



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EFFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES  
FOTOSINTÉTICO DE LA CAPSANTINA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Q. A. VALERIA ORTEGA MENDOZA**

**DR. BLAS LOTINA HENNSEN**  
**Facultad de Química, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**DRA. PATRICIA COELLO COUTIÑO**  
**Facultad de Química, UNAM**  
**DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL**  
**Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**Ciudad de México. Febrero, 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.

*A todas aquellas mujeres,  
las cuales se dedican a la investigación o a la ciencia.*

*Cada una de ustedes tiene una maravillosa  
historia que contar, además de que debieron  
superar muchos obstáculos y afrontar muchos retos.*

# AGRADECIMIENTOS

---

Se agradece a la Universidad Nacional Autónoma de México por los recursos académicos brindados, en especial se agradece al Programa de Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por medio de la Facultad de Química Campus Ciudad Universitaria.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la maestría.

Se agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT-DGAPA) con clave PAPIIT-IT/02012-3, así como también se agradece al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP) con clave 50009116 por proporcionar los recursos (materiales, consumibles y reactivos) para el desarrollo de este trabajo.

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para asistir al congreso de la 11ª. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales.

Se agradece el permiso y las facilidades brindados por la Reserva del Pedregal de San Ángel (REPSA), para la colecta del material biológico dentro de esta reserva.

Se agradece al personal académico de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química, UNAM: Q. Georgina Duarte Lisci, Q. Alejandrina Acosta, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Q. F. B. Maricela Gutiérrez por el apoyo en la realización de los ensayos de RMN, CG-MS y HPLC.

Se agradece al Dr. Blas Lotina Hensen por su asesoría en este trabajo.

Se agradece al Comité Tutorial: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y Dr. Salvador Uribe Carvajal, por sus comentarios, observaciones, correcciones y por su valioso tiempo que me proporcionaron para la perfección de este trabajo.

Se agradece a los miembros del jurado por su tiempo y sus acertadas observaciones a este trabajo: Dr. Diego González Halphen, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra, Dr. Arturo Navarro Ocaña y al Dr. Jorge Nieto Sotelo.

Se agradece a la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias por el apoyo, tanto de material, reactivos y equipos como de los conocimientos brindados para la parte histoquímica realizada.

Se agradece a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por sus consejos y por hacer un espacio en su agenda para proporcionarme la “luz” que hacía falta para el término de este trabajo.

Se agradece a la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por la ayuda brindada para la obtención e interpretación de los espectros de RMN y CG-MS, así como por los consejos brindados para la parte fitoquímica del trabajo realizado. También se agradece al Dr. José Fausto Rivero Cruz por la ayuda brindada en la parte fitoquímica del trabajo realizado.

Se agradece a la M. en C. Beatriz King Díaz por ser un gran apoyo en el desarrollo del presente trabajo, por brindarme su tiempo, paciencia y conocimientos y también por sus regaños.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica del Conjunto E de la Facultad de Química y en el Taller de Plantas I y II del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad Universitaria.

En lo personal quiero agradecer a mis compañeros de la maestría (Karla, Miriam, Carolina, Monserrat, David, Mauricio, Arturo, Víctor), ya que me demostraron que aún en maestría se pueden continuar fomentando las relaciones personales; gracias por los “aventones”, consejos, experiencias y demás, que compartieron.

También quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio 115 (Karlita, Mora, Gaby, Karen, Eli, Vianney, Óscar, la maestra Bety, Félix, Srito, Jorge, Edgar), gracias por todos los momentos compartidos, por las pachangas, los congresos, el karaoke (no importa que nos corrieran o se enojarán azotando puertas, o peor aún que se fuera la luz), los seminarios, las comidas, los cumpleaños, por ayudar a adornar el lab, por tantas y tantas cosas más muchas gracias, sin ustedes creo que la estancia en el laboratorio no hubiera sido una experiencia extraordinaria, y también gracias a aquellas personas que pasaron por este laboratorio (Dra. Liliana, Dr. Thiago., Dra. Marbella y todos los compañeros de servicio social, estancias intersemestrales y algunos más que nos visitaron).

Además quiero agradecer a todas aquellas personas que directa o indirectamente fueron importantes durante la realización de este proyecto: gracias a la Dra. Sobeida por su ayuda desinteresada, a la Dra. M. Isabel por sus consejos y por compartir el gusto por la buena música, a la M. en C. Maru por ser una persona excepcional, por su ayuda ilimitada en la histoquímica y por sus consejos, al Dr. Felipe y a la M. en C. Ana ya que sin sus consejos, ayuda y buen humor no hubiera apreciado todo el arduo trabajo que es realizar histoquímica, a los chicos de servicio social, estancia y/o proyectos del Taller de Plantas I y II por ser tan accesibles y no discriminar a las personas de otras carreras, en especial gracias a Angie, Yarani, Sayuri y a César.

Por último quiero agradecer a todos mis compañeros que me acompañaron durante esta etapa y que me dieron muchos consejos así como escucharon mis quejas, del CENLEX, del CELE, de la Licenciatura, de UPIBI y a todos aquellos que conocí y que he olvidado ponerlos aquí (una disculpa y gracias)

# ÍNDICE

---

Abreviaturas.....	viii
Lista de Tablas.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo I. MARCO TEÓRICO.....	3
<b>I.1 Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2 Marco teórico.....</b>	<b>5</b>
I.2.1 Metabolitos secundarios en plantas.....	5
I.2.2 Capsantina.....	5
I.2.2.1 Estructura química.....	5
I.2.2.2 Biosíntesis de la capsantina.....	6
I.2.2.3 Actividades biológicas de la capsantina.....	7
I.2.3 Búsqueda de nuevos herbicidas naturales.....	8
I.2.3.1 Fotosíntesis y transporte de electrones.....	10
I.2.3.2 Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	11
I.2.3.3 Germinación.....	12
<b>I.3 Antecedentes del trabajo.....</b>	<b>13</b>
Capítulo II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
<b>II.1 Hipótesis.....</b>	<b>15</b>

<b>II.2 Objetivo general.....</b>	<b>15</b>
<b>II.3 Objetivos particulares.....</b>	<b>15</b>
Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
<b>III.1 Obtención y caracterización química de la capsantina.....</b>	<b>16</b>
III.1.1 Obtención de capsantina de la planta <i>Ricinus communis</i> L. ....	16
III.1.2 Obtención de capsantina a partir de pimentón.....	17
III.1.3 Identificación de capsantina por pruebas físico-químicas, TLC, RMN y HPLC-MS-CG.....	18
<b>III.2 Caracterización bioquímica de la capsantina.....</b>	<b>19</b>
III.2.1 Ensayo semi- <i>in vivo</i> de germinación y elongación de tallo y raíz.....	19
III.2.2 Ensayos <i>in vitro</i> .....	20
III.2.2.1 Síntesis de ATP.....	21
III.2.2.2 Transporte de electrones fotosintético.....	21
III.2.2.3 Reacciones parciales.....	22
III.2.2.4 Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en cloroplastos.....	24
III.2.2.5 Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en discos de hojas de espinacas.....	25
III.2.3 Análisis estadístico.....	25
Capítulo IV. RESULTADOS.....	27
<b>IV.1 Obtención y caracterización química de la capsantina.....</b>	<b>27</b>
IV.1.1 Rendimiento de extractos y compuestos obtenidos de la planta <i>R. communis</i> L. y del pimentón.....	27
IV.1.2 Identificación de la capsantina.....	27
<b>IV.2 Caracterización fisiológica y bioquímica de la capsantina.....</b>	<b>30</b>
IV.2.1 Evaluación en germinación y elongación de tallo y raíz.....	30

IV.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la inhibición del transporte de electrones fotosintético no cíclico.....	32
Capítulo V. DISCUSIÓN.....	36
<b>V.1 Capsantina: obtención e identificación.....</b>	<b>36</b>
<b>V.2 Caracterización bioquímica de la capsantina.....</b>	<b>37</b>
V.2.1 Germinación.....	37
V.2.2 Ensayos <i>in vitro</i> , sitio de acción.....	38
<b>V.3 Consideraciones para estudios posteriores.....</b>	<b>40</b>
Capítulo VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	41
VI.1 Conclusiones.....	41
VI. 2 Perspectivas.....	41
Capítulo VII. REFERENCIAS.....	42
Capítulo VIII. ANEXOS.....	50
VIII.1 Anexo 1: Identificación de capsantina.....	50
VIII.2 Anexo 2: Resultados de ensayos de germinación y elongación de tallos y raíces al evaluar la capsantina.....	53
VIII.3 Anexo 3: Análisis estadístico de varianzas (ANOVA).....	54
VIII.4 Anexo 4: Propuestas de artículos.....	58



# ABREVIATURAS

---

A <sub>0</sub>	Aceptor de electrones primario del Fotosistema I
A <sub>663</sub>	Absorbancia a 663 nm
A <sub>645</sub>	Absorbancia a 645 nm
A <sub>obscuridad</sub>	Absorbancia medida antes de iluminar cloroplastos
A <sub>iluminado</sub>	Absorbancia medida después de iluminar cloroplastos
Ac-CoA	Acetil coenzima A
CCA	Cromatografía en columna abierta
CF <sub>0</sub>	Parte lipofílica del complejo CF <sub>1</sub> CF <sub>0</sub> -H <sup>+</sup> ATPasa
CF <sub>1</sub>	Parte hidrofílica del compuesto CF <sub>1</sub> CF <sub>0</sub> -H <sup>+</sup> ATPasa
Chl	Clorofila total (Chl <i>a</i> y Chl <i>b</i> )
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
Cyt b6/f	Complejo proteico citocromo b6/f
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCBQ	2,6-diclorobenzoquinona
DCMU	3-(3,4-dicloro fenil)-1,1-dimetil urea (Diuron <sup>®</sup> )
DCPIP	2,6-dicloro fenol indofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPC	Difenilcarbazida
EEC	Extracto enriquecido en capsantina
F	Fluorescencia
F <sub>0</sub>	Fluorescencia mínima
Fd	Ferredoxina
Fm	Fluorescencia máxima
FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
Fv	Fluorescencia variable = Fm – F <sub>0</sub>
FV/Fm	Eficiencia máxima del FSII
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HSQC	<i>Hereronuclear Single Quantum Correlation</i>
HPLC-MS-CG	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas y cromatografía de gases
I <sub>50</sub>	Concentración donde se presenta el 50 % de inhibición de la actividad
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Ferricianuro de potasio
Kf	Constantes de velocidad vía fluorescencia
Kp	Constantes de velocidad de excitación vía fotoquímica
μeq	microequivalentes
mM	milimolar (milimoles / mililitro)
μM	micromolar (micromoles / microlitro)
MV	1, 1'-dimetil-4,4'-bipiridín dicloruro (Metil viológeno)
N	Normalidad (equivalentes / litro)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OEC	Complejo emisor de oxígeno
P <sub>680</sub>	Centro de reacción del FSII
P <sub>700</sub>	Centro de reacción del FSI
PC	Plastocianina
pH	potencial de Hidrógeno
Pheo	Feofitina
Pi	Fosfato inorgánico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
ppm	partes por millón (1 mg / 1 L)

PQ	Plastoquinona
$Q_A$	Aceptor de electrones primario del FSII
$Q_A^-$	Aceptor de electrones primario del FSI
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
$^1\text{HRMN}$	RMN de Hidrógeno (o protónica)
$^{13}\text{CRMN}$	RMN de Carbono 13
rpm	revoluciones por minuto (depende del diámetro del rotor)
SiMo	Silicomolibdato de sodio
TLC	Cromatografía en capa fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
Tricina	N-[tris(hidroximetil)metil]-glicina
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV	ultravioleta
v/v	volumen / volumen
$\delta_H$	Desplazamiento químico protónico
$\lambda$	Longitud de onda (nm)
$\lambda_{\text{max}}$	Longitud de onda máxima (nm)

# LISTA DE TABLAS

---

Tabla 1. Extractos y compuestos aislados de *R. communis* L., con actividades biológica.14

Tabla 2. Rendimiento de extractos y de la capsantina obtenida de dos fuentes.....26

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la capsantina.....27

# LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Estructura química de la capsantina.....	6
Figura 2. Ruta biosintética de los carotenoides (capsantina) en <i>Capsicum annuum</i> L.....	7
Figura 3. Estructura de diferentes aleloquímicos con efecto herbicida.....	9
Figura 4. Esquema Z de la fotosíntesis.....	11
Figura 5. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> del fotosistema II en la fase rápida y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones.....	12
Figura 6. Fraccionamiento biodirigido de la planta <i>Ricinus communis</i> L.....	17
Figura 7. Diagrama para la obtención de la capsantina del pimentón.....	18
Figura 8. Transporte de electrones en cloroplastos.....	24
Figura 9. TLC o Cromatografía en Placa de la capsantina obtenida de <i>Ricinus communis</i> L. y del pimentón.....	27
Figura 10. Espectro de absorción de la capsantina obtenida de <i>R. communis</i> L. y del pimentón.....	28
Figura 11. Ensayo de germinación de capsantina.....	30
Figura 12. Efecto <i>in vitro</i> de diferentes concentraciones del compuesto capsantina sobre cloroplastos aislados y sobre discos de hojas de <i>S. oleraceae</i> .....	31
Figura 13. Comportamiento de algunos compuestos evaluados por Izawa <i>et al.</i> , 1972 y 1974.....	34

# RESUMEN

---

La eficiencia de la agricultura depende en gran medida del control de enfermedades y plagas que afectan los cultivos. Las malezas son consideradas actualmente como la plaga que afecta en mayor proporción el rendimiento de los cultivos. Estas malas hierbas se controlan por métodos químicos, principalmente con el uso de herbicidas. Sin embargo, al encontrar compuestos muy activos, la investigación disminuyó, y se utilizaron indiscriminadamente los compuestos más activos produciendo una serie de efectos adversos como contaminación de los mantos acuíferos, desarrollo de especies resistentes y acumulación de plaguicidas en productos finales de la cadena de producción. Recientemente, se ha encontrado que algunos compuestos de origen natural tienen actividades herbicidas semejantes a los compuestos comerciales pero con múltiples beneficios como tener diferentes sitios de acción. Por ello, la búsqueda y desarrollo de herbicidas de origen natural ha cobrado importancia.

