*, 1993).

La fluorescencia de la clorofila a es una de las herramientas más utilizadas en la investigación fotosintética para determinar su actividad (Strasser, 1997; Strasser *et al.*, 2004).

Curva de Kautsky

La curva de inducción de la fluorescencia o curva de Kautsky, tiene dos fases una denominada fase rápida (relacionada principalmente con los eventos primarios del fotosistema II) e incluye los momentos (O, I, D, P), la fase lenta asociada principalmente con procesos que ocurren en las membranas de los tilacoides, así como procesos metabólicos en el estroma relacionados con el

aumento de la asimilación de CO₂, incluye los momentos (P, S, M, T) (Figura. 6) (Bolhàr-Nordenkamf *et al.*, 1993).

En la fase rápida, la primera señal (O) es la fluorescencia inicial o basal, coincide con que en este punto Q_A está en su mayoría oxidada. La segunda fase (I) corresponde a reducción de Q_A. La fase D (declive) indica la oxidación de Q_A en la transferencia de electrones de Q_A a Q_B. El nivel de la fluorescencia P indica la reducción de PQ y se toma en cuenta como la fluorescencia máxima (González *et al.*, 2008).

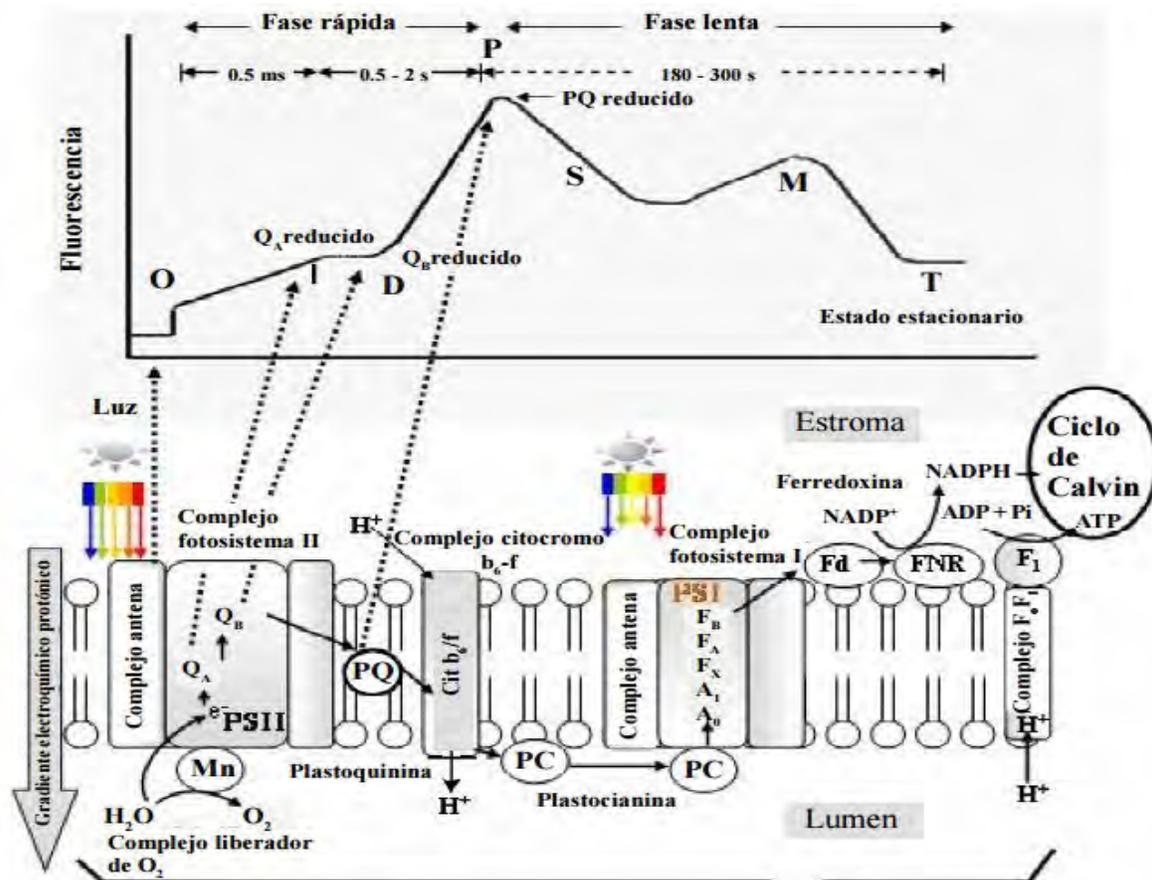


Figura 6. Curva de Kautsky, en la que se muestran la fase rápida (O-P) y lenta (S-T). En la parte de abajo, nos muestra la relación de los puntos OIDP de la gráfica con sus momentos correspondientes en el transporte de electrones fotosintético. Fuente: (González *et al.*, 2008)

Prueba OJIP

La prueba OJIP es utilizada para la caracterización del rendimiento cuántico fotoquímico del FS II, así como el transporte de electrones una vez que la luz es absorbida en los complejos antena y la energía de excitación es convertida en energía química (González *et al.*, 2008; Stirbet y Govindjee, 2011).

Cuando cloroplastos acondicionados a la obscuridad son iluminados, la fluorescencia de la Chl *a* se incrementa rápidamente, la gráfica de la cinética de dicha fluorescencia presenta cuatro puntos principales denominados OJIP (Figura 7) (Strasser, 1997; González *et al.*, 2008).

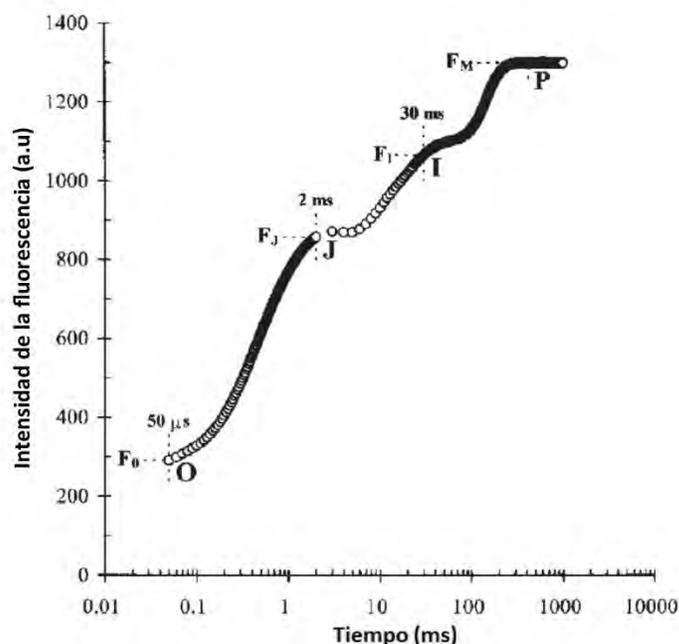


Figura 7. Curva de inducción de la fluorescencia, o curva de OJIP de muestras fotosintéticas adaptadas a la obscuridad y estimuladas con un flash de luz roja (670 nm) por 2 s. O, es la fluorescencia inicial mínima también llamada F_0 , aparece a los 50 μ s y sugiere que todos los centros de reacción están abiertos, es decir que Q_A se encuentra en un estado oxidado. J, aparece a los 2 ms (F_J) y se relaciona con la reducción parcial de Q_A . I, se desarrolla a los 30ms (F_I) y se relaciona con la reducción parcial de Q_A y Q_B . P, representa el valor máximo de la fluorescencia (F_M fluorescencia máxima) y sugiere que en este momento todos los centros de reacción están cerrados (Strasser *et al.*, 2004)

Ácidos grasos

Los ácidos grasos son compuestos químicos formados por una cadena de átomos de carbono de longitud variable, en un extremo terminal presentan un grupo carboxilo (-COOH) y en el otro extremo terminal un grupo metilo (-CH₃) (Figura 8). Los ácidos grasos pueden presentarse como saturados e insaturados. Esta variación es debida a su estructura, ya que los ácidos grasos saturados presentan una estructura conformada por una cadena lineal de átomos de carbono unidos solo por enlaces sencillos y se clasifican de acuerdo a la longitud de la cadena (corta, menor a 6 carbonos; media, entre 6 y 10 carbonos y larga, de 12 carbonos en adelante). Los ácidos grasos insaturados presentan dobles enlaces y de acuerdo a la cantidad presentada en su estructura es su clasificación, a menor número de dobles enlaces mayor saturación de sus átomos de carbono con átomos de hidrógeno. La reactividad de los ácidos grasos está ligada al tipo de estructura que lo conforman, los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados pueden adicionar hidrógeno y transformarse así de aceites a grasas sólidas, estos dobles enlaces también pueden oxidarse produciendo radicales peróxidos y radicales libres (Kadhun y Najeeb, 2017; Velázquez, 2006).