Algunos metabolitos secundarios de plantas desempeñan un papel importante en la interacción con el medio ambiente y otros organismos, actuando como agentes alelopáticos. La capsantina, metabolito secundario clasificado como carotenoide, fue identificado por primera vez en *Ricinus communis* L. en este trabajo, sin embargo no se ha reportado su actividad herbicida, por ello el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad herbicida y proponer el sitio de acción específico para este compuesto. Se observó que la capsantina inhibió específicamente la germinación de plantas dicotiledoneas evaluadas (*Lactuca sativa* y *Physalis ixocarpa*) y se observó también que se puede obtener un efecto de hormesis (efecto contrario dependiendo de concentración: por ejemplo un efecto positivo a baja concentración y un efecto negativo a alta concentración o viceversa), en los modelos de *Physalis ixocarpa* y *Lolium perenne*. Se observó que la capsantina tiene varios sitios de acción, inhibiendo el transporte de electrones fotosintético no cíclico y la síntesis de ATP, lo anterior se corroboró con la observación de la fluorescencia de la clorofila *a*. Los sitios de acción observados en el transporte de electrones fueron en el fotosistema II (FSII) y en el fotosistema I (FSI), sin embargo, solo fueron caracterizados los sitios de acción en el FSII, los cuales se encontraron tanto en el lado aceptor como en el donador del FSII. Al determinar el efecto de la capsantina en hojas de espinaca (*Spinacea oleraceae* L.) se observó que la concentración determina el sitio de acción (banda J con 25 ppm y banda K a partir de 50 ppm)

Se determinó que la capsantina tiene actividad herbicida pre- y post-emergente, pues inhibió la germinación y la fotosíntesis; se observó que si se evalúa en hojas, este compuesto tiene un efecto dosis-dependiente. Estos resultados sugieren que se debe evaluar el compuesto en malezas y que se podrían identificar otros compuestos en el extracto de *Capsicum annum* L., que pudieran potenciar el efecto de la capsantina.

# ABSTRACT

---

The efficiency of agriculture depends on the control of diseases and pests affecting crops. Weeds are currently considered as plague that affects crop yield. Weeds are controlled by chemical methods, mainly using herbicides. However, after finding active compounds, the research decreased, and only active compounds were used, producing a series of adverse effects such as pollution of aquifers, development of resistant species and the pesticide accumulation in the final products of the food production chain. In recent years, it was founded that some compounds from natural source have similar effects than commercial herbicides plus additional benefits such as different action sites. Therefore, the research and development of naturally occurring herbicides has gained importance.

Some secondary metabolites from plants have an important role in the interaction with the environment and with other organisms, acting as allelopathic agents. Capsanthin, a secondary metabolite classified as a carotenoid, was also identified in *Ricinus communis* L. In this work, we investigated the role of capsanthin as herbicide and proposed a specific action site for this compound.

It was observed the capsanthin specifically inhibits the germination of the dicotyledonous plants (*Lactuca sativa* and *Physalis ixocarpa*), and also noted the hormesis (opposite effect depending on concentration: for example a positive effect with low concentrations and an adverse effect with high concentration or vice versa), on the *Physalis ixocarpa* and *Lolium perenne* plants. It was observed that capsanthin has multiple sites of action, inhibiting the non-cyclic photosynthetic electron transport and ATP synthesis. These observations were confirmed by fluorescence of chlorophyll *a*. Although the action sites were on both photosystems, only the action site on Photosystem II (PSII) was characterized.

It was determined that capsanthin has pre- and post-emerging herbicide activity, because it inhibits germination and photosynthesis. When it was evaluated on leaves, it had a dose-dependent effect. These results suggest that the capsanthin should be evaluated in weeds. It might be possible to identify other compounds in the extract of *Capsicum annum* L., which could potentiate the effect of capsanthin.

# CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

---

## I.1 Introducción

Mientras que la población mundial alcanzará 8.5 mil millones en 2025 (Ahmad *et al.*, 2012), en México, se ha aumentado exponencialmente desde 1950 hasta el año 2010, y ha superado los 112 millones de personas (INEGI, 2010). Una de las consecuencias de esto va a ser el aumento de la demanda de alimentos, por lo que se deben desarrollar diferentes estrategias para optimizar la producción de cultivos y así generar los alimentos necesarios.

La eficiencia de la agricultura depende de gran medida del control de enfermedades y plagas que afectan los cultivos. Las malas hierbas o malezas son consideradas actualmente como la plaga que más afecta el rendimiento de los cultivos, reduciendo la calidad de los productos cosechados; se estima que las pérdidas anuales llegan a 34.7 mil millones de dólares, tan solo en Estados Unidos (Kogan *et al.*, 2003; Chaudhry *et al.*, 2008; Morales, 2014)

Las malezas se controlan por métodos químicos, principalmente con herbicidas. Sin embargo, la investigación para el desarrollo de nuevos herbicidas ha disminuido. Entre 1955 y 1975 se introducían al mercado estadounidense 6 o 7 nuevos herbicidas cada año, mientras que en los últimos años (entre 1996 y 2008), tan solo se desarrollaron 1 o 2. Como resultado, se está homogenizando el uso de herbicidas forzando a los agricultores a utilizar unos cuantos compuestos y se están produciendo una serie de efectos adversos como contaminación de los mantos acuíferos, desarrollo de especies resistentes y acumulación de plaguicidas en productos finales de la cadena de producción. Por ello, la búsqueda y desarrollo de herbicidas de origen natural ha cobrado importancia en los últimos años. Actualmente la preocupación por una agricultura no contaminante ha llevado a prohibir o restringir varios productos, presionando la búsqueda de herbicidas de origen natural (Macías, 2012)

A principios de los años noventa, algunos investigadores propusieron una forma de obtener nuevos herbicidas y más seguros a través del desarrollo de la investigación de los aleloquímicos (Macías *et al.*, 1995; Zavaleta, 2011), que son agentes químicos involucrados en los mecanismos por los que las plantas y otros seres vivos interactúan con otros. Los aleloquímicos tienen un amplio espectro de efectos, son biodegradables y por lo tanto, menos agresivos con el medio ambiente (Kudsk *et al.*, 2003; Macías *et al.*, 2001; Morales, 2014). Se ha encontrado que diferentes aleloquímicos como el sorgoleón, la tambulina y la breviona A, tienen efecto herbicida actuando en nuevos sitios de acción (Vyvyan *et al.*, 2002; Czamota *et al.*, 2001; Macías *et al.*, 1997; Nery, 2011), por ello es importante continuar la búsqueda de otros herbicidas naturales. Una alternativa para el desarrollo de nuevos herbicidas naturales, es descubrir compuestos que afecten procesos vitales de las plantas, como la fotosíntesis, específicamente en las malezas.

En este trabajo se realizó la identificación de un compuesto con actividad herbicida interesante. Esta actividad fue evaluada en diferentes etapas de modelos de plantas (germinación, en cloroplastos o plántulas y en hojas de plantas o planta madura, estos ensayos también se dividieron en ensayos *in vitro* y ensayos semi-*in vivo*)



## I.2 Marco teórico

### I.2.1 Metabolitos secundarios en plantas

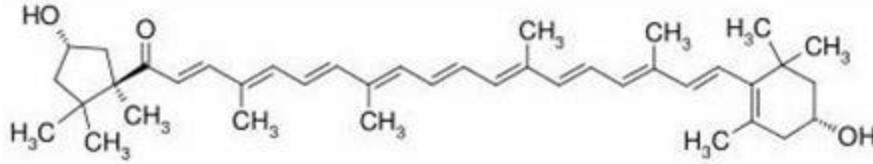
Las moléculas sintetizadas por diversos organismos incluyendo las plantas se clasifican en dos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son indispensables para la vida de la plantas (como los lípidos, los carbohidratos y las proteínas), mientras que los metabolitos secundarios son compuestos dispensables para la supervivencia, pero desempeñan un papel importante en la interacción con el medio ambiente y otros organismos (Pagare *et al.*, 2015). Los metabolitos secundarios ayudan a la planta a defenderse contra patógenos o predadores actuando como agentes alelopáticos. También ayudan a la adaptación a diversos ambientes, le permiten competir contra otras plantas e incluso pueden atraer polinizadores para que dispersen las semillas o polen y así tener éxito reproductivo (Raven *et al.*, 1990; Flores, 2016)

### I.2.2 Capsantina

La capsantina (3, 3'-dihidroxi- $\beta$ , k-caroten-6'-ona) es uno de los principales carotenoides del pimiento rojo, el cual se acumula en las membranas de los tilacoides de los cromoplastos del pericarpio de los frutos (*Capsicum spp.*). Puede contribuir hasta el 60 % del total de los carotenoides aunque esta proporción puede variar entre las variedades del género Capsicum. Este compuesto ha sido reportado en los lilis asiáticos híbridos (*Lilium spp.*), en los frutos de *Berberis spp.* y de *Asparagus spp.* (Rodriguez *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2014). Es un agente de que brinda sabor y color, normalmente extraído de los pimientos rojos con disolventes. En la industria alimentaria se ha incrementado su uso debido a la aceptación por consumidores, así como debido a que son fácilmente metabolizados (EFSA, 2006)

#### I.2.2.1 Estructura química

La fórmula molecular de la capsantina es  $C_{40}H_{56}O_3$ , su peso molecular es de 584.871 g mol<sup>-1</sup> con una densidad de 1.012 g mL<sup>-1</sup> y su punto de fusión es de 177-178 °C. Este compuesto tiene una larga serie de dobles ligaduras conjugadas que termina con una o dos cetonas polares que absorben eficientemente la luz verde y reflejan la luz roja-naranja. El grupo hidroxilo de la estructura del anillo puede estar esterificado con ácidos grasos formando monoésteres y diésteres. La capsantina contiene 11 dobles enlaces conjugados, un grupo ceto conjugado y un anillo ciclopentanilo. En la molécula de capsantina el doble enlace del anillo  $\beta$ -ionona está fuera de la cadena plana de polieno debido a la repulsión entre los átomos de hidrógeno de los grupos metilos del anillo y los hidrógenos de la cadena polieno. Mientras que el doble enlace carbonil de la cabeza del grupo está muy cerca de la planaridad con la cadena polieno y no existe repulsión aquí (Shah *et al.*, 2014). La capsantina es una grasa soluble que puede estar esterificada con ácidos grasos saturados de cadena corta.



**Figura 1. Estructura química de la capsantina.**

#### I.2.2.2 Biosíntesis de la capsantina

En los pimientos, la capsantina es un producto final en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Figura 2). Esta ruta comienza desde geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), la fitoeno sintasa (PSY) convierte dos de las moléculas de GGPP en fitoeno. El fitoeno es desaturado en licopeno a través de  $\zeta$ -caroteno, el cual es catalizado por medio de dos enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y la  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS). El licopeno se cicla en ambos extremos por medio de licopeno  $\beta$ -ciclasa (LCYB), y así se produce el  $\beta$ -caroteno. El  $\beta$ -caroteno es después convertido en  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina y anteraxantina. Las reacciones se llevan a cabo por medio de la  $\beta$ -caroteno hidroxilasa ( $\beta$ -CH) y la zeaxantina epoxidasa (ZE) respectivamente. La anteraxantina es catalizada por la capsantina-capsorubina sintasa (CCS) para formar la capsantina (Gómez *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014)

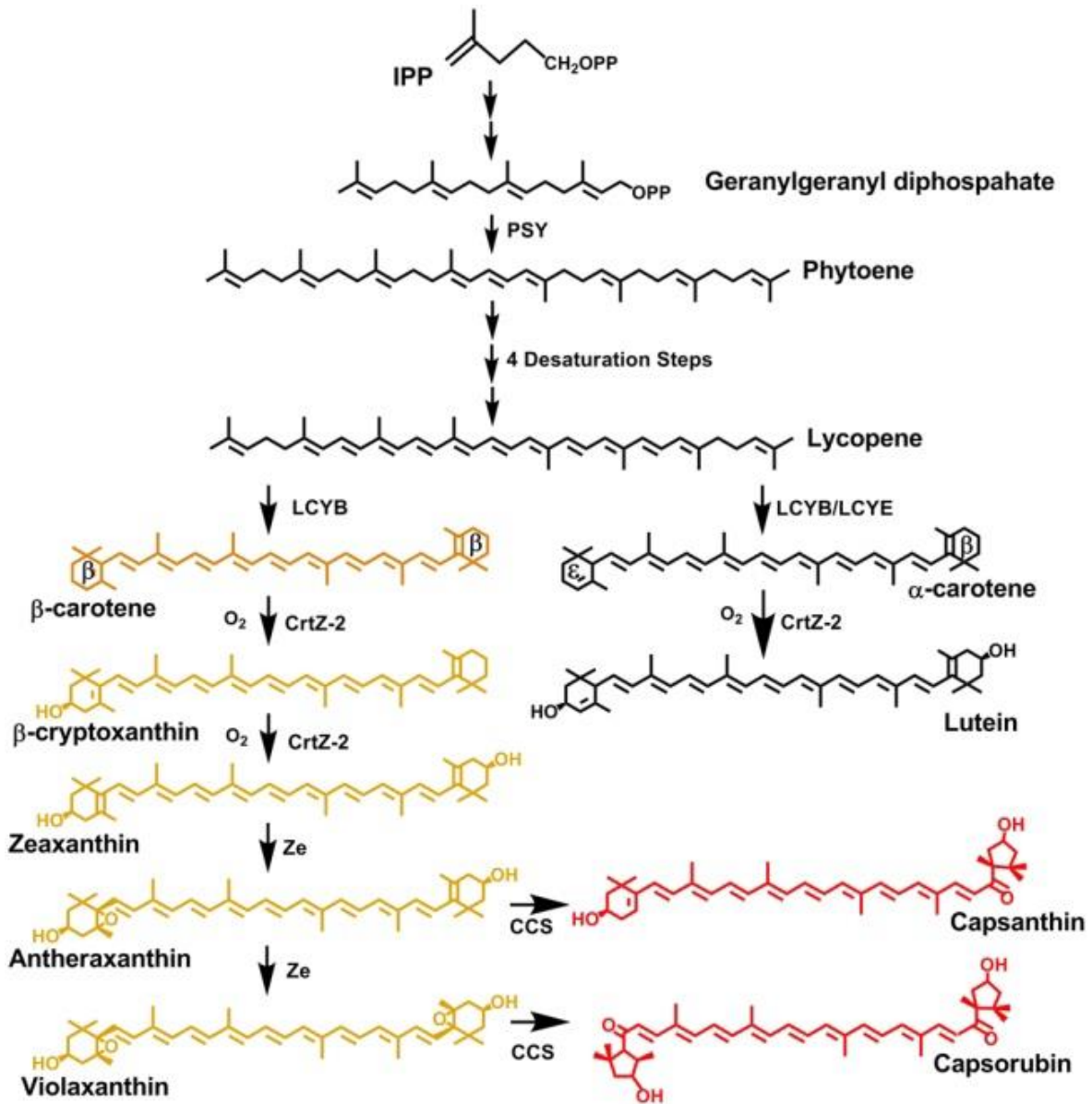


Figura 2. Ruta biosintética de los carotenoides (capsantina) en *Capsicum annuum* L. (Shah *et al.*, 2014)

### I.2.2.3 Actividades biológicas de la capsantina

La capsantina es el principal componente del pimiento rojo *Capsicum annuum* y se ha convertido en el centro de atención debido a su fuerte actividad antioxidante (Yamano *et al.*, 2001). Este compuesto es un pigmento rojo-naranja que abunda en los frutos de los pimientos rojos, sus beneficios principales incluyen las funciones de la vitamina A, de nutrición, anti-cancerígena y anti-radiación (Wu *et al.*, 2012)

En un estudio de Maeda *et al.*, (2013), la obesidad se relacionó a varias enfermedades, como la diabetes, la hiperlipidemia y la hipertensión; la adipocitoquina, la cual se libera de los adipocitos, afecta la resistencia a la insulina y a los desórdenes de nivel de lípidos en la sangre, la capsantina ha sido relacionada con el mejoramiento de los niveles de lípidos en la sangre, pues mejora la inflamación crónica en los adipocitos causada por la obesidad, ajusta la secreción de adipocitoquina y afecta las enfermedades del síndrome antimetabólico.

La actividad biológica de mayor interés para este compuesto es la actividad antioxidante, y ya se demostró que es mejor que otras xantofilas (Perez *et al.*, 2002; Materska *et al.*, 2005), debido a su estructura con baja autooxidación.

También se ha reportado que la capsantina es un anti-promotor del cáncer y tiene actividad de promoción anti-tumor, aun cuando no se ha observado actividad de provitamina A (Mori *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009).

En estudios epidemiológicos se observó que la capsantina inhibe la carcinogénesis en el colon (Kim *et al.*, 2009), y se ha demostrado que este compuesto inhibe el crecimiento de algunos hongos y la producción de sus toxinas, como *Aspergillus flavus* (Thanaboripat *et al.*, 2011)

### I.2.3 Búsqueda de nuevos herbicidas naturales

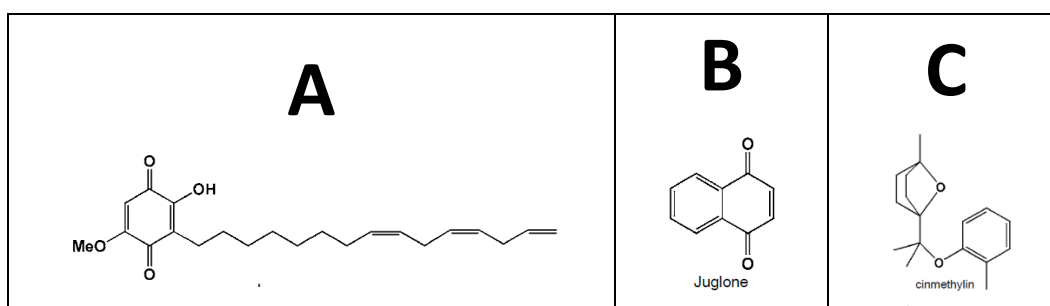
Uno de los factores que afectan la producción de los alimentos es el desarrollo de malezas. Las malezas son aquellas plantas que crecen en sitios donde no son deseadas, compiten por los nutrientes, agua y luz, son hospederos de plagas y enfermedades reduciendo la cantidad y calidad del producto e interfieren en la cosecha (González, 2007; Morales, 2014)

En el pasado, el control de malezas se ha caracterizado por el desarrollo de estrategias que buscaban conseguir metas económicas y sociales, sin unir estas estrategias a factores biológicos y sin investigar cómo interaccionan esos factores (Ghersa *et al.*, 1994)

Actualmente las malezas se controlan o se reduce su infestación por diferentes métodos (preventivos, físicos, culturales, biológicos y químicos). El más usado es el control químico, aunque últimamente ha producido uno de los mayores problemas de la agricultura del siglo XXI: la aparición de biotipos resistentes (LeBaron *et al.*, 1982; Powles *et al.*, 1994; De Prado *et al.*, 1997; Powles *et al.*, 2001; De Prado *et al.*, 2001; De Prado *et al.*, 2005). La resistencia a herbicidas ha ocurrido relativamente tarde con respecto a otros pesticidas, y no tuvo lugar hasta finales de la década de los 60's, con el primer caso descrito en poblaciones de *Senecio vulgaris* resistentes a las s-triazinas, atrazina y simazina (Ryan *et al.*, 1970). Desde la identificación de este primer biotipo, se ha incrementado la resistencia a diferentes herbicidas (Heap *et al.*, 2014)

Actualmente la preocupación por una agricultura no contaminante ha llevado a prohibir o restringir el uso de varios productos, incentivando la búsqueda de herbicidas de origen natural (Macías, 2012). A principios de los años noventa, algunos investigadores

propusieron una forma de obtener nuevos herbicidas más seguros a través del desarrollo de la investigación de los aleloquímicos (Macías *et al.*, 1995; Zavaleta, 2011). Se ha encontrado que diferentes aleloquímicos (Figura 3), tienen efecto herbicida actuando en diferentes sitios (Macías *et al.*, 1997; Czamota *et al.*, 2001; Vyvyan *et al.*, 2002; Nery, 2011), y la actividad reportada es comparable con los herbicidas comerciales, por ello, es importante continuar la búsqueda de otros herbicidas naturales.



**Figura 3. Estructura de diferentes aleloquímicos con efecto herbicida.** A, sorgoleona; B, juglona (nombre en herbicida comercial C. I. Natural Brown 7 o C. I. 75500); C, cinmetilina (como mezcla parte de una mezcla de herbicidas Patente 2178720 y 2196176)

Los aleloquímicos son compuestos que tienen diferentes efectos, a éstos también se les conoce como alelopáticos. La alelopatía es cualquier proceso que involucra metabolitos secundarios producidos y liberados por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyen sobre otros sistemas biológicos, de manera directa o indirecta tanto estimuladora como inhibitoria. Los efectos inhibitorios o perjudiciales de alguna especie de planta (donador) pueden observarse sobre la germinación, crecimiento o desarrollo de otra especie de planta (receptor) (Anaya *et al.*, 2001; Oliveros *et al.*, 2008; Morales, 2014), el interés en este campo de estudio se debe a su posible aplicación en la agricultura como herbicidas (Fischer *et al.*, 1990; Duke *et al.*, 2000)

Los herbicidas son pesticidas que se enfocan en la alteración de la fisiología de las plantas no deseadas o malezas por un tiempo largo, afectando severamente su crecimiento y ocasionando su muerte (Kogan *et al.*, 2003). Existen diferentes clasificaciones de herbicidas, por ejemplo: por sitio de acción, por etapa en la que se aplican, por estructura química, entre otras. Los herbicidas clasificados por etapa de aplicación son pre-siembra (antes de sembrar cultivo), pre-emergente (antes de que emerja el cultivo), y post-emergente (después de brote de cultivo y malezas)

La efectividad de todos los herbicidas se ve afectada por diversos factores como son el tipo de flora, su susceptibilidad, la etapa de crecimiento, las condiciones climáticas, entre otras, éstas determinan la dosis necesaria para la eliminación de malezas y la formulación para una formulación comercial. Los adyuvantes desempeñan un papel importante en la

formulación comercial, ya que pueden modificar propiedades del compuesto activo como retención, absorción, estabilidad, etc.

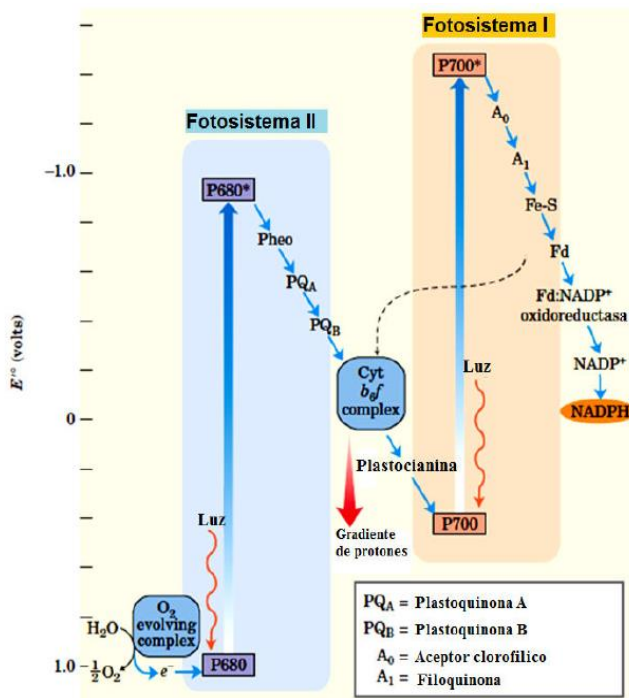
Diferentes trabajos de fraccionamiento biodirigido de extractos de diversas plantas, han sido relevantes para la obtención, identificación y evaluación de metabolitos secundarios; dentro de estos trabajos se han encontrado compuestos ya identificados pero cuya actividad herbicida no se conocía.

### I.2.3.1 Fotosíntesis y transporte de electrones

La fotosíntesis es el proceso bioquímico que transforma la luz solar y el  $\text{CO}_2$  en carbohidratos. Lo realizan las plantas, algunas algas y las cianobacterias. En las plantas, este proceso se lleva a cabo en los cloroplastos, específicamente en la membrana tilacoidal y en el estroma. Tiene lugar en dos etapas: reacciones de fase luminosa (la energía de la luz se utiliza para la síntesis de ATP y NADPH) y reacciones de fase oscura (el ATP y el NADPH impulsan la síntesis de carbohidratos a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ). La clorofila es el principal foto-receptor de la fotosíntesis, la cual, junto con pigmentos accesorios, forma el sistema de antenas receptoras donde se absorbe la luz, resultando en la excitación de estos pigmentos (Campbell *et al.*, 2004)

En la absorción de la luz participan procesos que se pueden explicar por medio de un modelo denominado esquema Z que postula que la fotosíntesis que produce oxígeno ocurre mediante las acciones de dos centros de reacción fotosintéticos que están conectados en serie (Figura 4). El fotosistema II (FSII) genera un oxidante fuerte capaz de oxidar el agua y, al mismo tiempo, un reductor débil. El fotosistema I (FSI) forma un reductor fuerte para reducir el  $\text{NADP}^+$  y un oxidante débil. Ambos fotosistemas interactúan para que la transferencia de electrones del  $\text{H}_2\text{O}$  al NADPH se lleve a cabo (Nelson *et al.*, 2009)

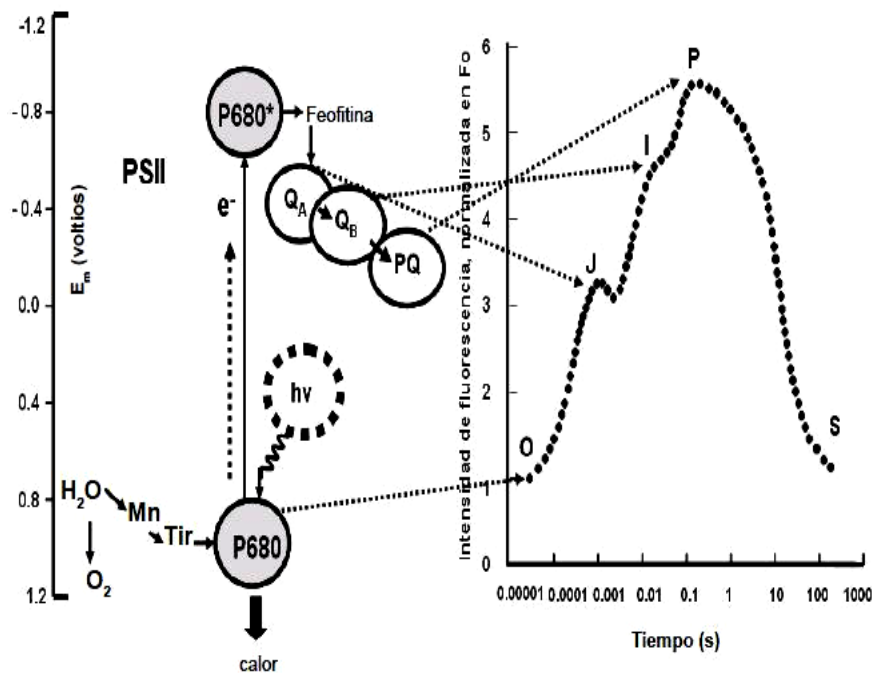
Un fenómeno que se puede estudiar partiendo de este esquema, es el transporte de electrones, el cual permite conocer el tipo de comportamiento que se presenta en diferentes situaciones o al evaluar diferentes compuestos. La información que se puede obtener es si existe inhibición de la reacción de Hill (en presencia o ausencia de ADP y Pi o en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se inhibe el transporte de electrones no cíclico y la síntesis de ATP), si existe inhibición de transferencia de energía (se unen al complejo ATPasa e inhiben el flujo de electrones) o si se comportan como desacoplantes (toman protones del medio interno y los liberan en el medio externo, lo cual produce un cambio en el gradiente de protones que se observa como un incremento en la velocidad de transporte de electrones para compensar el cambio) (Trebs, 1972; Voet *et al.*, 2005)



**Figura 4. Esquema Z de la fotosíntesis (Nelson *et al.*, 2009)**

### I.2.3.2 Fluorescencia de la clorofila a

La fluorescencia de la clorofila a se basa en un fenómeno fotoquímico relacionado con la fotosíntesis. Cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, parte de la energía absorbida se transforma en trabajo químicamente útil, otra parte se disipa en forma de calor y una parte menor es reemitida como fluorescencia. El incremento de uno repercute en la disminución de los otros dos, por ello es una medida indirecta de las alteraciones dentro de la fotosíntesis en el FSII y permite caracterizar efectos y modos de acción de diferentes estímulos como estrés ambiental, contaminantes de agua y herbicidas. Este método puede ser aplicado a plantas o algas intactas *in situ* e *in vivo* o a cloroplastos aislados, ya que es un método no invasivo, rápido y sensible. Al iluminar con luz las hojas adaptadas a la obscuridad, se observan cambios característicos en la intensidad de la fluorescencia de la clorofila a, a los cuales se les denomina Inducción de fluorescencia, curva de inducción de la fluorescencia, curva de Kaustski o curva OJIP (Figura 5). En esta curva se muestra una fase de incremento rápido de la fluorescencia en el primer segundo de iluminación (puntos O, J, I y P), seguida de una fase lenta de declive (puntos P y S). La fase rápida (O-P), está relacionada con los procesos primarios del FS II, mientras que la fase lenta (P-S), está asociada a las interacciones entre los procesos de la membrana tilacoidal y procesos metabólicos (en el estroma del cloroplasto), relacionados con un incremento en la asimilación del CO<sub>2</sub> (Bolhár-Nordenkamp *et al.*, 1993; Strasser *et al.*, 1995; González *et al.*, 2008)



**Figura 5. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II en la fase rápida y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones.** Donde “O” es el valor mínimo de la fluorescencia ( $F_0$ ), aparece alrededor de los 50  $\mu$ s y en ese momento todos los centros de reacción están oxidados (abiertos), “J” se desarrolla a los 2 ms ( $F_J = F_{2ms}$ ) y está relacionada con la reducción parcial de QA, “I” se observa a los 20 ms ( $F_I = F_{20ms}$ ) y está relacionada con la reducción parcial de QA y QB y “P” es el valor máximo de la fluorescencia ( $F_m$ ), en este momento todos los centros de reacción están reducidos. (González *et al.*, 2008; Morales, 2014).