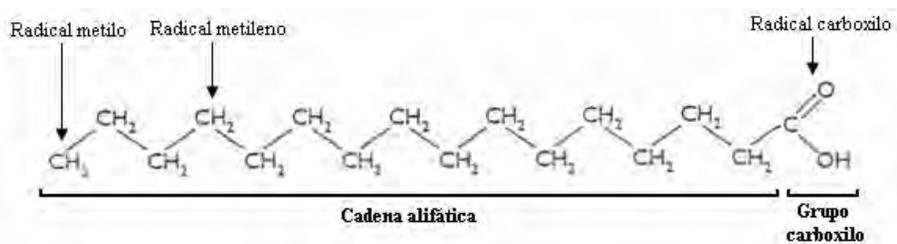


Figura 8. Estructura de un ácido graso. Fuente: Lípidos en: <http://lores2bach.weebly.com/aacutecidos-grasos.html>

En la Tabla 5, se presentan los ácidos grasos que fueron ensayados en este trabajo para conocer su actividad en el transporte de electrones fotosintético.

De acuerdo con Siegent (1973), los ácidos grasos influyen algunos parámetros y funciones fotoquímicas en cloroplastos *in vitro*, también han

mostrado ser disociadores de la actividad del flujo de electrones de la fotofosforilación, actuando como desacoplantes.

El tema ha recibido una atención considerable debido a que el daño en las membranas fotosintéticas observado durante el estrés y el envejecimiento se ha correlacionado con la presencia de ácidos grasos libres (Golbeck *et al.*, 1980).

Tabla 5. Ácidos grasos usados en los ensayos sobre la actividad del transporte de electrones fotosintético. Se incluye el número de átomos de carbono y el número de dobles enlaces en los ácidos insaturados. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w261416?lang=es®ion=MX>.

Ácidos grasos saturados		
Símbolo	Nombre común	Estructura
16:0	Ácido palmítico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
18:0	Ácido esteárico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
20:0	Ácido araquídico	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
Ácidos grasos insaturados		
Símbolo	Nombre común	Estructura
16:1	Ácido palmitoleico	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH (CH ₂) ₇ COOH
18:1	Ácido oleico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH (CH ₂) ₇ COOH
18:2	Ácido linoleico	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COOH
18:3	Ácido linolénico	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COOH
20:4	Ácido araquidónico	CH ₃ -(CH ₂) ₄ (CH=CH-CH ₂) ₄ (CH ₂) ₃ COOH

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes ácidos grasos con y sin insaturaciones y diferente número de átomos de carbono (12 a 20) en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis, con el fin de identificar a los ácidos grasos que pueden ser utilizados como posibles agentes herbicidas.

Objetivos particulares

1. Ensayar el efecto de los ácidos grasos en el transporte de electrones fotosintético medido de agua a metilviológeno (MV) en sus tres estados: basal, fosforilante y desacoplado. Empleando cloroplastos frescos aislados de hojas de espinaca (*Spinacia oleraceae L.*) y lisados al momento de usarse.
2. Determinar el efecto de los ácidos grasos en los fotosistemas I y II por separado, así como en sus reacciones parciales, para encontrar su sitio de acción.
3. Evaluar el efecto de los ácidos grasos en la fluorescencia de la clorofila *a* de cloroplastos de espinaca frescos y lisados con el fin de corroborar su actividad y sitio de acción.

HIPÓTESIS

Los ácidos grasos con dobles enlaces inhibirán el transporte de electrones fotosintético y su efecto inhibitorio será mayor a mayor número de insaturaciones.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este trabajo, hay que destacar que el aislamiento de los cloroplastos se realizó a 4 °C y en condiciones de obscuridad, con el objeto de no afectar la funcionalidad de los cloroplastos por efecto de la luz o la temperatura.

Aislamiento de cloroplastos a partir de hojas de espinaca (*Spinacia oleraceae* L.)

Para el aislamiento de los cloroplastos se utilizaron aproximadamente 40 g de hojas de espinacas (*Spinacia oleraceae* L.) frescas, turgentes, no maltratadas ni rotas; las hojas se enjuagaron con agua y posteriormente se retiró el exceso de agua con ayuda de toallas de papel; se retiraron las puntas y la nervadura central de cada hoja y luego fueron trituradas con ayuda de una licuadora (modelo L-21 marca Osterizer) inmersas en un volumen aproximado de 250 mL de medio de aislamiento para cloroplastos (ver Anexo 1).

El homogenizado se filtró a través de ocho capas de gasa, el filtrado se centrifugó a 4000 rpm por 5 min a 4 °C utilizando una centrífuga marca Hettich modelo Universal 320 R; el sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió con 2 ml del mismo medio utilizado en la molienda y la centrifugación.

Medición de la concentración de la clorofila

Para la cuantificación de clorofila se siguió el método de Arnon (1949). Se tomó una alícuota de 20 µL de cloroplastos resuspendidos, se colocaron en un matraz aforado de 5 mL con acetona al 80 % (V/V), la mezcla se incubó en la obscuridad por 5 min y posteriormente la mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 5 min (centrífuga modelo EBA 8S marca Hettich) con el fin de precipitar las membranas y proteínas. La absorbancia del sobrenadante fue medida a las longitudes de onda de 663 y 645 nm con un espectrofotómetro Genesys 10s UV-VIS, para calcular la concentración de clorofila en la alícuota tomada y determinar

el volumen de cloroplastos a utilizar en cada uno de los ensayos (20 µg/mL de medio), los datos arrojados de absorción se sustituyeron en la siguiente fórmula:

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

Donde:

[Chl] = µg de clorofila por mL.

8.05 y 20.29 = Constantes establecidas experimentalmente a partir de los coeficientes de extinción para cada una de las longitudes de onda.

A= Absorbancia a las longitudes de onda indicadas (663 nm y 645 nm).

5 es igual al factor de dilución (5 mL).

Este ensayo se realizó por duplicado.

Medición del transporte de electrones fotosintético no cíclico de agua a MV.

El transporte de electrones fotosintético no cíclico se midió con un electrodo tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno marca YSI (Yellow Spring Instrumental) modelo 5300A Biological Oxygen Monitor.

El efecto de los ácidos grasos en la cadena transportadora de electrones fotosintética no cíclica medida de agua a metilviologeno (MV, aceptor artificial de electrones) (O'Fallon y Wright, 1991; Abrol *et al*, 1993; Ciobanu *et al.*, 2007), en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado), se realizó por triplicado utilizando cloroplastos aislados de espinaca.

El transporte de electrones basal fue medido en una cubeta de reacción a la cual se le añadieron 3 ml de medio de transporte de electrones con MV y cloroplastos (20 µg de Chl/mL) (ver anexo 1) (Morales-Flores *et al*, 2015), para el ensayo control no se agregó el compuesto y en las pruebas posteriores se añadieron diferentes concentraciones de los ácidos (ver tabla 2; adelante se mencionan las concentraciones) el cambio en el consumo de oxígeno durante los

tres minutos en que la mezcla fue iluminada con una lámpara de leds azul (60 watts, marca IPSA modelo L1/CF), fue indicio de la actividad fotosintética, cada ensayo se mantuvo en agitación constante con la ayuda de un agitador magnético.

El transporte de electrones fosforilante se midió utilizando el mismo medio que para el transporte de electrones basal, en este caso además se añadieron 3mM de ADP y 3 mM de fósforo inorgánico (Pi) (Morales-Flores *et al*, 2015), posteriormente se iluminó la mezcla en la cubeta de reacción y se hicieron las mediciones de consumo de oxígeno.

El transporte de electrones desacoplado, se realizó de manera similar al del transporte de electrones basal, en este caso se añadió más 6 mM de NH₄Cl como desacoplante (Calera *et al.*, 1995; González, 2007).

Los ácidos grasos fueron disueltos en DMSO teniendo como resultado stocks de 20 mM, excepto el ácido oleico, cuyo stock fue de una concentración 2 mM. Se tomaron las alícuotas correspondientes para preparar las concentraciones a ensayar. Los ácidos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1) y esteárico (18:0) se ensayaron a las concentraciones de: 25, 50, 100, 200 y 300 µM, el ácido oleico (18:1) se ensayó con las concentraciones: 2.5, 5, 10, 20 y 30 µM, el ácido linoleico (18:2) se ensayó con 25, 50, 60, 75 y 100 µM, los ácidos linolénico (18:3) y araquídico (20:0) se ensayaron con las concentraciones 25, 50, 100 y 200 µM y el ácido araquidónico (20:4) con las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µM.

De acuerdo con la actividad presentada por los ácidos grasos en el transporte de electrones desacoplante, se obtuvo el valor I₅₀ para cada uno de ellos. Dicho valor corresponde a la concentración (en µM) a la cual cada uno de los compuestos inhibe el 50% de esta actividad, este valor se calculó con el programa Origin 8.0 mediante el análisis de regresión no lineal.

Medición del transporte de electrones del fotosistema II

De los ácidos grasos que resultaron activos como inhibidores de la reacción de Hill, se midió su efecto a diferentes concentraciones en los fotoeventos por separado, fotosistemas 1 y 2, con el objetivo de encontrar su sitio de acción.

Ambas mediciones se realizaron polarográficamente con un electrodo tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno marca YSI (Yellow Springs Instrument) modelo 5300.

Para el transporte de electrones desacoplado del fotosistema II se utilizó medio de transporte de electrones sin MV (ver anexo 1). Al medio se añadió 60 µL de NH₄Cl 250 mM, 5 µL de 2,5-dibromo-6-isopropil-3-metil-1,4-benzoquinona (DBMIB) 0.6 mM y 22.5 µL de 2,5-dicloro-1,4-benzoquinona (DCBQ) 20 mM (Yruela *et al.*, 1991).

Medición del transporte de electrones del fotosistema I

La mezcla utilizada para medir el transporte de electrones desacoplado del FSI consistió en medio para el transporte de electrones 3 mL con MV adicionado con 10 µl de DCMU 3mM, 15 µl de DCPIP 20mM reducido con 50 µl de ascorbato 20mM y 60 µl de NH₄Cl 250mM (Allen y Holmes, 1986; Schansker *et al.*, 2005).

Medición de las reacciones parciales del fotosistema II

La reacción parcial del FS II se midió de agua a silicomolibdato (SiMo), la mezcla en la cubeta de reacción consistió en 3 mL de medio de transporte de electrones para H₂O a SiMo (ver anexo 1) más 10 µl de DCMU 3 mM (Giaquinta y Dilley, 1975; Hauska y Trebs, 1977; Schansker y van Rensen, 1993).

Medición de la fluorescencia de la clorofila a en cloroplastos aislados de hojas de espinaca (*Spinacia oleraceae*)

Alícuotas de cloroplastos equivalentes a 60 µg de clorofila se colocaron en 1 cm² de papel filtro Whatman No. 1, con una micropipeta tratando de que la distribución fuera lo más homogénea posible. Posteriormente cada papel filtro se

colocó en un vial de fondo plano que contenía 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV (ver anexo 1), más la concentración de ácido graso a ensayar (25, 50 y 100 μM). Los viales se incubaron durante 5 min en la oscuridad, como control positivo se empleó 50 μM de DCMU. Una vez pasados los 5 min se procedió a medir la fluorescencia de la clorofila *a* con un fluorómetro Handy PEA (Plant Efficient Analyzer) Hansatech (Strasser *et al.*, 1995; Strasser y Strasser, 1995; Achnine *et al.*, 1998; Roháček y Barták, 1999), las curvas de inducción de la fluorescencia obtenidas se analizaron con el programa Biolyzer HP3, cada ensayo se realizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los ácidos grasos: palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, araquídico y araquidónico sobre la cadena transportadora de electrones.

Para conocer si los ácidos grasos estudiados en este trabajo presentaban actividad en el transporte de electrones no-cíclico de cloroplastos aislados de hojas de espinacas, se estudió su efecto en el flujo electrónico fotosintético en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado). En la Figura 9A, se observa que el ácido palmítico no afectó significativamente, con un máximo de aproximadamente 10 % de inhibición en la condición fosforilante a la mayor concentración del compuesto (300 μM), mientras que el ácido palmitoleico de igual número de átomos de carbono que el palmítico, pero con una insaturación, inhibió completamente estos tres transportes a la concentración de 200 μM ; sin embargo, a partir de 100 μM la inhibición era muy cercana al 100 %.

También se observa que el ácido palmítico a la concentración de 50 y 25 μM aumentan el transporte de electrones basal y fosforilante respectivamente en un 20 % (Figura 9A) y el ácido palmitoleico aumenta también en un 20 % la actividad fosforilante (Figura 9B), lo que sugiere que estos ácidos también se comportan como desacoplantes ligeros, como ya ha sido reportado previamente para otros ácidos grasos (Peters y Chin, 2003).

El ácido esteárico (Figura 9C), al igual que el palmítico no inhibió el transporte de electrones fotosintético en ninguno de los tres estados de manera significativa, pero como se puede observar también aumentó el transporte fosforilante en un 35% desde la concentración de 25 μM y se mantuvo así hasta 300 μM , el transporte basal solo aumento en un 10 %.

El ácido araquídico aumento el transporte de electrones basal 40 % a la concentración de 25 μM , después de esta concentración no afecto este transporte, en cambio inhibió en un 20 % el flujo de electrones fosforilante (Figura. 9G).

Los ácidos grasos oleico (Figura. 9D), linoleico (Figura. 9E), linolénico (Figura. 9F), araquidónico (Figura. 9H) y palmitoleico (Figura. 9B) inhibieron los tres transportes, siendo el más activo en este caso el oleico (Figura. 9D) con un valor de I_{50} de $13.12 \pm 7.9 \mu\text{M}$ para el transporte de electrones desacoplado (Tabla 7), seguido por el ácido araquidónico con I_{50} de $17.19 \pm 4.0 \mu\text{M}$, para el mismo transporte; después por el linoleico ($40.84 \pm 9.9 \mu\text{M}$), luego el palmitoleico ($41.84 \pm 9.7 \mu\text{M}$) y por último el linolénico ($90.89 \pm 8.7 \mu\text{M}$).

Como se puede observar en la Figura. 9, a excepción de los ácidos linolénico y araquidónico, el resto de los ácidos aceleraron el transporte de electrones, siendo el más activo el ácido linoleico aumentado el transporte basal más de 200 % a la concentración de $50 \mu\text{M}$. Cabe mencionar que el ácido linolénico en este caso a diferencia de lo reportado por Siegent (1973) no aceleró los transportes.

A	B
C	D
E	F

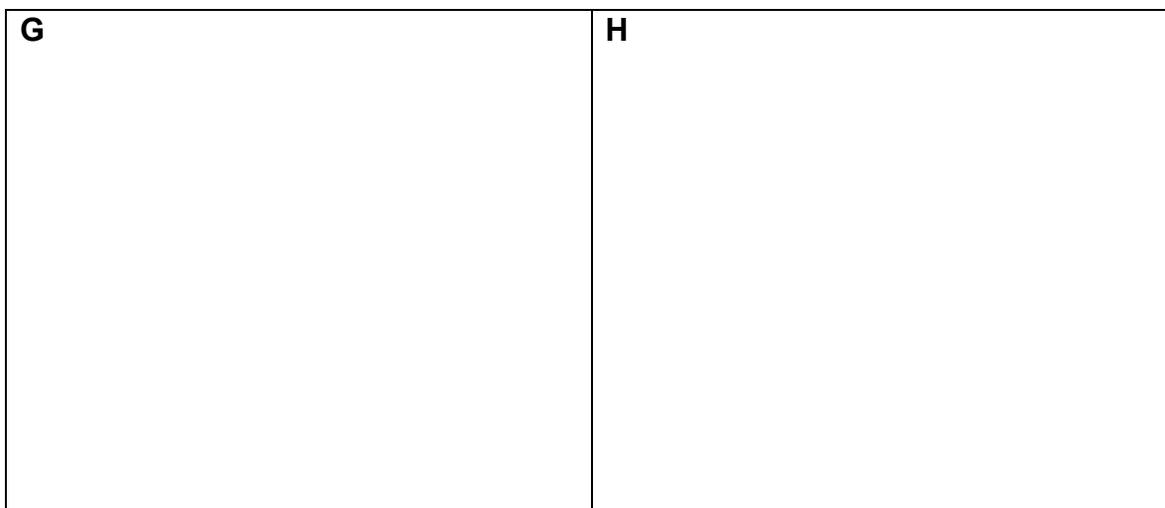


Figura 9. Efecto de los ácidos grasos palmítico (A), palmitoleico (B), esteárico (C), oleico (D), linoleico (E), linolénico (F), araquídico (G) y araquidónico (H) en la cadena transportadora de electrones fotosintética en sus tres estados: Basal (■), fosforilante (○) y desacoplado (△) el control es el 100 % de actividad, los valores equivalen a los $\mu\text{equiv de } e^- / h \times \text{mg de Chl}$ mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de $\mu\text{equiv de } e^- / h \times \text{mg de Chl}$ correspondientes al control basal, fosforilado y desacoplante de cada ácido graso ensayado en la cadena de transporte de electrones fotosintética.