El aumento de fluorescencia en la “fase rápida” se ha explicado como consecuencia de la reducción del total de aceptores de electrones en el FS II, particularmente QA y PQ. (cierre de los centros de reacción) y por lo tanto provee información de la actividad fotoquímica del FS II y la reducción (llenado) de la poza de plastoquinonas. La presencia de una proporción de centros de reacción cerrados, conduce a una disminución en la eficiencia fotoquímica, con un correspondiente incremento en la fluorescencia (Morales, 2014)

### 1.2.3.3 Germinación

La germinación empieza con la toma del agua por la semilla (imbibición) y finaliza cuando empieza la elongación del eje embrionario (radícula); este proceso biológico se puede ver influenciado por factores internos (variabilidad del embrión, dormancia, cantidad y calidad



de tejido de reserva) y externos (disponibilidad de agua, temperatura, oxígeno y luz) (Black *et al.*, 1994). La emergencia del eje (radícula nos permite reconocer cuando la germinación ha sido completa. El grado de avance de la germinación en una población de semillas se expresa en porcentaje en función del tiempo (King, 1999)

### **I.3 Antecedentes del trabajo**

La preselección de *Ricinus communis* se fundamentó en una revisión bibliográfica y en estudios previos. Esta planta llamada ricino, higuera o *R. communis* es una planta tropical, exótica, anual, pequeña, dicotiledónea del orden Euphorbiales e invasiva; nativa de la India aunque también se ha reportado ser de África. Dominante en terrenos abandonados. Su importancia radica en la obtención del aceite de sus semillas por lo cual, es cultivada en algunas regiones; sus semillas contienen compuestos que son altamente tóxicos (CONABIO, 2009, Qin-Gang *et al.*, 2009, Manpreet *et al.*, 2012)

En la revisión bibliográfica se encontró que la planta de *R. communis* tiene diferentes actividades biológicas (Tabla 1), como antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria, antitumoral, analgésica, larvívica, anticonceptiva, antiasmática e insecticida, además de que ya se han identificado compuestos extraídos de las hojas, tallos, semillas y frutos pero no se han evaluado para la posible actividad herbicida (Sitton *et al.*, 1975; Pradeep *et al.*, 2008; Manpreet *et al.*, 2012, Qin-Gang *et al.*, 2009; Jena *et al.*, 2012; Acharya *et al.*, 2013). Por ello, como primer objetivo de este trabajo se tenía que obtener un compuesto por medio de un fraccionamiento biodirigido donde se propone que el compuesto podría tener esta actividad herbicida (Zarco, 2012, no publicado; Ortega, 2014, no publicado). Los compuestos que se obtuvieron por este fraccionamiento fueron dos alcaloides (recinina y *N*-demetil-recinina) y un carotenoide (capsantina). Estos compuestos fueron evaluados en ensayos preliminares donde se observaron los mayores efectos en el carotenoide, por ello se decidió realizar toda la caracterización de este compuesto que es el objetivo de este trabajo.

Tabla 1. Extractos y compuestos aislados de *R. communis* L., con actividades biológicas. (Sitton *et al.*, 1975; Pradeep *et al.*, 2008; Manpreet *et al.*, 2009, Qin-Gang *et al.*, 2009; Jena *et al.*, 2012; Acharya *et al.*, 2013) NE: no especificado

<b>Actividad biológica</b>	<b>Extracto o compuesto</b>	<b>Origen de extracto o compuesto</b>	<b>Concentración con 50 % de inhibición</b>
Antimicrobiana Antiulcera	Extracto hexánico	Raíces Semillas	200 mg/mL 500 mg/kg
Citotóxica	Extracto clorofórmico	Hojas	10-40 µg/mL
Antioxidante	Extracto acetónico	Hoja	6.04 µg/mL
Antioxidante Anti-inflamatoria Antioxidante Anti-fertilidad Antimicrobiana	Extracto metanólico	Hoja Hoja Tallo Semillas Raíces	4.66 µg/mL 250 mg/kg NE NE 200 mg/mL
Hepatoprotectora Antiasmático Antihistaminico Antidiabética	Extracto etanólico	Hojas Raíces Raíces Raíces	250 mg/kg NE 100-150 mg/kg 500 mg/kg
Antioxidante	Rutina (flavonoide glicosilado)	Hoja	9.46 µg/mL
Antioxidante	Ácido gentísico	Hoja	2.92 µg/mL
Antioxidante	Quercetina	Hoja	4.62 µg/mL
Antioxidante	Ácido gálico	Hoja	3.15 µg/mL
Antioxidante	Epicatequina	Hoja	5.82 µg/mL
Antioxidante	Ácido ascórbico	Hoja	11. 1 µg/mL
Antioxidante	Ácido elágico	Hoja	2.52 µg/mL
Lipolítica Antitumor Citotóxica	Ricina (toxina)	Semilla Semilla Semilla	NE NE NE
Antifúngica	Ent-kaur-eno (diterpeno)	Semilla	0.17 nM
Antifúngica	Ent-beyereno [(+)-estaqueno] (diterpeno)	Semilla	0.17 nM
Antifúngica	Ent-sandaracopimaradieno (diterpeno)	Semilla	0.30 nM
Antifúngica	Casbeno (diterpeno)	Semilla	4.6 nM
Antilarvicida Molusquicida Insecticida Analgésica	Recinina	Fruto y hoja Hoja Hoja Raíces	NE NE NE NE
Antioxidante	Metil ricinoleato	Semilla	NE
Antioxidante	Ácido ricinoléico	Semilla	NE
Antioxidante	Ácido 12-octadecadienóico	Semilla	NE
Hepatoprotectora	N-demetil-recinina	Hojas	NE
Regeneradora de huesos	Poliuretano	Tallos	NE
Insecticida	Ácido linolénico	Hojas	849 ppm
Insecticida	Ácido linoléico	Hojas	857 ppm

# CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

## II.1 Hipótesis

La capsantina presenta actividad herbicida si inhibe la germinación de plantas modelo (mono- y/o di-cotiledóneas) y afecta el transporte de electrones fotosintético.

## II.2. Objetivo general

Determinar la actividad herbicida *in vitro* del metabolito secundario capsantina y proponer el sitio de acción específico para este compuesto.

## II.3. Objetivos particulares

1. Caracterizar químicamente el compuesto aislado de la planta *Ricinus communis* L.
2. Investigar una fuente alternativa, abundante en el compuesto identificado de *R. communis* L.
3. Obtener y caracterizar químicamente el compuesto de interés de la fuente alternativa.
4. Caracterizar la actividad herbicida pre- y post- emergente del compuesto de interés.
5. Determinar el sitio de acción del compuesto de interés, por medio de la inhibición del transporte de electrones fotosintético.

# Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

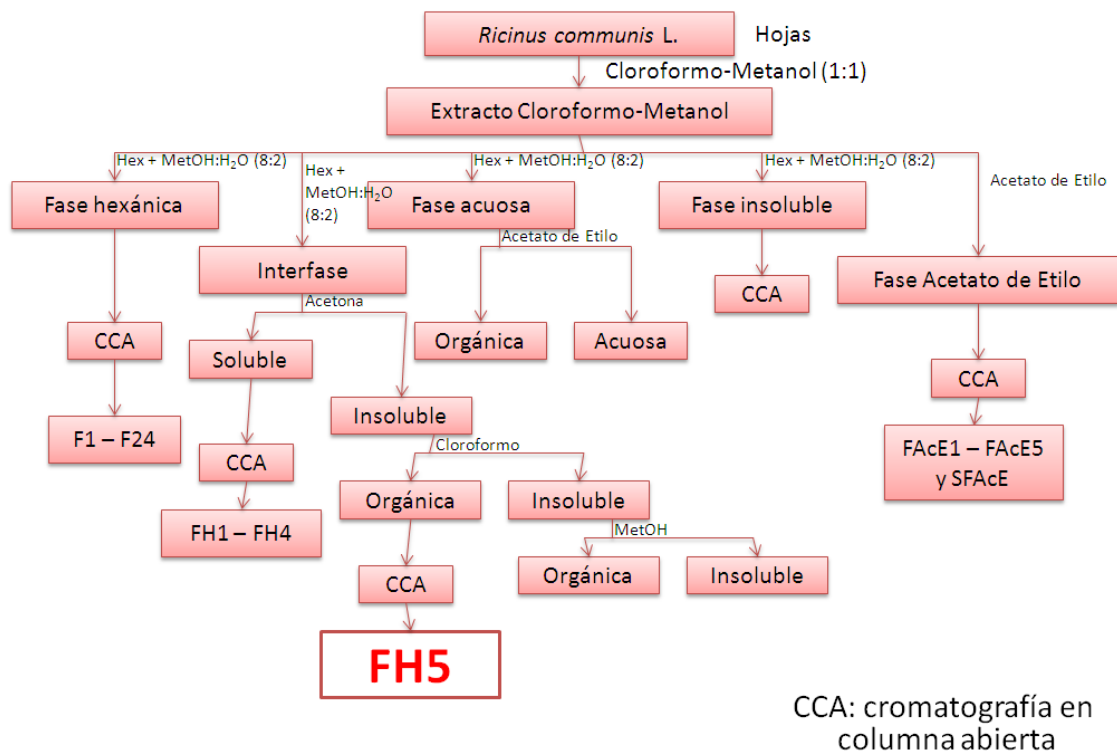
---

## III.1 Obtención y caracterización química de la capsantina

### III.1.1 Obtención de capsantina de la planta *Ricinus communis* L.

Se colectaron las hojas de la planta *Ricinus communis* L., en el Distrito Federal, Ciudad Universitaria a principios de Agosto del 2013, con el permiso de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) y con la ayuda de compañeros del laboratorio 115. La planta fue identificada por la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM campus C. U., donde se depositó un ejemplar con número 131501.

Las hojas se dejaron secar a temperatura ambiente por un mes y se pulverizaron en una licuadora (Osterizer modelo L-21). Para la extracción de la capsantina se siguió el diagrama del fraccionamiento biodirigido de *R. communis* L. (Figura 6). Se obtuvo un extracto total con una mezcla de disolventes (Cloroformo:Metanol 1:1), este extracto se disolvió en Metanol:Agua 8:2 y se obtuvo una fase insoluble. Por otro lado, se realizó una extracción secundaria del extracto total soluble utilizando hexano y se observaron tres fases (fase hexánica, interfase y fase acuosa). De la interfase se obtuvo la capsantina (del extracto insoluble en acetona y soluble en cloroformo y por medio de una cromatografía en columna abierta con gel sílice y gradiente de polaridad ascendente) En la fracción FH5 se observaron cristales rojos que se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) para determinar la pureza y similitud con otras fracciones. La fracción FH5 fue identificada como capsantina por medio de análisis espectroscópicos y espectrométricos (ver metodología más adelante)

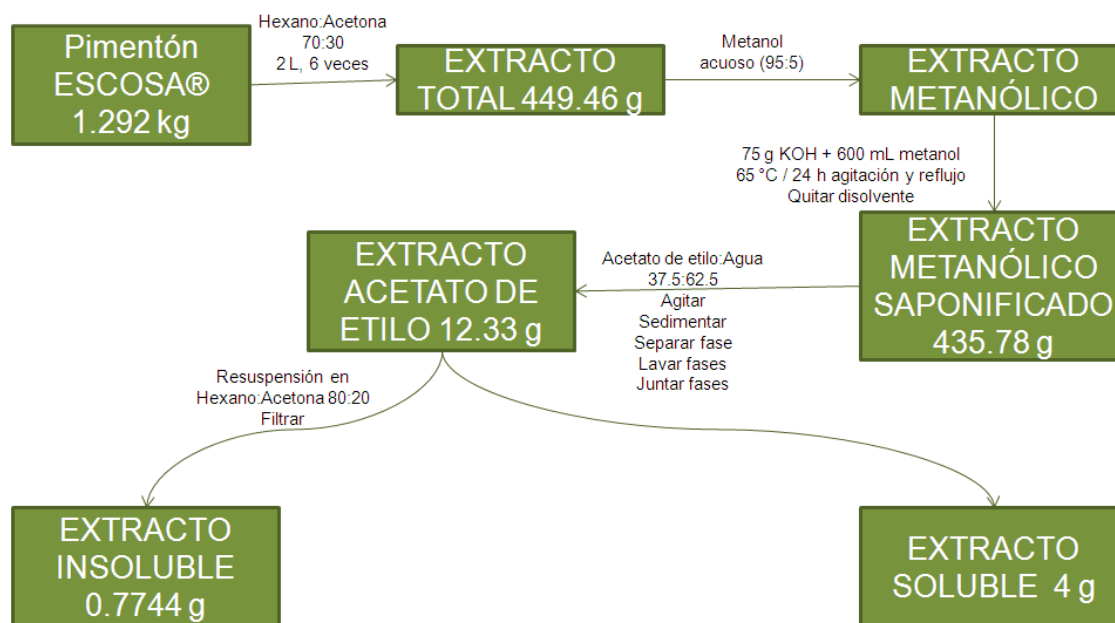


**Figura 6. Fraccionamiento biodirigido de la planta *Ricinus communis* L.** Se obtuvo la fracción FH5, posteriormente identificada como capsantina.

### III.1.2 Obtención de capsantina a partir de pimentón

Ya que algunos metabolitos secundarios se producen bajo condiciones de estrés, en ciertos periodos climáticos o en determinadas zonas geográficas, se realizó una búsqueda en la literatura para determinar la materia prima y la metodología adecuadas para obtener la mayor cantidad de capsantina posible. Se decidió utilizar como materia prima el pimentón (*Capsicum annuum*) y como metodología la patente No. US20120321730 con ciertas modificaciones; en lugar de utilizar el equipo extractor de fluido supercrítico y CO<sub>2</sub>, se realizó una separación por cromatografía en columna abierta (CCA)

Del pimentón (1.3 kg, marca ESCOSA®), fueron extraídos los compuestos por medio de una mezcla de disolventes (Hexano:Acetona 7:3, 2 L 6 veces), de este extracto se obtuvo la fase soluble en metanol acuoso y se saponificó (KOH en metanol 2.5 % m/v 60 °C 24 h). La fase saponificada se disolvió en acetato de etilo y se realizaron extracciones utilizando dos fases: acetato de etilo y agua. Se juntaron las fases solubles en acetato de etilo y se eliminó el disolvente por evaporación. Posteriormente, se disolvieron en Hexano:Acetona 8:2 y se filtraron usando vacío y con papel filtro Whatman Grado 54 (Figura 7). Se obtuvieron dos extractos (insoluble y soluble), de los cuales uno de ellos (extracto soluble), se analizó por medio de TLC y se observó la capsantina en abundancia con impurezas.



**Figura 7. Diagrama para la obtención de la capsantina del pimentón.** Tanto en el extracto insoluble como en el soluble se identificó como compuesto mayoritario la capsantina (Patente US20120321730)

El extracto soluble o extracto enriquecido en capsantina (hasta un 44 % de capsantina y 2 % de capsorubina, los carotenoides más abundantes de este extracto de acuerdo con Deli József *et al.*, 2001), fue utilizado para el desarrollo de todos los ensayos descritos en la caracterización bioquímica. Realizando una pequeña búsqueda del compuesto aislado se encontró que existen proveedores que venden el extracto como capsantina, con lo cual se determinó que el extracto soluble de pimentón es viable para evaluarse como capsantina. De aquí en adelante a este extracto se le llamará extracto enriquecido en capsantina o EEC.