Transporte	Ácido graso							
	Palmítico	palmitoleico	esteárico	Oleico	linoleico	linolénico	araquídico	araquidónico
Basal	476 ±	462 ±	480 ±	508 ±	490 ±	478 ±	476 ±	450 ±
	23.8	23.1	24	25.4	24.5	23.9	23.8	22.5
Fosforilado	560 ±	682 ±	620 ±	597 ±	880 ±	649 ±	560 ±	806 ±
	28.0	34.1	32	29.8	44	32.5	28	40.3
Desacoplado	810 ±	900 ±	1066 ±	956 ±	1220 ±	930 ±	910 ±	1044 ±
	40.5	45	53.3	47.8	61	46.5	45.5	72.2

Tabla 7. Valor I_{50} de los ácidos grasos en el transporte de electrones desacoplado en cloroplastos aislados de espinacas.

Ácido graso.	Símbolo	Valor I_{50} en μM
Palmitoleico	16:1	41.84 ± 9.7
Oleico	18:1	13.12 ± 7.9
Linoleico	18:2	40.84 ± 9.9
Linolénico	18:3	90.89 ± 8.7
Araquidónico	20:4	17.19 ± 4.0

Efecto de los ácidos grasos sobre el transporte de electrones desacoplado de los FS II y I

Los ácidos grasos que mostraron actividad inhibitoria en la cadena transportadora de electrones no cíclica en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado). Se ensayaron en los FS II y I por separado para conocer su sitio de acción. Los resultados se muestran en la Figura 10. Como se observa, los ácidos palmitoleico, oleico, linoleico, linolénico y araquidónico inhibieron significativamente este FS II. Los ácidos grasos oleico y araquidónico siguen siendo los más activos con valores de I_{50} para esta actividad (FS II desacoplado) de 14.17 ± 5.02 y $10.13 \pm 2.50 \mu\text{M}$, respectivamente (Tabla 8).

Al ensayar la actividad de los ácidos grasos en el transporte desacoplado del fotosistema I, medido de diclorofenolindofenol reducido a metilviológeno, solo los ácidos palmitoleico (Figura. 11A), linoleico (Figura. 11B) y linolénico (Figura. 11C) inhibieron esta actividad, siendo más activo el ácido linoleico con un valor de I_{50} 54.45 ± 3.55 , seguido por el palmitoleico con I_{50} de 97.49 ± 12.53 , por último, el ácido linoleico que inhibió este transporte en un 30 % a $300 \mu\text{M}$, por lo cual no se pudo determinar su valor de I_{50} (Tabla 8).

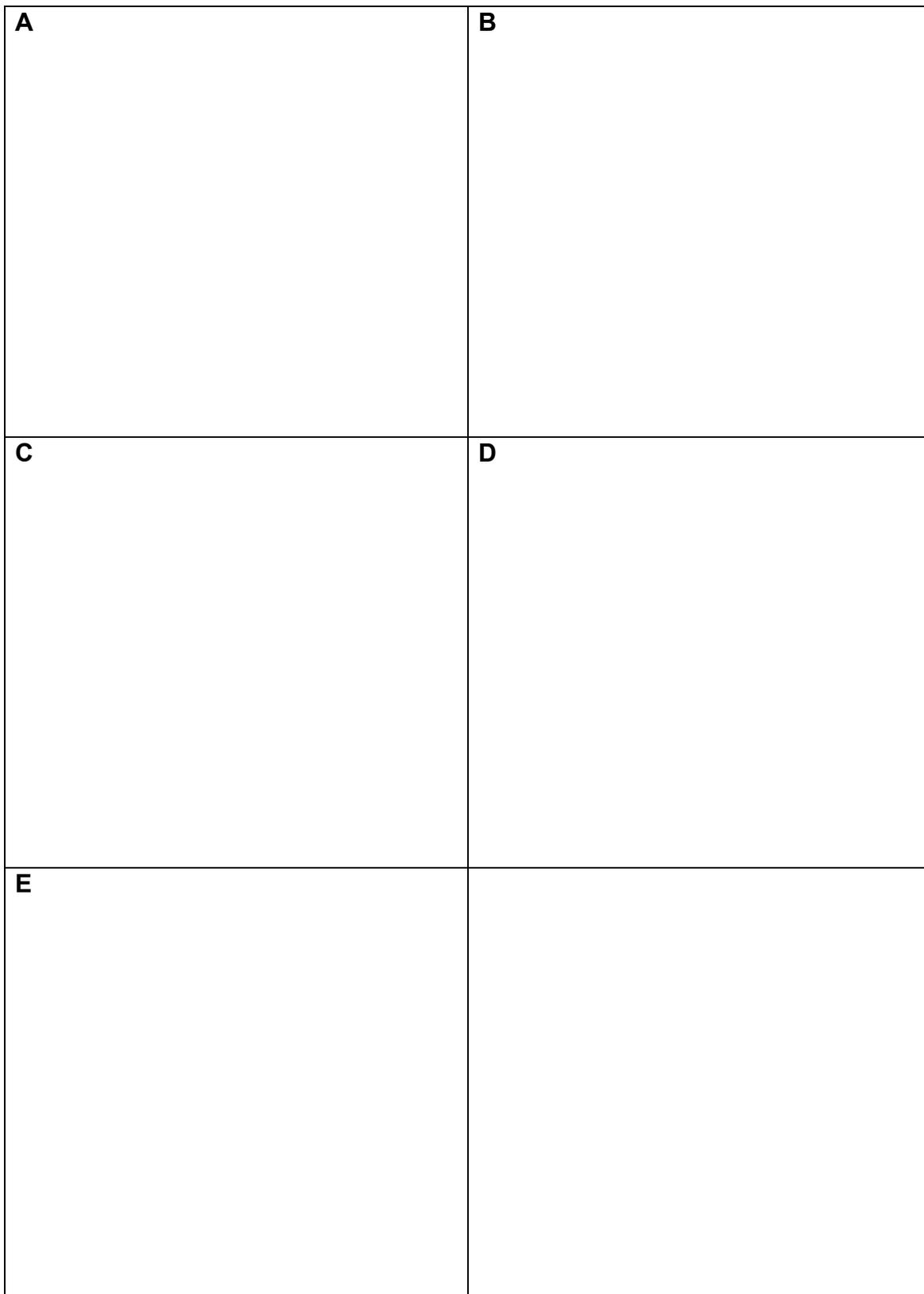


Figura 10. Actividad inhibitoria de los ácidos grasos: palmitoleico (A), oleico (B), linoleico (C), linolénico (D) y araquidónico (E), en el FS II desacoplado medido de H₂O a DCBQ. El

control es igual al 100 %. Los valores en $\mu\text{equiv. e-/h} \times \text{mg de Chl}$ para cada uno de los controles fueron: 946.3 ± 47.3 (A), 864.9 ± 43.2 (B), 870 ± 43 (C), 733.3 ± 36.6 (D), 920 ± 46 (E).

Tabla 8. Valores de I_{50} en μM de los ácidos grasos con efecto inhibitorio en FS I y FS II, calculados de las figuras 10 y 11.