### III.1.3 Identificación de capsantina por pruebas físico-químicas, TLC, RMN y HPLC-MS-CG

Para saber la identidad del compuesto se realizaron diferentes pruebas físico-químicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Se determinó la solubilidad del compuesto utilizando vidrios de reloj y evaluando si diferentes disolventes orgánicos formaban una sola fase. Los disolventes evaluados fueron hexano, clorofórmico, acetato de etilo y metanol.

Se determinó el punto de fusión de compuesto por medio de un equipo Fisher Johns y un termómetro para determinar el cambio de fase del compuesto de sólido a líquido.

Se determinó si correspondía a un carotenoide por medio de una prueba colorimétrica utilizando ácido sulfúrico y cloroformo. Se disolvieron 10 mg del compuesto en 2 mL de cloroformo y se le agregaron 2 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La presencia de un color azul oscuro indica presencia de carotenoides (Ikan *et al.*, 1991)

Se realizó un espectro de absorción del compuesto de 190 a 700 nm con un espectrofotómetro Beckman modelo DU650; con éste se determinaron los picos máximos de absorción utilizando 10 mg del compuesto disueltos en acetona pura. Las longitudes de onda de absorción máxima para la capsantina en benceno son 483 y 584 nm (Ikan *et al.*, 1991)

Se realizaron diferentes cromatografías en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography), utilizando como fase estacionaria placas de aluminio recubiertas con gel sílice de 0.25 mm de espesor (sílice gel 60 F254 0.25 mm, Merck), y como fase móvil diferentes gradientes de polaridad con mezclas de disolventes orgánicos. Se revelaron estas placas con luz UV de onda corta y larga (254 y 366 nm, respectivamente), y con sulfato cérico amoniacal como agente cromógeno (en baño de hielo se agregaron 350 g de hielo en vaso de precipitados, cuidadosamente 22 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y finalmente 12 g de sulfato cérico amoniacal; se agitó con una varilla de vidrio hasta disolver y se filtró), colocando el agente cromógeno sobre la superficie de la placa y después se colocó la placa en una parrilla eléctrica (100 °C y 5 min)

Para determinar la estructura del compuesto se obtuvieron los espectros de <sup>1</sup>H RMN (a una frecuencia de 300 MHz, empleando CDCl<sub>3</sub> o cloroformo deuterado), <sup>13</sup>C RMN, COSY (a una frecuencia de 400 MHz, con CDCl<sub>3</sub>, para interacciones de protones), HSQC (a una frecuencia de 400 MHz con CDCl<sub>3</sub> para interacciones de protones y carbonos), HMBC (a una frecuencia de 400 MHz con CDCl<sub>3</sub> para interacciones de protones y carbonos), CG-EM-IE, HPLC-MS-CG; los cuales fueron realizados en la Unidad de Servicios Analíticos y de Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM por Q. Georgina Duarte Lisci, Q. Alejandrina A H y Q. Ernesto Salgado O. Con la ayuda de la Dra. M. Isabel Aguilar Laurents se realizó la elucidación de la estructura del compuesto.

### **III.2 Caracterización bioquímica de la capsantina**

Para estos ensayos el compuesto aislado se disolvió en dimetilsulfóxido o DMSO (a una concentración máxima de 2 % v/v, la cual no presenta efecto significativo). Este mismo compuesto se utilizó como control negativo en todos los ensayos, a una concentración de 2 % v/v, mientras que se utilizó como blanco la germinación de las semillas con agua destilada y esterilizada.

#### **III.2.1 Ensayo semi-*in vivo* de germinación y elongación de tallo y raíz**

Para estos ensayos las semillas de tomate (*Physalis ixocarpa*), pasto (*Lolium perenne*) y trigo (*Triticum aestivum*) fueron variedades comerciales obtenidas del mercado de

Xochimilco, y las semillas de lechuga (*Lactuca sativa* variedad Paris Island Cos) fueron obtenidas de la marca Westar Seeds International, Inc.

Por separado, se colocaron 40 semillas de pasto, 20 semillas de trigo, 40 semillas de lechuga y 40 semillas de tomate en cajas petri (9 cm de diámetro y 2.5 cm de alto) con papel filtro y 10 mL de disolución del compuesto a diferentes concentraciones (25, 50 y 100  $\mu$ M). Se incubaron en la oscuridad a 30 °C en una incubadora WTC Binder por los días necesarios (3 días para la germinación y 2 días para elongación de tallo y raíz, aproximadamente). Se contaron las semillas germinadas, se midió la longitud de la raíz y la longitud del tallo con una regla y se determinó el porcentaje de inhibición de germinación, de elongación de raíz y de elongación de tallo respecto al control.

### III.2.2 Ensayos *in vitro*

Para todos estos ensayos (excepto la Fluorescencia de la clorofila *a* en discos de hojas de espinacas), se utilizaron cloroplastos aislados de hojas de espinacas (*Spinacea oleraceae* L.), con el método descrito a continuación. Este procedimiento se realizó en la oscuridad.

Aislamiento de cloroplastos: Se seleccionaron aproximadamente 40 g de hojas verdes, frescas y turgentes de espinacas (*S. oleraceae* L.), que no estuvieran maltratadas ni rotas, se lavaron cuidadosamente con agua y se les retiró el exceso de agua colocándolas sobre hojas de papel. Se desechó la nervadura y el ápice de cada hoja, se trocearon y se molieron por pulsos para no dañar los cloroplastos en una licuadora Osterizer modelo L-21 con 250 mL de medio de aislamiento (400 mM sacarosa, 5 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 20 mM KCl y 30 mM HEPES pH 8.0), a 4 °C. El molido se pasó a través de ocho capas de gasa y el filtrado se recibió en tubos de plástico, los cuales se mantuvieron en hielo. Los cloroplastos se sedimentaron por centrifugación a 630 g (4000 rpm), a 4 °C por 5 min en centrífuga SorvalSuper DUPONT modelo T21. El sobrenadante se desechó y las pastillas (cloroplastos), se resuspendieron en un volumen máximo de 2 mL del mismo medio y se mantuvieron en oscuridad a 4 °C. Los cloroplastos aislados de esta forma tienen una vida útil de 12 horas aproximadamente (Calera *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1980; Saha *et al.*, 1971)

Cuantificación de clorofila: Para todos los ensayos *in vitro* se realizó la cuantificación de la clorofila total (Chl), de los cloroplastos aislados por DUPLICADO de acuerdo con el método descrito por Arnon *et al.*, en 1949, como se indica a continuación. Se colocaron 15  $\mu$ L de cloroplastos aislados en un matraz aforado de 5 mL, se llevó al aforo con acetona 80 % v/v, se agitaron, se incubaron 5 min en hielo y oscuridad, para eliminar membranas y proteínas se centrifugaron a 630 g (4000 rpm), por 5 min a temperatura ambiente en centrífuga clínica 8S Hettich modelo EBA y se midió la absorbancia a dos longitudes de onda: 663 nm para la clorofila *a* ( $A_{663}$ ), y 645 nm para la clorofila *b* ( $A_{645}$ ), en un espectrofotómetro Beckman modelo DU650. Por medio de la ecuación:

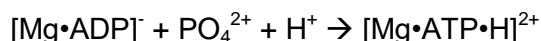
$$[Chl] = \frac{15 \mu L * 60 \mu g Chl}{\{[8.05 * (A_{663})] + [20.29 * (A_{645})] * 5 mL\}}$$



se determinó el volumen necesario de los cloroplastos para tener 60 µg de clorofila total (clorofila *a* y clorofila *b*), estos µg de clorofila se ocuparon en los ensayos *in vitro*.

### III.2.2.1 Síntesis de ATP

Por medio de un microelectrodo Orion modelo 8103 Ross conectado a un potenciómetro Corning modelo 12 con escala expandida, se observaron los cambios de pH registrados en un aparato Gilson. Para cada reacción se colocaron 3 mL de medio de síntesis de ATP (100 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.5 mM KCN, 50 µM MV, 1 mM HEPES pH 8.0), 1 mM ADP (30 µL de disolución 100 mM), 3.83 mM de Pi (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> fósforo inorgánico disuelto en medio de síntesis de ATP y pH 8.0) y cloroplastos (60 µg de clorofila total); se ajustó el pH a 8.00 ± 0.05 con HCl y/o KOH (a diferentes concentraciones 1N, 0.1N y 0.01N), y se agregaron 60 µg de Chl, la reacción se iluminó por 1 min y el consumo de H<sup>+</sup> por ATP se observó como la reacción:



Para determinar el consumo de H<sup>+</sup> por la síntesis de ATP, con diferentes concentraciones del compuesto se procedió como se indicó anteriormente, con la diferencia de que se agregó el volumen deseado del compuesto.

Por medio de un título (3 mL de medio de síntesis de ATP, 1mM de ADP, 3.83 mM de Pi, 1.17 µN de KOH y 60 µg de Chl), se transformaron los cambios de pH a µM de ATP sintetizado, y de esta forma se determinó la velocidad de síntesis de ATP utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad} \frac{\mu\text{M ATP}}{\text{mg Chl} \cdot \text{h}} =$$

$$(\text{pendiente} - \text{control o compuesto cm}) * \frac{(50 \mu\text{L KOH} \cdot 0.007 \text{ N} = 1 \mu\text{M ATP})}{(\text{pendiente} - \text{título cm}) \cdot 60 \mu\text{g Chl} \cdot 1 \text{ min}} * \frac{0.001 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} * \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}}$$

Éste es un método simple que provee una medida real de la síntesis (o hidrólisis), de ATP. La técnica es, por lo tanto, la ideal para determinar la velocidad de hidrólisis de ATP y para efectuar estudios cinéticos de este proceso (Dilley *et al.*, 1972; Hipkins *et al.*, 1986; Jiménez *et al.*, 1998; King, 1999)

### III.2.2.2 Transporte de electrones fotosintético

Con un oxímetro YSI (Yellow Spring Instrumental), modelo 5300 y un electrodo tipo Clark se determinó de forma indirecta el flujo de electrones fotosintético no cíclico en presencia de un aceptor artificial de electrones (de agua a MV, metilviológeno), por medio del monitoreo de producción de oxígeno liberado durante la fotólisis del agua bajo tres condiciones:

1. Transporte basal [3 mL de medio de transporte de electrones con MV (100 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 15 mM HEPES, 0.5 mM KCN y 50 µM MV pH

8.0), cloroplastos (60 µg de Chl), y las diferentes concentraciones de extracto o compuesto],

2. Transporte fosforilante [3 mL de medio de transporte de electrones con MV, 1 mM de ADP 100 mM (disuelto en medio de síntesis de ATP y pH 6.5), 3.83 mM de Pi), cloroplastos (60 µg de Chl), y las diferentes concentraciones de extracto o compuesto] y

3. Transporte desacoplado [3 mL de medio de transporte de electrones con MV, 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl 250 mM (disuelto en agua), cloroplastos (60 µg de Chl), y las diferentes concentraciones de extracto o compuesto].

Estas tres condiciones se evaluaron al iluminar la mezcla de reacción por 3 min y observando los cambios de voltaje (debidos a la liberación mayor o menor de oxígeno), en un graficador acoplado al oxímetro YSI. El graficador realiza trazos a los cuales se les determinaron las pendientes y éstas se transformaron a equivalentes de electrones, utilizando un título. Por medio de un título (3 mL de transporte de electrones sin MV (100 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 15 mM HEPES y 0.5 mM KCN pH 8.0), 0.13 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 40 mM (disuelto en agua destilada), y cloroplastos (60 µg de Chl), se transformaron los cambios de pH a µeq de O<sub>2</sub>, velocidad de transporte de electrones fotosintético no cíclico utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad } \frac{\mu\text{eq } O_2}{\mu\text{g Chl} \cdot \text{h}} =$$
$$(\text{pendiente} - \text{control o compuesto cm}) * \frac{(0.4 \mu\text{eq } O_2)}{(\text{pendiente} - \text{título cm}) \cdot 60 \text{ mg Chl} \cdot 1 \text{ min}} * \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} * \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}}$$

Se determinó el porcentaje de la velocidad del transporte de electrones no cíclico respecto al control; todos estos datos fueron graficados contra las concentraciones evaluadas (Calera *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1971; King, 1999)

### III.2.2.3 Reacciones parciales

Se midió polarográficamente el transporte de electrones desacoplado del FSII, de H<sub>2</sub>O a DCBQ (Yruela *et al.*, 1991); se colocaron 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV (100 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 15 mM HEPES y 0.5 mM KCN pH 8.0), 1 µM de DBMIB (inhibidor del paso de electrones al FSI), 0.6 mM (disueltos en etanol), 150 µM de DCBQ (aceptor de electrones artificial), 20 mM (disueltos en etanol), 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl y cloroplastos (60 µg de Chl), en la cubeta de reacción. Se dejó estabilizar (1 min aproximadamente), el electrodo con la mezcla de reacción y se iluminó la mezcla de reacción por 3 min. Para evaluar el compuesto, éste fue agregado antes de los cloroplastos. Por medio del graficador, se determinó el porcentaje de la velocidad del transporte de electrones no cíclico respecto al control; todos estos datos fueron graficados contra las concentraciones evaluadas.

Se midió polarográficamente el transporte de electrones desacoplado del FSI, de DCPIP<sub>red</sub> a MV (Yruela *et al.*, 1991); se colocaron 3 mL de medio de transporte de electrones con MV (100 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 15 mM HEPES, 0.5 mM KCN y 50

μM MV pH 8.0), 10 μM de DCMU 3Mm (disuelto en etanol), 100 μM DCPIP 20 Mm (disuelto en etanol), 300 μM ácido ascórbico 20 mM (disuelto en agua), 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl 250 mM (disuelto en agua), y cloroplastos (60 μg de Chl), en la cubeta de reacción. Se dejó estabilizar (1 min aproximadamente), el electrodo con la mezcla de reacción y se iluminó la mezcla de reacción por 3 min. Para evaluar el compuesto, éste fue agregado antes de los cloroplastos. Por medio del graficador, se determinó el porcentaje de la velocidad del transporte de electrones no cíclico respecto al control; todos estos datos fueron graficados contra las concentraciones evaluadas.