Ácido graso.	Símbolo	FS I	FS II
Palmitoleico	16:1	97.49 ± 12.53	102.4 ± 10.3
Oleico	18:1	-	14.17 ± 5.02
Linoleico	18:2	54.45 ± 3.55	34.93 ± 10.69
Linolénico	18:3	No determinado	114.71 ± 11.7
Araquidónico	20:4	-	10.13 ± 2.50

A	B
---	---

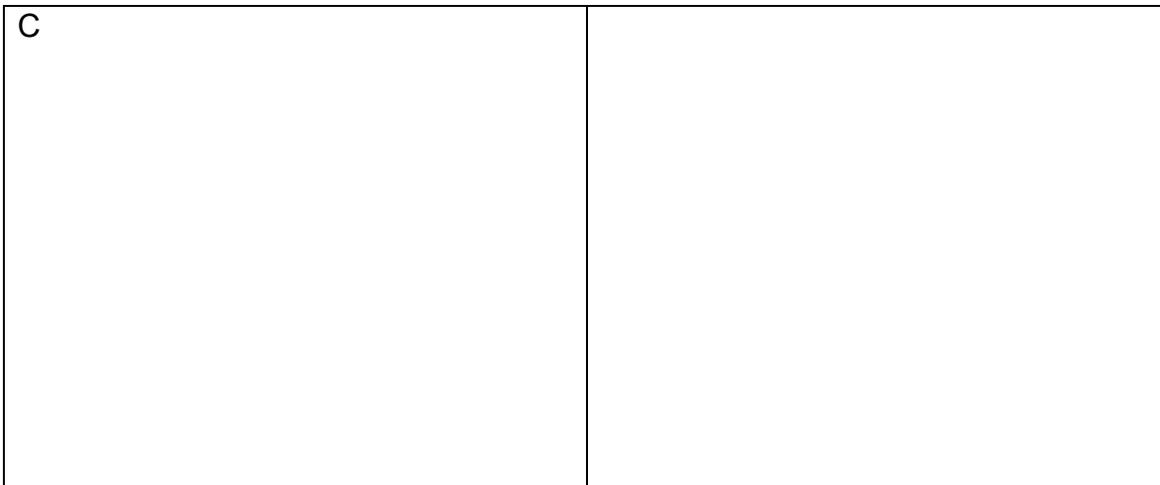


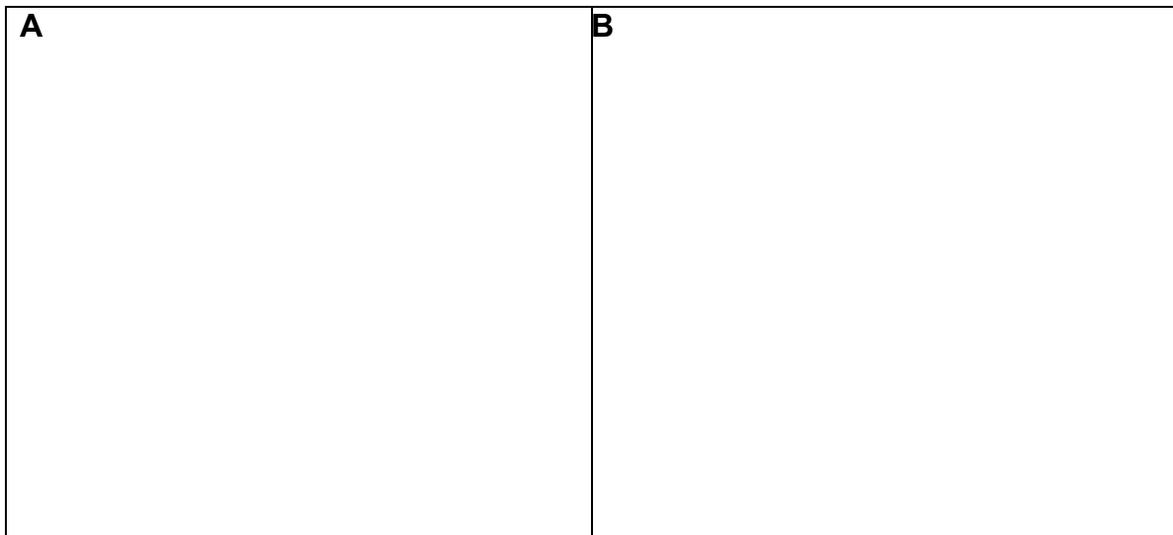
Figura 11. Efecto inhibitorio de los ácidos grasos palmitoleico (panel A), linoleico (panel B) y linolénico (panel C) en el Fotosistema I, medido de DCPIP red a MV. El control es tomado como el 100%. Los valores en $\mu\text{equiv. e}^-/\text{h} \times \text{mg de Chl}$ para cada uno de los controles fueron 752.3 ± 37.6 , 915 ± 45.8 y 845.6 ± 43 respectivamente para A, B y C.

Para conocer el sitio de acción de los ácidos grasos en el FS II, los ácidos grasos que inhibieron este transporte se ensayaron a concentraciones crecientes en el transporte de electrones desacoplado de la reacción parcial del FS II medida de H₂O a SiMo. Ninguno de los ácidos ensayados afectó este transporte (datos no mostrados), lo que sugiere que el sitio de acción de los ácidos palmitoleico, oleico, linoleico, linolénico y araquidónico se encuentra en el lado aceptor de electrones del FS II. Además, los ácidos palmitoleico, oleico y linolénico muestran un segundo sitio de inhibición que se encuentra en el FS I. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Peter y Chin, (2003) y por Katoh y Pietro, (1968), quienes demostraron que los ácidos linolénico y palmitoleico inhiben ambos fotosistemas.

Fluorescencia de la clorofila a

Se utilizó otra estrategia experimental para corroborar los resultados obtenidos por polarografía con los ácidos grasos, así se determinó el efecto de concentraciones de 25, 50 y 100 μM en la fluorescencia de la Chl a en cloroplastos aislados de espinaca. Los transientes OJIP se analizaron de acuerdo al ensayo de JIP, los parámetros medidos fueron: fluorescencia inicial (F_0), cuando el aceptor

de electrones Q_A está completamente oxidado y la fluorescencia máxima cuando Q_A está totalmente reducido (FM). F_1 es la intensidad de la fluorescencia a 0.05 ms, F_2 a 0.1 ms, F_3 a 0.3 ms, F_4 o F_J a 2 ms, F_5 a 30 ms y el área sobre la curva entre F_0 y FM, la cual está relacionada con el tamaño de la poza de aceptores del FS II (Jiang *et al.*, 2008; Veiga, *et al.*, 2013). En la Figura 12 se muestran las curvas de inducción de la fluorescencia doblemente normalizadas de F_1 (0.05 ms) a FM con la ecuación $V_t = (F_t - F_1) / (FM - F_1)$. En la Figura 12, los paneles A y C corresponden a los ácidos saturados de 16 y 18 átomos de carbono y se observa que no afectaron la fluorescencia comparados con el control. El ácido araquídico de 20 átomos de carbono y saturado (panel G), afecta ligeramente la fluorescencia a las concentraciones de 50 y 100 μM ; sin embargo, en los paneles B, D, E, F y H se observa claramente como los ácidos grasos insaturados si afectaron esta actividad.



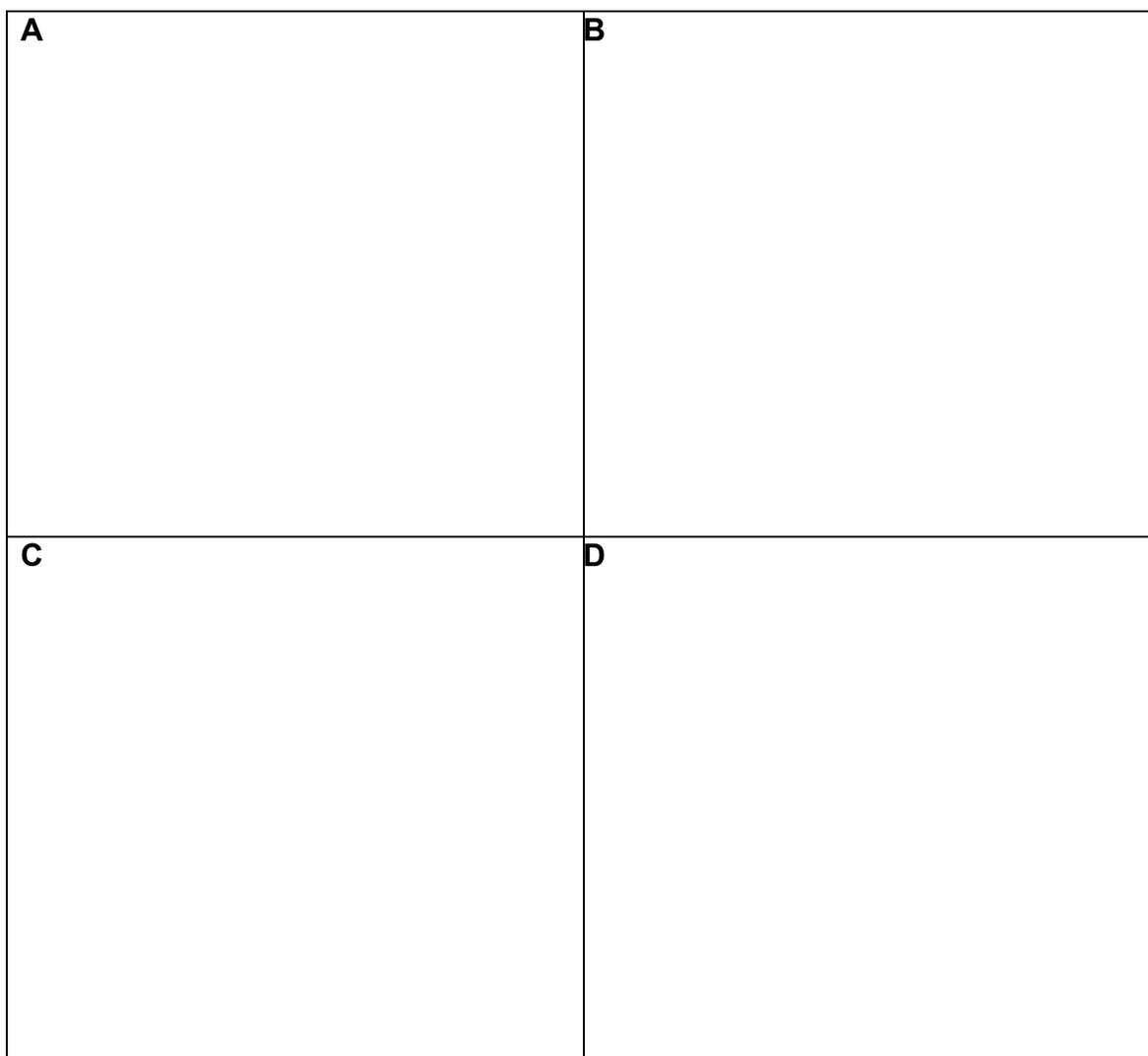
C	D
E	F
G	H

Figura 12. Efecto de las concentraciones 25 (□), 50 (○) y 100 (△) μM de los ácidos grasos ensayados en la fluorescencia de la clorofila a comparado con los cloroplastos control (■).

Tabla 9. Valores de la fluorescencia de los compuestos palmitoleico, oleico, linoleico, linolénico y araquidónico a concentraciones de 25, 50 y 100 μM comparadas con el control.

Ácido	Palmitoleico 16:1			Oleico 18:1			Linoleico 18:2			Linolénico 18:3			Araquidónico 20:4		
	0.3 ms	2 ms	10 ms	0.3 ms	2 ms	10 ms	0.3 ms	2 ms	10 ms	0.3 ms	2 ms	10 ms	0.3 ms	2 ms	10 ms
Concentración	0.148 \pm 0.007	0.383 \pm 0.019	1 \pm 0.05	0.138 \pm 0.006	0.369 \pm 0.018	0.462 \pm 0.023	0.19 \pm 0.009	0.535 \pm 0.026	0.662 \pm 0.033	0.156 \pm 0.007	0.401 \pm 0.20	0.435 \pm 0.021	0.172 \pm 0.008	0.417 \pm 0.020	0.464 \pm 0.023
	0.191 \pm 0.009	0.45 \pm 0.022	1 \pm 0.05	0.21 \pm 0.010	0.51 \pm 0.025	0.533 \pm 0.026	0.189 \pm 0.009	0.558 \pm 0.027	0.682 \pm 0.034	0.2 \pm 0.01	0.485 \pm 0.024	0.457 \pm 0.022	0.415 \pm 0.020	0.956 \pm 0.047	0.989 \pm 0.049
	0.191 \pm 0.006	0.457 \pm 0.001	1.001 \pm 0.002	0.25 \pm 0.012	0.583 \pm 0.029	0.589 \pm 0.029	0.195 \pm 0.009	0.581 \pm 0.029	0.706 \pm 0.035	0.273 \pm 0.013	0.619 \pm 0.030	0.547 \pm 0.027	0.388 \pm 0.019	0.902 \pm 0.045	0.986 \pm 0.049
	0.27 \pm 0.013	0.625 \pm 0.31	1.001 \pm 0.050	0.32 \pm 0.016	0.749 \pm 0.037	0.752 \pm 0.037	0.283 \pm 0.014	0.71 \pm 0.035	0.841 \pm 0.042	0.446 \pm 0.022	0.995 \pm 0.049	0.859 \pm 0.042	0.366 \pm 0.018	0.744 \pm 0.037	0.911 \pm 0.045

La diferencia entre las curvas normalizadas a las diferentes concentraciones de los ácidos que afectaron la fluorescencia menos la curva normalizada obtenida con el control es llamada “fluorescencia variable relativa”, y al ser graficadas contra el tiempo muestra que los ácidos palmitoleico (Figura. 13A), oleico (Figura. 13B), linoleico (Figura. 13C), linolénico (Figura. 13D) y araquidónico (Figura. 13E) aumentan la intensidad de la fluorescencia alrededor de los 2 ms, bandas J. Una banda J, es un indicativo de que la concentración de las especies Q_A^- se incrementó, este se produce de forma similar con el herbicida comercial diclorometil urea (DCMU), con sitio de inhibición en el lado aceptor de electrones del fotosistema 2 (Strasser, *et al.*, 2004; Veiga, *et al.*, 2013).



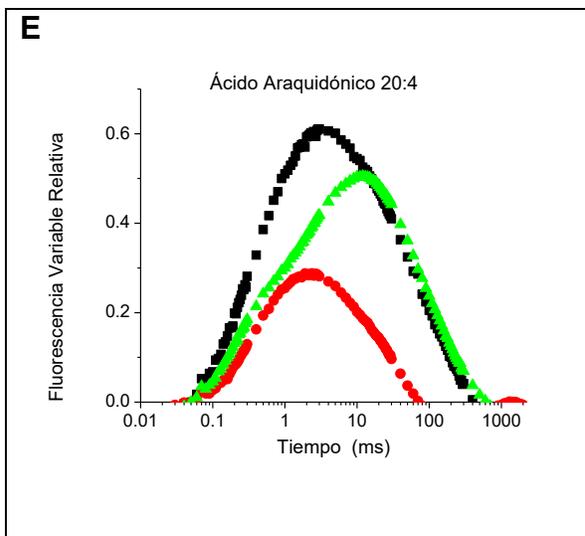


Figura 13. Bandas J que presentan los ácidos grasos palmitoleico (Figura. 16A), oleico (Figura. 16B), linoleico (Figura 16C), linolénico (Figura. 16D) y araquidónico (Figura 16E).

Por otra parte, cuando la normalización se realizó con la ecuación $V_{0J}(t) = (FVt)/(FJ - F_0) = (Ft - F_0)/(FJ - F_0)$, la fluorescencia variable relativa de V_{0J} , es decir, la normalización entre F_0 y FJ , graficada contra el tiempo, apareció cerca de los 0.3 ms un incremento en la fluorescencia llamado banda K, con las tres concentraciones ensayadas de los ácidos palmitoleico y oleico (Figuras 14A y 14B), esta banda K sugiere que hay un daño en el lado donador de electrones del FS II (Strasser, *et al.*, 2004; Veiga, *et al.*, 2013).

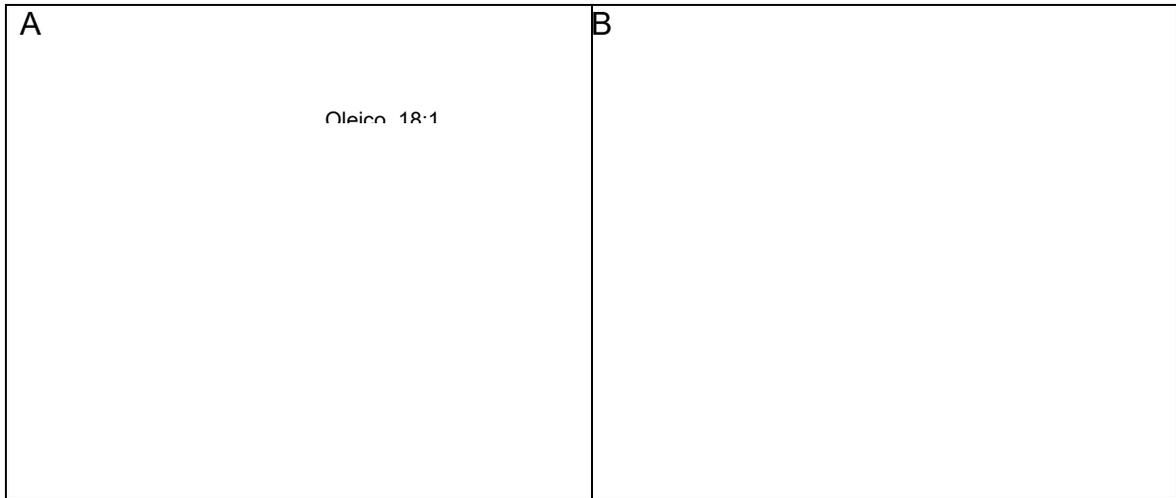


Figura 14. Bandas K de los ácidos oleico y palmitoleico.