Se midió polarográficamente el transporte de electrones desacoplado del FSII, de H<sub>2</sub>O a SiMo (sílico molibdato); se colocaron 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV, 10 μM de DCMU 3Mm (disuelto en etanol), 50 μM SiMo 20 Mm (disuelto en etanol), 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl 250 mM (disuelto en agua), y cloroplastos (60 μg de Chl), en la cubeta de reacción. Se dejó estabilizar el electrodo (1 min aproximadamente), con la mezcla de reacción y se iluminó la mezcla de reacción durante 3 min. Para evaluar el compuesto, éste fue agregado antes de los cloroplastos. Por medio del graficador, se determinó el porcentaje de la velocidad del transporte de electrones no cíclico respecto al control; todos estos datos fueron graficados contra las concentraciones evaluadas (Saha *et al.*, 1971; Allen *et al.*, 1974; Calera *et al.*, 1995; King, 1999)

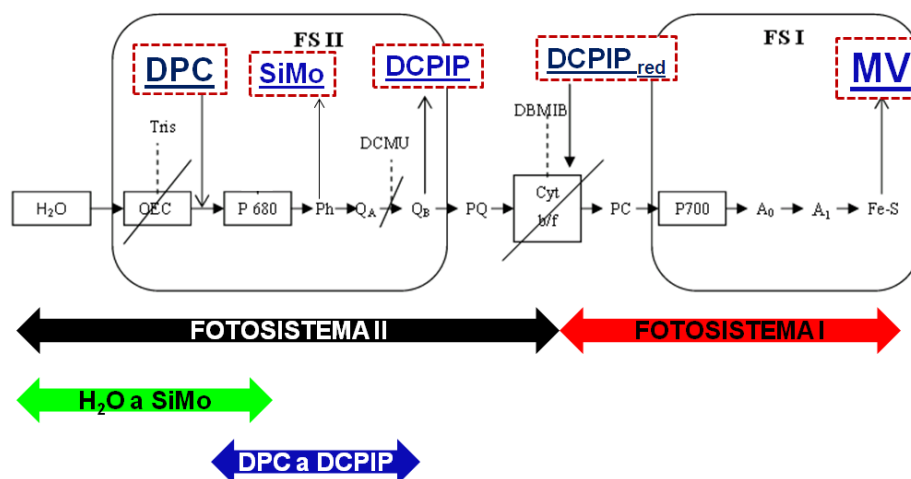
Se midió espectrofotométricamente el transporte de electrones desacoplado del FSII, de DPC a DCPIP; se prepararon cloroplastos envenenados con TRIS, para ello se colocaron cloroplastos (300 μg de Chl), y 1 mL de TRIS 0.8 mM en un tubo para centrifuga, se incubaron 30 min, en obscuridad con agitación y en un baño de hielo, se centrifugaron a 630 g (4000 rpm), por 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y la pastilla o cloroplastos se resuspendió en 500 μL de medio de aislamiento de cloroplastos. Se cuantificó la clorofila de los cloroplastos envenenados y se determinó el volumen para tener 40 μg de Chl para cada reacción. Se calibró el espectrofotómetro a 0.000 en absorbancia a una λ de 600 nm con una mezcla de 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV, 200 μM de DPC 20 mM (disueltos en etanol), 1 μM de DBMIB (inhibidor del paso de electrones al FSI), 0.6 mM, 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl 250 mM y cloroplastos (40 μg de Chl). Para cada reacción se colocó en un celda 2.94 mL de medio de transporte de electrones sin MV, 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl 250 mM, 200 μM de DPC 20 mM (disueltos en etanol), 1 μM de DBMIB (inhibidor del paso de electrones al FSI), 0.6 mM, 100 μM DCPIP 20 mM (disueltos en etanol), y cloroplastos (40 μg de Chl), se agitaron y se midió la absorbancia ( $A_{\text{obscuridad}}$ ), se iluminó la celda por 2 min con agitación constante y se midió la absorbancia ( $A_{\text{iluminado}}$ ). Para determinar la velocidad de transporte de electrones en esta reacción, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} \frac{\text{mol DCPIP}}{\text{mg Chl} * h} = \frac{(A_{\text{obscuridad}} - A_{\text{iluminado}})}{(\epsilon = 21.8 \text{ cm}^{-1} \text{mol}^{-1}) * (1 \text{ cm})} * \frac{1}{(40 \mu\text{g Chl} * 2 \text{ min})} * \frac{1 \mu\text{g}}{0.001 \text{ mg}} * \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}}$$

Se determinó el porcentaje de la velocidad del transporte de electrones no cíclico respecto al control; todos estos datos fueron graficados contra las concentraciones evaluadas.

Las reacciones parciales descritas anteriormente se esquematizan en la Figura 8, donde se observa el transporte de electrones no cíclico fotosintético evaluado.

### Reacciones parciales:



**Figura 8. Transporte de electrones en cloroplastos.** Los sitios de inhibición se muestran con líneas punteadas y los sitios de donación y aceptación de electrones con flechas.

#### III.2.2.4 Fluorescencia de la clorofila a en cloroplastos

Se colocaron los cloroplastos (60  $\mu\text{g}$  de Chl), en cuadros de papel filtro (1.5 X 1.5 cm), utilizando una micropipeta de tal forma que se formara un círculo uniforme. Cada cuadro de papel filtro se colocó en 3 mL de medio de transporte de electrones sin MV (100 mM sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 15 mM HEPES y 0.5 mM KCN pH 8.0), y se dejaron incubar en agitación y en oscuridad por 5 min. Al final de este tiempo se midió la fluorescencia de la clorofila a con un fluorómetro marca Hansatech Modelo Handy PEA (Plant EfficiencyAnalyser), iluminando la muestra durante 5 segundos con luz de  $\lambda = 650$  nm, con una intensidad alta (alrededor de  $3000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), empleando un clip especial que permite la adaptación a la oscuridad y define el área de medición en la muestra. Por medio de los programas Biolyzer HP.3 y Origin 7.0, se derivaron parámetros biofísicos que permiten cuantificar la actividad fotosintética, así como determinar el sitio de inhibición. Por medio de la observación de bandas (K o en 0.3 ms para el lado donador del FSII, J o en 2 ms para el lado aceptor del FSII, entre otras), se determinó el sitio de

inhibición del transporte de electrones relativo al control negativo (Strasser *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2008; Nery, 2011)

Para evaluar el compuesto, además del medio de transporte de electrones sin MV se colocaron las diferentes concentraciones y se dejó incubar el mismo tiempo. Se utilizó como control positivo el compuesto DCMU, herbicida comercial que inhibe el transporte de electrones compitiendo por el sitio en la quinona A ( $Q_A$ ). Cada control o concentración se evaluó cuatro veces.

Este mismo ensayo se realizó con medio de aislamiento de cloroplastos en lugar de medio de transporte de electrones sin MV, ya que se ha observado que los cloroplastos no lisados (en medio de aislamiento), presentan mejores resultados que cuando se encuentran lisados (en medio de transporte de electrones sin MV) (Morales *et al.*, 2015)

#### III.2.2.5 Fluorescencia de la clorofila a en discos de hojas de espinacas

Se eligieron hojas de espinacas en buenas condiciones, se lavaron con agua y se les retiró el exceso con papel secante. Se cortaron 15 discos de 1 cm de diámetro para cada muestra (control, control positivo, compuesto a diferentes concentraciones), utilizando un sacabocados.

Se colocaron los 15 discos con la cara más oscura hacia abajo en cajas petri que contenían una disolución con 20 mL de medio de Krebs (2.5  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 115 mM NaCl, 5.9  $\mu\text{M}$  KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ), se iluminaron por 2 horas con agitación constante. Se agregó a cada caja petri el compuesto correspondiente en el caso del control negativo (el disolvente DMSO), se colocó el volumen máximo de DMSO utilizado con la concentración mayor evaluada del compuesto, en el caso del control positivo (herbicida DCMU), se utilizó una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , y con el compuesto se utilizaron diferentes concentraciones (desde 25 hasta 300 ppm). Se dejaron iluminar 2 horas más con agitación y después de este tiempo, se dejaron en oscuridad por 15 min con agitación y finalmente se midió la fluorescencia de la clorofila a con un fluorómetro marca Hansatech Modelo Handy PEA (Plant EfficiencyAnalyser), iluminando la muestra durante 5 segundos con luz de  $\lambda = 650$  nm, con una intensidad alta (alrededor de 3000  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), empleando un clip especial que permite la adaptación a la oscuridad y define el área de medición en la muestra. Por medio de los programas Biolyzer HP.3 y Origin 7.0, se derivaron parámetros biofísicos que permiten cuantificar la actividad fotosintética, así como determinar el sitio de inhibición. Por medio de la observación de bandas (K o en 0.3 ms para el lado donador del FSII, J o en 2 ms para el lado aceptor del FSII, entre otras), se determinó el sitio de inhibición del transporte de electrones relativo al control negativo (Strasser *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2008; Nery, 2011)

#### III.2.3 Análisis estadístico

Para los ensayos semi-*in vivo* de germinación y elongación de tallo y raíz, los ensayos *in vitro* de síntesis de ATP, transporte de electrones fotosintético y reacciones parciales, se

realizaron análisis estadísticos de *t* de Student, con  $\alpha = 95 \%$  (con éste análisis sólo se compararon los tratamientos con el control), y con ello se determinó si hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) o no entre los tratamientos. Este análisis se realizó con la ayuda del programa Microcal Origin versión 6.0.

Adicionalmente se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una y dos vías con  $\alpha = 95 \%$ , para determinar si hay diferencia significativa o no entre tratamientos. Este análisis se realizó con la ayuda del programa de Microsoft Excel y GraphPrism versión de prueba, respectivamente (ANEXO 3)

# CAPÍTULO IV. RESULTADOS

## IV.1 Obtención y caracterización química de la capsantina

IV.1.1 Rendimiento de extractos y compuestos obtenidos de la planta *Ricinus communis* L. y del pimentón.

Del fraccionamiento biodirigido de las hojas de *Ricinus communis* L. se obtuvieron diferentes cantidades de extractos (Tabla 2). De la fracción de interés (FH5), que se identificó posteriormente como capsantina, se obtuvo el 0.004 %, es decir, 0.04 g, los cuales se utilizaron para la identificación química del compuesto y para los ensayos de germinación y transporte de electrones (basal, fosforilante y desacoplado)

Del pimentón se obtuvieron diferentes cantidades de extractos (Tabla 2), y el extracto enriquecido en capsantina (EEC), obtenido correspondió al 0.31 % de la materia prima inicial, con este EEC se realizó la caracterización química y se caracterizó bioquímicamente la actividad herbicida del compuesto.

**Tabla 2. Rendimiento de extractos y de la capsantina obtenida de dos fuentes.**

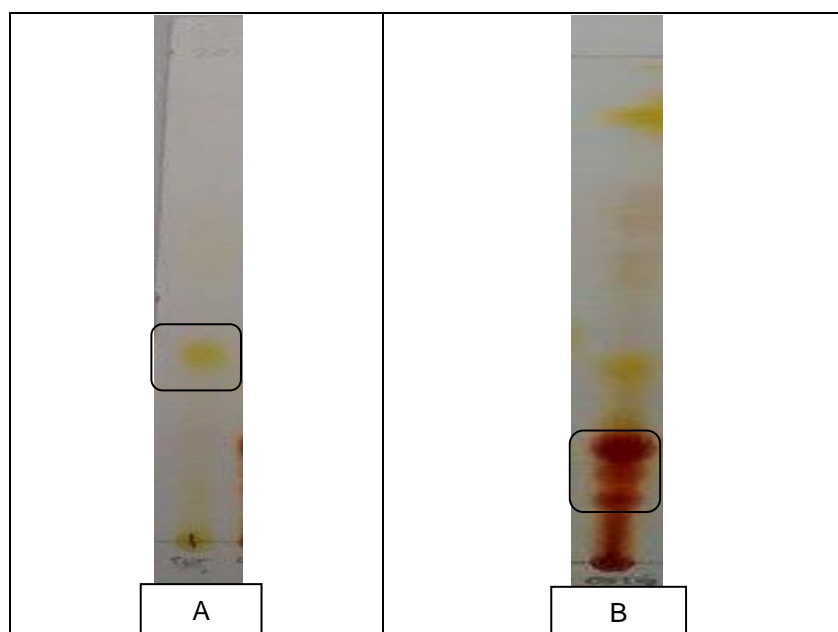
Fuente:	<i>Ricinus communis</i> L.	Pimentón comercial
Materia prima	Hojas secas: 1 kg	Polvo: 1.292 kg
Extracto total	Cloroformo-Metanol: 108.05 g	Hexano-Acetona: 449.46 g
Otros extractos	Interfase: 58.08 g	Metanólico: NM
	Insoluble en acetona: NM	Saponificado: 435.78 g
	Soluble en cloroformo: 0.16 g	Acetato de etilo: 12.33 g
Capsantina:	Fracción FH5: 0.04 g (0.004 %)	Extracto enriquecido en capsantina: 4 g (0.31 %)

NM: no medido

### IV.1.2 Identificación de la capsantina

Como primera forma para llevar a cabo la identificación del compuesto se realizaron diferentes cromatografías en capa fina (TLC), con diferentes mezclas de disolventes para determinar si el compuesto se encontraba puro (al observar una sola mancha), o si contenía otros compuestos (más de una mancha)

Con el gradiente 65:35 de hexano:acetato de etilo, se observó que el compuesto capsantina (FH5 Fig. 9A y EEC Fig. 9B), contenía otros compuestos, los cuales se encontraban en muy baja cantidad ya que, al revelar las TLC con sulfato cérico amoniacal, sólo se observaba una mancha.



**Figura 9. TLC o Cromatografía en Placa de la capsantina obtenida de *Ricinus communis* L. (A) y del pimentón (B).** Donde A corresponde a la capsantina obtenida de *R. communis* L. con clave FH5; y B es el extracto enriquecido en capsantina con clave EEC obtenido de pimentón. Se utilizó como fase móvil Hexano:Acetato de etilo (65:35), y como fase estacionaria gel de sílice de 0.25 mm de espesor, posteriormente, estas TLC se revelaron con un agente cromógeno de sulfato cérico amoniacal.

Después se determinó el punto de fusión, la solubilidad, las longitudes de absorción máxima y la presencia de carotenoides (Tabla 3 y Figura 10). Con estas pruebas se determinó que el compuesto aislado de *R. communis* L. y el compuesto enriquecido extraído del pimentón (EEC), correspondía a un carotenoide soluble en disolventes polares y no polares, así como que su punto de fusión se encuentra entre el rango de 127-131 °C.