CONCLUSIONES

1. De los resultados encontrados solo los ácidos grasos insaturados se comportan como inhibidores de la reacción de Hill al inhibir el transporte de electrones fotosintético en sus tres estados (basal, fosforilante y desacoplado), siendo más activos los ácidos oleico y araquidónico, por lo que se sugiere que estos ácidos pueden ser utilizados como posibles agentes herbicidas.
2. Los ácidos grasos saturados al igual que los insaturados a excepción de los ácidos linolénico y araquidónico que son los que tiene 3 y 4 dobles ligaduras se comportan como desacoplantes.
3. Por los resultados en los ensayos de polarografía y fluorescencia se sugiere que el sitio de acción de los ácidos grasos que se comportan como inhibidores en la reacción de Hill son el ácido palmitoleico y oleico, se encuentra tanto en el lado donador como en el lado aceptor de electrones del FS II, mientras que el ácido linoleico, linolénico y araquidónico solamente inhiben el lado aceptor de electrones del FS II.
4. Estos resultados sugieren que, sin importar la longitud de cadena de los ácidos grasos, las insaturaciones son las responsables de su actividad inhibitoria en el transporte de electrones fotosintético.

PERSPECTIVAS

1. Realizar pruebas de post-emergencia *in vivo* para los ácidos grasos que resultaron positivos en la inhibición de la cadena de transporte de electrones fotosintético en malezas y plantas de interés agrícola (monocotiledóneas y dicotiledóneas) crecidas en el invernadero.
2. Evaluar el efecto de los ácidos grasos en pruebas de pre emergencia en la germinación de semillas de malezas y plantas de interés agrícola (monocotiledóneas y dicotiledóneas).
3. Considerar en las pruebas *in vivo* el uso de adyuvantes surfactantes, para ayudar a los ácidos grasos a penetrar y mejorar su eficiencia en las plantas a ensayar y comparar los resultados con y sin la presencia de adyuvantes.

REFERENCIAS

1. Abrol YP, Mohanty P, Govindjee. (1993). Photosynthesis: Photoreactions to plant productivity. *Springer Science & Business Media*. Pp 171-172. Recuperado de: https://books.google.com.mx/books?id=uIT1CAAQBAJ&dq=Methyl+viologen+like+final+acceptor+of+electrons+plants&source=gbs_navlinks_s
2. Achnine L, Mata R, Iglesias-Prieto R, Lotina-Hennsen B. (1998). Impairment of photosystem II donor side by the natural product odoratol. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol 46. Pp 5313–5317.
3. Allen JF, Holmes NG. (1986). Chapter 5: Photosynthesis, Energy Transduction. En *Electron transport partial reactions*. Hipkinns MF, Baker NR (eds). IRL Press Oxford, United Kingdom. Pp 103–141.
4. Arnon DI. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiology*. Vol 24 (1). Pp 1-15.
5. Auld BA. (1996) Capítulo 12. Criterios económicos para el desarrollo del manejo de malezas. En: Labrada R, Caseley J, Parker C. Manejo de malezas para países en desarrollo. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*. Recuperado el 12 de Octubre del 2016 de: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s00.htm#Contents>
6. Beyer JE, Duffy MS, Itay JV, Shlueter DD. (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.
7. Bolhàr-Nordenkamf HR, Öquist G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En Hall DO, Scurlock JMO, Bolhàr-Nordenkamf HR, Leegood RC, Long SP. (Eds). *Photosynthesis and Production in a Changing Enviroment: a field and laboratory manual*. London: Chapman & Hall. Pp 193-206.
8. Calderbank A, Slade P. 1976. Diquat y Paraquat. En: Kearney PC, Kaufman DA (eds). *Herbicides Chemistry, degradation and mode of action*. New York, Vol. 2. Pp 501-539.

9. Calera MR, Soto F, Sánchez P, Bye R, Hernández B, Anaya AI, Lotina-Hennsen B, Mata R. (1995) Biochimica active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. *Phytochemistry*. Vol 40. Pp 419-425.
10. Campbell MK, Farrell SO. (2004). Bioquímica. Internacional Thompson. Australia. Pp 615-627.
11. Caseley J. (1996). Capítulo 10. Herbicidas. En: Labrada R, Caseley J, Parker C. Manejo de malezas para países en desarrollo. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*. Recuperado el 4 de Octubre del 2016 de: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s0e.htm>
12. Ciobanu M, Kincaid AH, Lo V, Dukes DA, Jennings KG, Cliffel ED. (2007). Electrochemistry and photoelectrochemistry of photosystem I adsorbed on hydroxyl-terminated monolayers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol 599. Pp 72-78.
13. Cobb A. (1992). *Herbicides and plant physiology*. Great Britain. Chapman & Hall. Pp 176.
14. Cobb AH, Kirkwood RC. (2000). Challenges for herbicides development. *Herbicides and their mechanism of action*. Sheffield Academic Press, Sheffield, U. K. Pp 1-24.
15. Cohen WS, Nathanson B, White JE, Brody M. (1969). Fatty acids as model systems for the action of Ricinus leaf extract on higher plant chloroplasts and algae. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol 135 (1). Pp 21-27.
16. Coleman R. Penner D. (2008). Organic Acid Enhancement of Pelargonic Acid. *Weed Technology*. Vol 22. Pp 38-41.
17. Esser HU, Dupuis G, Ebert E, Vogel C, Moreo GJ. (1975). S-triazines. En: Kearney PC, Kaufman DA (eds). *Herbicides Chemistry, degradation and mode of action*. New York. Vol 1. Pp 129-208.
18. Flores LKJ. (2015). Evaluación del posible efecto herbicida de los ácidos grasos (tridecanoico y heptadecanoico) y la capsaicina, identificados en *capsicum annum l*. Tesis de Licenciatura. Facultad de química. UNAM. México. Pp 88.

19. Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. (1997). Glyphosphate: a unique global herbicide. ASC Monograph 189, American Chemical Society. Washington, USA. Pp 653.
20. Garrett RH, Grisham MC. (2005). Biochemistry. Part 3, Chapter 21: Photosynthesis. University of Virginia. Pp 674-681.
21. Golbeck JH, Martin IF, Fowler CF. (1980) Mechanism of Linolenic Acid-Induced Inhibition of Photosynthetic Electron Transport. *Plant Physiology*. Vol 65 (4), Pp 707-713.
22. González S, Perales H, Salcedo MO. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*. Vol 27 (4). Pp 119- 129.
23. González-Vázquez R, King DB, Aguilar MI, Diego N, Lotina-Hensen B. (2006). Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. As Water-Splitting Emzyme Inhibitor or Thylakoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 54. Pp 1217-1221.
24. González VR. (2007). Caracterización química y bioquímica de metabolitos secundarios con actividad herbicida de las hojas de *Crotonciliato glanduliferus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. México D.F. Pp 1-100.
25. Guaiquinta RT, Dilley RA. (1975). A partial reaction in photosystem II: reduction of silicomolybdate prior to the site of dichlorophenyldimethyl-urea inhibition. *Biochimica Biophysica Acta*. Vol 387. Pp 288–305.
26. Hauska G, Trebs A. (1977). Artificial acceptor and donors In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. News series, Nueva York, USA. Vol 5. Pp 226-282.
27. Jiang H-X, Chen L-S, Zheng J-G, Han S, Tang N, Smith BR. (2008). Aluminum-induced effects of photosystem II photochemistry in Citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiol*. Vol 28. Pp 1863–1871.

28. Kadhum HA, Najeeb SM. (2017). Edible lipids modification processes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol 57 num1. Pp 48-58.
29. Kato S, Pietro AS. (1968). A comparative study of the inhibitory action on the oxygen-evolution system of various chemical and physical treatments of Euglena chloroplast. *Arch Biochem. Biophys.* Vol 128 (2). Pp 378-86.
30. Kaniuga J, Geme L, Zablocka B. (1986). Fatty-acid-induced release of manganese from chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 850. Pp 473-482.
31. Labrada R, Parker C. (1996). Capítulo 1. El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En: Labrada R., Caseley J., Parker C. Manejo de malezas para países en desarrollo. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*. Recuperado el 16 de Octubre del 2016 de: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s00.htm#Contents>
32. Lallana VH, Lallana Ma. del C. (2001). Fotosíntesis. Pp 8-12. Recuperado el 3 de Noviembre de 2016 del sitio web de la Universidad Nacional Entre Ríos (UNER) Argentina: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/Hilled.pdf
33. León VC. (2009). Fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos de la planta *Xylosma flexuosa* para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. México D.F. Pp 67.
34. Macías HPG. (2012). Herbicidas orgánicos Vs. Herbicidas químicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. Poza Rica, México. Pp 87.
35. McCarthy RE, Jagendorf AT. (1965). Chloroplast damage due to enzymatic hydrolysis of endogenous lipids, *Plant Physiology*. Vol 40. Pp 725-735.
36. Menalled DF. (2010). Consideraciones ecológicas para el desarrollo de programas de manejo integrado de malezas. *Agroecología*. Vol 5. Pp 73-78.