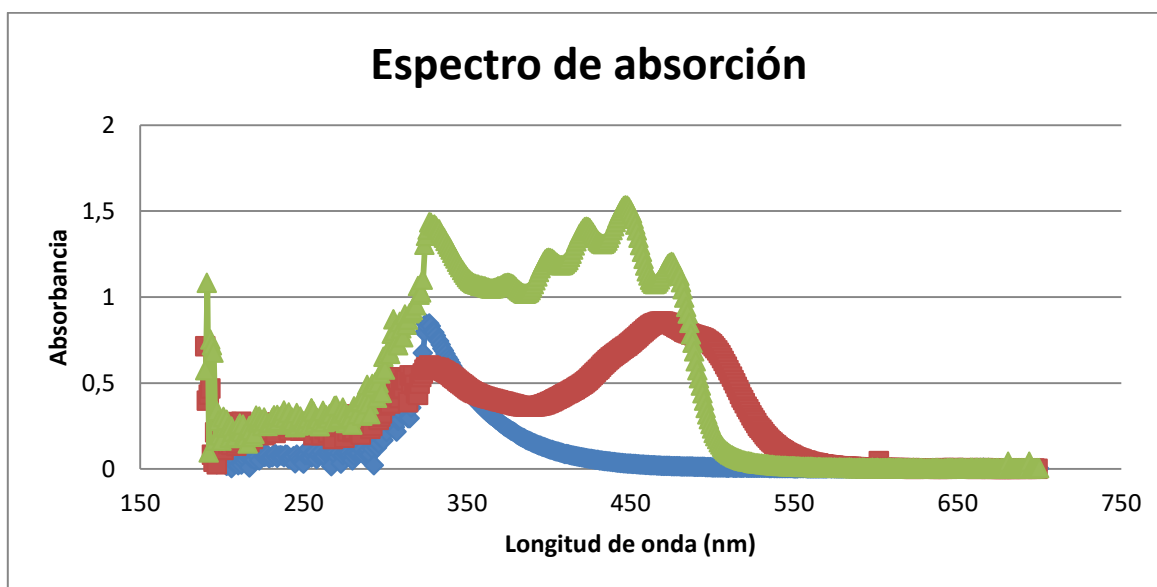
**Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la capsantina.**

Propiedad	Experimental*	Teórico
<i>Punto de fusión</i>	127-131 °C	175-176 °C
<i>Solubilidad</i>	Hexano, Cloroformo, Acetona, Acetato de etilo y Metanol	Metanol
<i>Longitud máxima de absorción</i>	444, 420 y 472 nm (en acetona)	486 y 520 nm (en benceno)
<i>Carotenoide</i>	Color azul oscuro	Color azul oscuro

\*Los datos mostrados corresponden a la capsantina obtenida de *R.communis* L., y del pimentón.



Las propiedades determinadas no correspondieron a las teóricas debido a la diferencia en las técnicas empleadas y también a la influencia de la presencia de otros compuestos minoritarios. Por ejemplo, el punto de fusión se puede ver abatido por estos compuestos, mientras que las longitudes máximas de absorción pueden variar debido al disolvente que se emplea, en benceno (teóricas), son 486 y 520 nm, mientras que las observadas en acetona (experimentales), fueron 444, 327, 420, 397 y 472 nm (Figura 10)



**Figura 10. Espectro de absorción de la capsantina obtenida de *R. communis* L. (verde y azul) y del pimentón (rojo)**

Con los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), se logró definir la estructura del compuesto obtenido de *R. communis* L y del pimentón. Las señales observadas en los espectros de  $^1\text{H}$  de RMN (Anexo 1), fueron  $\delta_{\text{H}}$  0.840[s, 3H,  $\text{CH}_3$  (16')], 1.075[s, 6H, Me(16), Me(17)], 1.207[s, 3H, Me(17')], 1.367[s, 3H, Me(18')], 1.736[s, 3H, Me(18)], 1.957[s, 3H, Me(19')], 1.974[s, 6H, Me(19), Me(20)], 1.989[s, 3H, Me(20')], 2.39[ddd,  $J=17.6$ , ca 1.5, 1H,  $\text{H}\alpha\text{-C}(4)$ ], 2.96[dd,  $J=15.5$ , 9, 1H,  $\text{H}\alpha\text{-C}(4')$ ], ca. 4.00[br, m, 1H,  $\text{H}\alpha\text{-C}(3)$ ], 4.52[m, 1H,  $\text{H}\alpha\text{-C}(3')$ ], 6.13[s, 2H,  $\text{H-C}(7)$ ,  $\text{H-C}(8)$ ], 6.16[d,  $J=11.6$ , 1H,  $\text{H-C}(10)$ ], 6.26[d;  $J=11$ ; 1H,  $\text{H-C}(14)$ ]; 6.35[d,  $J=11$ , ca. 1H,  $\text{H-C}(14')$ ], 6.36[d,  $J=15$ , 1H,  $\text{H-C}(12)$ ], 6.45[d,  $J=15$ , 1H,  $\text{H-C}(7')$ ]; 6.52[d,  $J=15$ , 1H,  $\text{H-C}(12')$ ], 6.55[d,  $J=11$ , 1H,  $\text{H-C}(10')$ ], ca 6.6-6.8[m, 4H,  $\text{H-C}(11)$ ,  $\text{H-C}(11')$ ,  $\text{H-C}(15)$ ;  $\text{H-C}(15')$ ], 7.33[d,  $J=15$ , 1H,  $\text{H-C}(8')$ ] Las señales observadas en los espectros de  $^{13}\text{C}$  de RMN (Anexo 2) fueron  $\delta_{\text{C}}$  12.75[C(19)], 12.79[C(20)], 12.84[C(19')], 12.90[C(20')], 21.39[C(18')], 21.63[C(18)], 25.16[C(17')], 25.95[C(16')], 28.80[C(16)], 30.32[C(17)], 42.69[C(4)], 44.01[C(1')], 45.49[C(4')], 48.61[C(2)], 51.06[C(2')], 59.01[C(5')], 65.41[C(3)], 70.44[C(3')], 121.04[C(7')], 124.13[C(11')], 125.58[C(11)], 125.93[C(7)], 126.30[C(5)], 129.74[C(15)'];

131.27[C(10)], 131.68[C(15')], 132.39[C(14)], 133.69[C(9')], 135.24[C(14')], 135.93[C(13')], 137.46[C(12)], 137.60[C(13)], 137.85[C(6)], 138.51[C(8)], 140.63[C(10')], 141.97[C(12')], 146.86[C(8')], 202.82[C(6')] Estas señales observadas corresponden a las reportadas en la literatura.

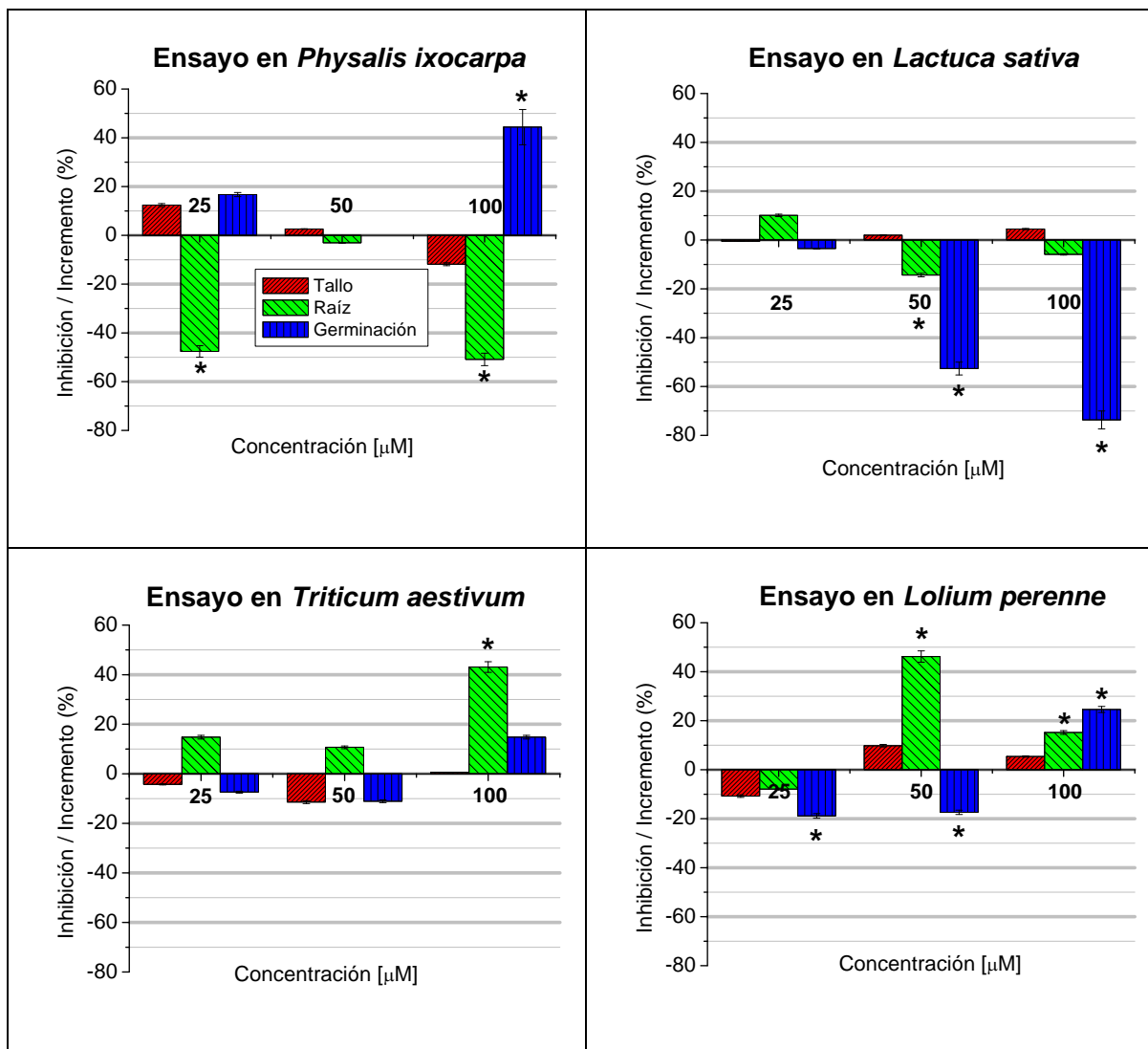
Para corroborar esto, se realizó un análisis de HPLC-MS-CG con el cual, sólo se determinó la pureza; se observó un pico que correspondió a una masa mayor (663 g/mol), de la correspondiente a la capsantina (584 g/mol), esta diferencia fue atribuida a que de acuerdo con el estudio de Deli József (2001), la capsantina se puede encontrar de diferentes formas: como capsantina sola, capsantina monoesterificada y capsantina diesterificada (Anexo 1, Tabla A1.1)

## **IV.2 Caracterización fisiológica y bioquímica de la capsantina**

### **IV.2.1 Evaluación en germinación y elongación de tallo y raíz**

Se observó que el blanco (ensayos de germinación y elongación de tallo y raíz con agua destilada y esterilizada), y el control negativo (ensayos con DMSO al 2 % v/v), tuvieron los mismos resultados, por lo tanto se comprobó que el DMSO no presenta efecto inhibitorio ni estimulador en estos ensayos.

La capsantina obtenida se evaluó en la germinación en plantas mono- y di- cotiledóneas a diferentes concentraciones (Figura 11), y se observó que presenta un efecto diferente. Así, en *L. sativa*, la capsantina inhibió la germinación 75 % con 100  $\mu$ M y 14 % la elongación de la raíz con 50  $\mu$ M, mientras que la elongación de tallo no se afectó. En *P. ixocarpa*, otra dicotiledónea, se observó que la elongación de raíz se inhibió un 48 y 51 % con 25 y 100  $\mu$ M, respectivamente; por otro lado, se observó un efecto contrario en la germinación ya que con 100  $\mu$ M se incrementó 44 %, mientras que la elongación de tallo no fue afectada.



**Figura 11. Ensayo de germinación de capsantina.** Se muestran resultados evaluados en plantas dicotiledóneas (*Physalis ixocarpa* [tomate] y *Lactuca sativa* var. Paris Island Cos [lechuga]) y en plantas monocotiledóneas (*Triticum aestivum* [trigo] y *Lolium perenne* [pasto]). Elongación de tallo (■), Elongación de raíz (■) y Germinación (■); \* indica valores estadísticamente significativos respecto al control, ANOVA de dos vías ( $p < 0.05$ ),  $n=120$  (ver Anexo 2 para promedios y desviación estándar y ANEXO3 para ANOVA)

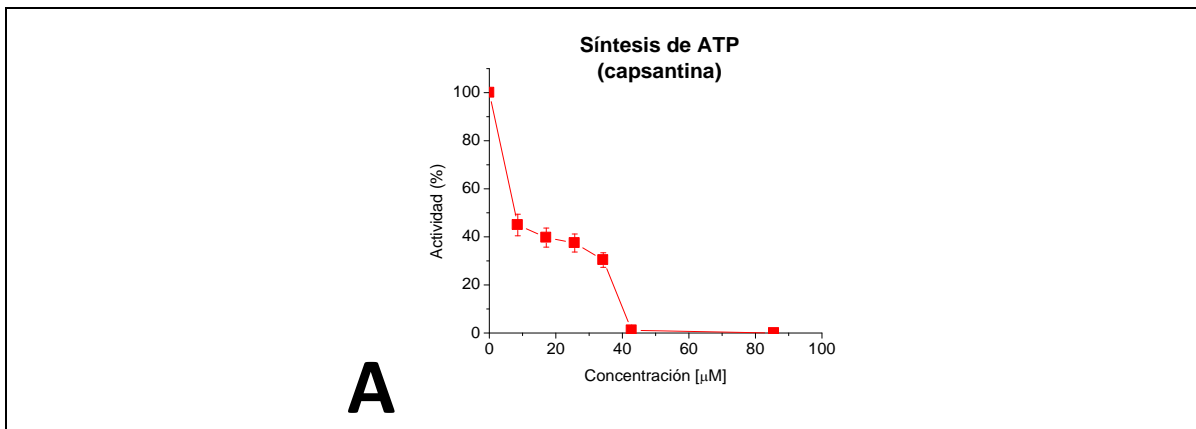
En *T. aestivum*, no se observó inhibición de la elongación de tallo ni de la germinación, sin embargo, se observó un incremento 43 % en la elongación de raíz con 100 µM.

En otra monocotiledónea, *L. perenne*, se observó que la capsantina inhibió la germinación 19 y 17 % con 25 y 50 µM, respectivamente, mientras que se incrementó 25 % con 100 µM; también se observó que incrementó la elongación de la raíz 46 y 15 % con 50 y 100 µM, respectivamente. Cabe mencionar que la elongación de tallo no fue afectada.