37. Mendoza CA. (2011). Información general sobre los herbicidas. Recuperado el 3 de Noviembre de 2016, del sitio web del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC): http://www.inecc.gob.mx/descargas/bioseguridad/2011_simp_ogm_tolerancia_pres1.pdf
38. Morales-Flores F. (2010). Fraccionamiento biodirigido de la planta *Cecropia obtusifolia* Bertol, para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. Tesis de Maestría. Facultad de Química UNAM. México D.F. Pp 129.
39. Morales-Flores F, Olivares-Palomares KS, Aguilar-Laurents MI, Rivero-Cruz JF, Lotina-Hennsen B, King-Díaz B. (2015). Flavonoids Affect the Light Reaction of Photosynthesis in vitro and in vivo, as well as, the Growth of Plants. *J. Agric. Food Chem.* Pp 48.
40. Morales-Flores F, Aguilar MI, King B, Lotina-Hennsen B. (2007). Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. *Photosynth Res.* Vol 91. Pp 71-80.
41. Mortimer AM. (1996). Capítulo 2. La clasificación y la ecología de las malezas. En: Labrada R., Caseley J., Parker C. Manejo de malezas para países en desarrollo. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*. Recuperado el 3 de Noviembre del 2016 de: <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s06.htm#conclusión>
42. Nelson DL, Cox MM. (2005). Lehninger: Principles of Biochemistry. Fourth edition. New York. Pp 723-740.
43. O'Fallon JV, Wright RW Jr. (1991). Methyl viologen as a preferred electron acceptor in metabolic experiments. *Anal Biochem.* 198 (1). Pp 179-183.
44. Olmo M, Nave R. (2016). Photosynthesis Concepts. Recuperado el 3 de noviembre de 2016, del sitio web de la Universidad del estado de Georgia: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/biology/psyncon.html#c1>
45. Pérez-Urria CE. (2009). Fotosíntesis: Aspectos básicos. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* 2(3). Pp 1-47.

46. Peters JS, Chin CK. (2003). Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol 41 (2). Pp 117–124.
47. Roháček K, Barták M. (1999). Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters and some applications. *Photosynthetica*. Vol 37 (339). Pp 339-363.
48. Saha S, Ouitrakul R, Isawa S, Good NE. (1971). Electron transport and phosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. *J Biol. Chem.* Vol 246 (10). Pp 3204–3209.
49. Schansker G, Tóth ZS, Strasser JR. (2005). Methyl viologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 1706. Pp 250-261.
50. Schansker G, van Rensen JJS. (1993). Characterization of the complex interaction between electron acceptor silicomolybdate and photosystem II. *Photosynthesis Research*. Vol 37 (2). Pp 165-175.
51. Siegent TP, Paul-Andre. (1973). Change in pH dependence and sequential inhibition of photosynthetic activity in chloroplasts by unsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 305 (1). Pp 153-162.
52. Strain HH, Cope TB, Svec M.A. (1971). Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. *Methods Enzymol*. Vol 23. Pp 452-466.
53. Strasser BJ. (1997). Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transient. *Photosynthesis Research*. Vol 52 (2). Pp 147-155.
54. Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee P. (1995). Poliphasic chlorophyll a fluorescence transient in plant and cyanobacteria. *Photochemical Photobiolog*. Vol 66. Pp 32-45.
55. Strasser BJ, Strasser RJ. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-Test. *Photosynthesis: From Light to the Biosphere*. Kluwer Academic Publishers 4. Pp 909–912.

56. Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. En: G.C. Papageorgion, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, Cap 12. Pp 321–362.
57. Stirbet A, Govindjee. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol 104 (1-2). Pp 236–257.
58. Taiz L, Zeiger E. (2006). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I. Pp 1338.
59. Urzúa SF. (2016). Principios del manejo integrado de malezas. *Parasitología agrícola*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. Pp 14. Recuperado el 4 de noviembre de 2016, del sitio web: http://www.academia.edu/21255905/PRINCIPIOS_DEL_MANEJO_INTEGRADO_DE_MALEZAS
60. Veiga TAM, King-Díaz B, Ferrari MAS, Moreira SO, Vieira PC, da Silva MFGF, Lotina-Hennsen B. (2013). Furoquinoline alkaloids isolated from *Balfourodendron riedelianum* as photosynthetic inhibitors in spinach chloroplasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol 120. Pp 36–43.
61. Velázquez G. (2006). *Fundamentos de alimentación*. Colombia. Universidad de Antioquía. Pp 281.
62. Vernotte C, Solis C, Moya I, Maison B, Briantais JM, Arrio B, Johannin G. (1983). Multiple effects of linolenic acid addition to pea thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 725 (2). Pp 376-383.
63. Vernon LP, Shaw ER. (1969). Photoreduction of 2,6-dichlorophenol by diphenylcarbazide: a photosystem 2 reaction catalyzed by Tris-washed chloroplasts and subchloroplasts fragments. *Plant Physiol*. Vol 44 (11) Pp 1645-1649.
64. Yruela I, Montoya G, Alonso P, Picorel R. (1991). Identification of the pheophytin-QA-Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the

Cu(II)-inhibitory binding site. *J. Biological Chemistry*. Vol 266 (34). Pp 22847-22850.

ANEXOS

ANEXO 1 Soluciones y medios utilizados en el desarrollo experimental.

Solución.	Contenido.
Medio de aislamiento para cloroplastos.	400mM sacarosa + 5mM MgCl ₂ + 10mM KCl + 30mM tricina; pH 8 ajustado con KOH.
Medio de transporte de electrones sin Metilviológeno.	100mM sorbitol + 10mM KCl + 5mM MgCl ₂ + 0.5 mM KCN + 50mM tricina; pH 8 ajustado con KOH.
Medio de transporte de electrones con Metilviológeno.	100mM sorbitol + 10mM KCl + 5mM MgCl ₂ + 0.5 mM KCN + 50mM tricina + 50µM metilviológeno; pH 8 ajustado con KOH.
Medio para fotosistema I	Medio para transporte de electrones con metilviológeno + 5mM NH ₄ Cl + 1µM DCMU* ³ + 100µM DCPIP* ² + 300µM ácido abscórbico
Medio para fotosistema II	Medio para transporte de electrones sin metilviológeno + 5mM NH ₄ Cl + 1µM DBMIB* ¹ + 150µM DCBQ* ⁵
Medio de transporte de electrones para fotosistema II (H ₂ O a DCPIP)	Medio de transporte de electrones sin metilviológeno + 6mM NH ₄ Cl + 100µM DCPIP* ² + 300µM Ferricianuro de potasio + 1µM DBMIB* ¹
Medio de transporte de electrones para fotosistema I (H ₂ O a SiMo)	6mM NH ₄ Cl + 10µM DCMU* ³ + 50µM SiMo
<p>*¹DBMIB: 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona.</p> <p>*²DCPIP: 2,6 diclorofenol indofenol.</p> <p>*³DCMU: Diuron 3-(3,4 diclorofenil)-1,1 dimetilurea.</p> <p>*⁴SiMo: Silicomolibdato.</p>	

*⁵DCBQ: 2,5-Dichloro-1,4-benzoquinona

Anexo 2. Contenido de las mezclas de los controles y ensayos para el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado, el contenido del medio de transporte de electrones se encuentra en el anexo 1.

Transporte de electrones	Control.	Ensayo.
Basal (Morales <i>et al.</i> , 2007; Saha <i>et al.</i> , 1971).	Medio de transporte de electrones + 60µg de clorofila	Control basal + Concentración de ácido graso.
Fosforilante (Strain <i>et al.</i> , 1971; Vernon <i>et al.</i> , 1969).	Medio de transporte de electrones + 60µg de clorofila + 3mM de ADP (adenosín difosfato) + 3mM de Pi (fosfato inorgánico)	Control fosforilante + Concentración de ácido graso.
Desacoplante (Morales <i>et al.</i> , 2007; Saha <i>et al.</i> , 1971).	Medio de transporte de electrones + 60µg de clorofila + 6mM de NH ₄ Cl (cloruro de amonio)	Control desacoplante + Concentración de ácido graso.