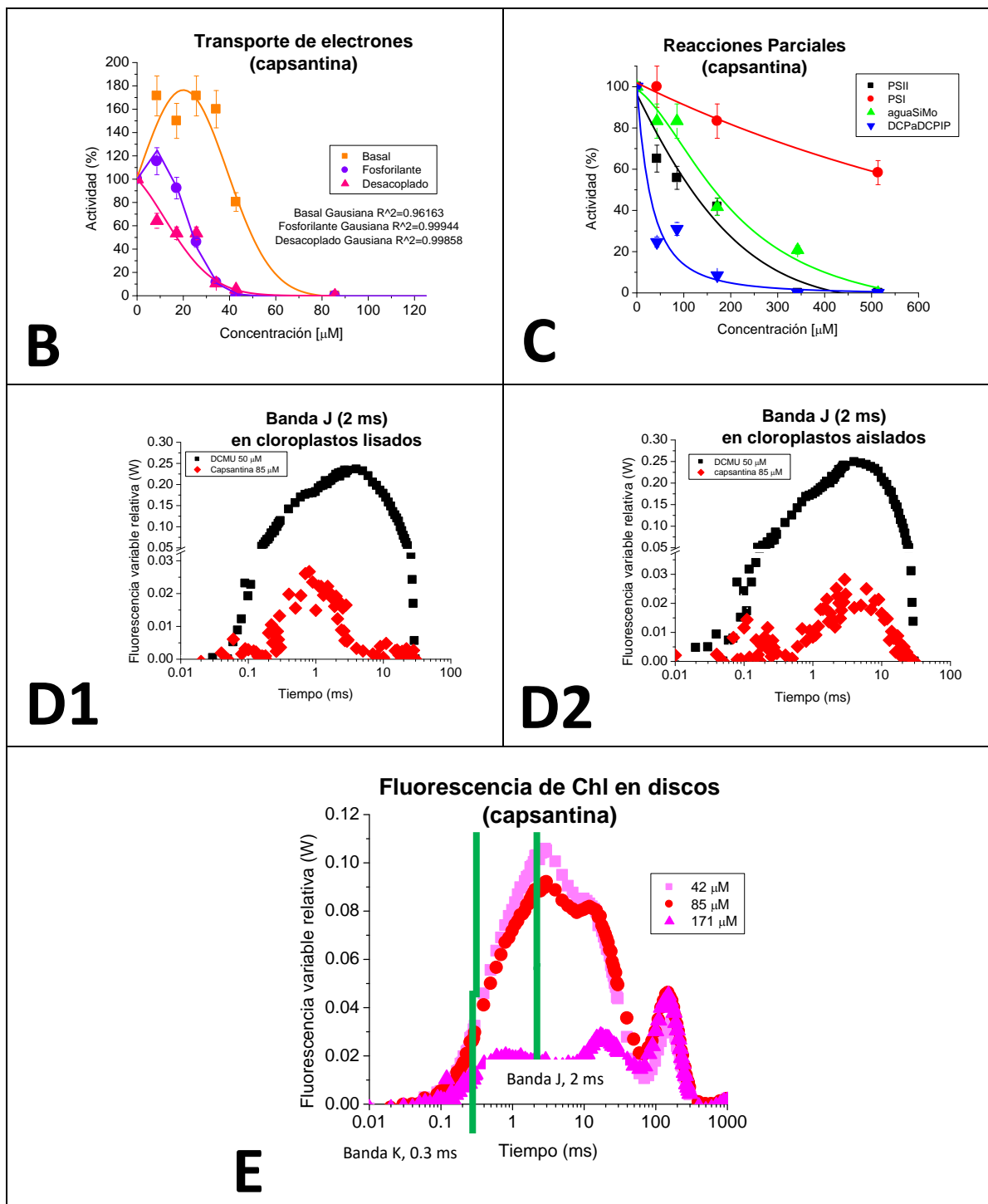
Estos resultados muestran que la capsantina es un compuesto que inhibe específicamente el desarrollo de plántulas dicotiledóneas, mientras que no afecta a las monocotiledóneas. Este ensayo preliminar es un antecedente para la continuación del estudio de la capsantina como herbicida pre-emergente.

#### IV.2.2 Evaluación *in vitro* de la inhibición del transporte de electrones fotosintético no cíclico

Se evaluó el efecto de la capsantina en el transporte de electrones no cíclico en cloroplastos (Figura 12 A, B y C). Como primera observación se tomó en cuenta el ensayo de síntesis de ATP, el cual es un ensayo muy sensible; en esta evaluación el compuesto inhibió 100 % la síntesis de ATP con 42  $\mu\text{M}$  (Figura 12 A). Los cloroplastos acoplados son incapaces de sintetizar ATP cuando se inhibe la enzima  $\text{H}^+$  ATPasa, esta enzima al no sintetizar ATP inhibe indirectamente el transporte de electrones, entonces si se inhibe la síntesis de ATP, habrá inhibición en el transporte de electrones. Por lo anterior, a continuación se observó el comportamiento del compuesto en tres condiciones del transporte de electrones: basal, fosforilante y desacoplado. De acuerdo con los estudios realizados por Izawa *et al.*, 1972 y 1974, al observar el comportamiento en estas condiciones se puede proponer si un compuesto actúa como desacoplante, como inhibidor de la reacción de Hill o como inhibidor de la transferencia de energía (Figura 13). Al comparar los modelos propuestos por Izawa *et al.*, (Figura 13), con los resultados obtenidos (Figura 12 B), se observó que el compuesto actúa como un inhibidor de la reacción de Hill.



**Figura 12. Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones del compuesto capsantina sobre cloroplastos aislados (A, B, C, D1 y D2) y sobre discos de hojas de *S. oleraceae* (E). Se muestra el efecto sobre la síntesis de ATP (A).**



**Figura 12. Efecto *in vitro* de diferentes concentraciones del compuesto capsantina sobre cloroplastos aislados (A, B, C, D1 y D2) y sobre discos de hojas de *S. oleraceae* (E) (continuación).** Se muestra el efecto sobre la síntesis de ATP (A), el transporte de electrones no cíclico: basal, fosforilante y desacoplado (B), el transporte de electrones no cíclico: fotosistema II, I y de  $\text{H}_2\text{O}$  a SiMo y de DPC a DCPIP (C), la fluorescencia de la clorofila a en cloroplastos (D1 lisados y D2 intactos) y fluorescencia de la clorofila a en discos de hojas (E).

Una vez que se determinó que la capsantina es un inhibidor de la reacción de Hill, se decidió encontrar el sitio de acción del compuesto, utilizando reacciones parciales del transporte de electrones no cíclico de H<sub>2</sub>O (donador inicial de electrones), a MV (un aceptor final artificial de electrones). Se observó que el compuesto inhibe tanto el FSII como el FSI (Figura 12 C), sin embargo el FSI fue menos sensible que el FSII, por lo cual se decidió continuar con la caracterización del sitio de acción sobre el FSII.

Por medio de otras reacciones parciales se determinó que la capsantina tiene más de un sitio de acción en el FSII, inhibe tanto al complejo emisor de oxígeno (OEC), como la transferencia de electrones desde la clorofila P680 hasta la quinona B (Q<sub>B</sub>). Se debe hacer notar que además de éstos sitios de acción en el FSII existen uno o varios sitios de acción en el FSI no caracterizados en este trabajo.

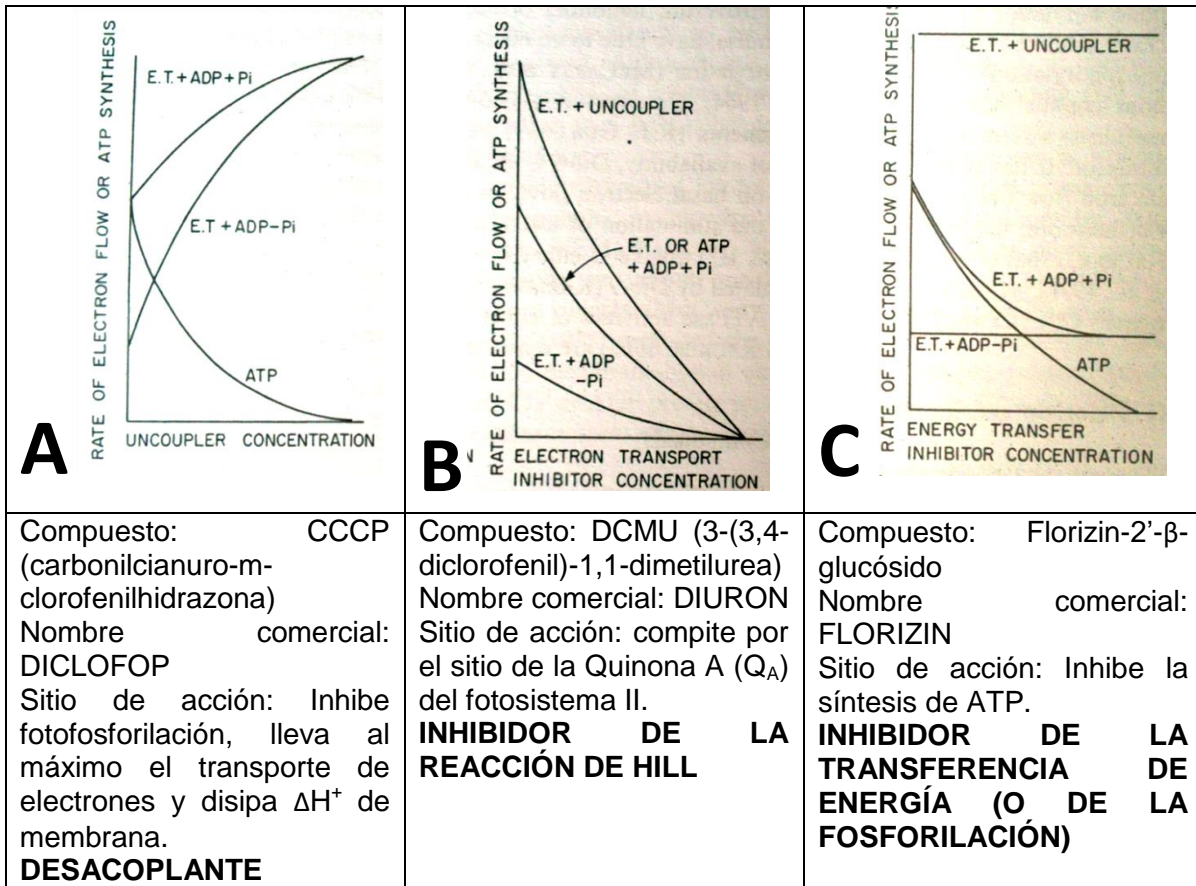
A través de una técnica rápida y no invasiva, la fluorescencia de la clorofila *a*, se determinó si estos sitios de acción se encontraban expuestos para el compuesto en cloroplastos lisados, en cloroplastos aislados y en hojas de espinacas. Se observó que en los cloroplastos (en ambas condiciones lisados y aislados), el compuesto llega al sitio de acción, ya que se observó una banda J, que indica daño del lado aceptor de electrones del FSII a partir de la concentración de 85 µM (Figura 12 D1 y D2)

En las hojas de espinacas se observó un comportamiento dependiente de la concentración (Figura 12 D1, D2 y E), es decir, con 42 y 85 µM se observó daño en el lado aceptor del FSII (banda J), mientras que a partir de 171 µM se observó daño en el lado donador del FSII (banda K)

Además de determinar si los sitios de acción estaban disponibles para el compuesto, los resultados obtenidos con la fluorescencia de la clorofila *a*, corroboraron los resultados observados con las reacciones parciales. También se identificó que el comportamiento en cloroplastos y hojas de espinacas coincidió con concentraciones de 42 y 85 µM.

El efecto observado en las hojas de espinacas indica que el compuesto tiene un comportamiento ya reportado anteriormente para otros compuestos (Duke *et al.*, 2006), existe un sitio de acción dependiente de la concentración, lo cual se ha reportado como hormesis aunque este efecto se ha estudiado respecto a observar un efecto totalmente diferente dependiente de concentración.

Todos los efectos observados se compararon contra un herbicida comercial (DCMU), y se observó que este último tiene la mayor inhibición, sin embargo, se sabe que un herbicida comercial siempre se encuentra en formulación (con adyuvantes, emulsificantes, tenso activos, estabilizadores, antioxidantes, entre otras sustancias), lo cual puede mejorar los efectos inhibitorios de los compuestos.



**Figura 13. Comportamiento de algunos compuestos evaluados por Izawa *et al.*, 1972 y 1974.** Se muestra el efecto sobre el transporte de electrones no cíclico de un desacoplante (A), un inhibidor de la reacción de Hill (B) y de un inhibidor de la transferencia de energía (C), donde ET+ADP-Pi es el transporte de electrones en condición basal, ET+ADP+Pi es en condición fosforilante, ET+UNCOUPLER es en condición desacoplante y ATP es la síntesis de ATP.

# CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

---

La capsantina es un carotenoide abundante en frutos rojos maduros del chile (*Capsicum annuum*) y se encuentra en las plantas como un pigmento accesorio para la captación de luz en la fotosíntesis (Harkay-Vinkler, 1974; Ya-Qin *et al.*, 2004). En la industria alimentaria es utilizado como colorante y saborizante de alimentos. (Kanner *et al.*, 1977; Bosland *et al.*, 1996). Este compuesto ha sido ampliamente estudiado debido a su interesante actividad antioxidante (Perez *et al.*, 2002; Materska *et al.*, 2005) Sin embargo no se ha reportado alguna evaluación para determinar su actividad herbicida.

Para determinar la actividad herbicida de algún compuesto se necesita tener en cuenta principalmente la fase de crecimiento de la plántula o planta a la cual se quiere afectar. Varios estudios se enfocan en el desarrollo y crecimiento de las semillas ya fecundadas (Oleszek *et al.*, 1987; Fujii *et al.*, 2001), mientras que otros evalúan el crecimiento y desarrollo de plantas con cloroplastos (o plantas emergidas de acuerdo con la definición de Kogan *et al.*, 2003); estos últimos ensayos se realizan en cloroplastos aislados o lisados o en hojas de plantas (Chávez *et al.*, 2001) En este trabajo se evaluaron estas dos fases de crecimiento: la fase de crecimiento de semilla sin cloroplastos y la fase de planta usando cloroplastos; en esta última fase se realizaron pruebas para corroborar resultados *in vitro*.

## V.1 CAPSANTINA: OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN

En general, se sabe que la mayoría de los compuestos aislados de plantas se obtienen con rendimientos menores al 1 %, esto indica un gran problema al encontrar un compuesto activo ya que para poder comercialarlo, la demanda supera la cantidad sintetizada por la planta (Duke *et al.*, 1995; Meixueiro, 2008; León, 2009; Morales, 2014) Actualmente para resolver este problema se han desarrollado diferentes estrategias, como la biología sintética, el modelado químico, la búsqueda de otras plantas que sintetizen mayor cantidad, entre otras (Rice *et al.*, 1984)

De acuerdo con el herbicida ideal propuesto por Evans en 1999 (la dosis efectiva debe ser de 500 mg/ha, con control excepcional y seguridad para el cultivo, eco-toxicológicamente favorable, barato en su producción y con amplio rango de formulaciones para cualquier condición). Los metabolitos secundarios aislados de plantas pueden cubrir la mayoría de estos requisitos, ya que presentan varias cualidades de interés para la industria (contienen varios carbonos quirales, algunos son no tóxicos para el ser humano, no son recalcitrantes, y se han reportado con diferentes sitios de acción)

En este trabajo se encontró un compuesto activo, sin embargo el rendimiento de obtención fue muy bajo. La primera fuente de la cual se identificó el compuesto y con el cual se obtuvieron los primeros resultados fue la planta *R. communis* L., de esta planta se realizaron otras colectas en las cuales ya no se logró identificar al compuesto de interés (Ortega, 2014, no publicado), por ello se decidió obtenerlo de otra planta. Después de una



búsqueda bibliográfica se decidió utilizar el pimentón (*Capsicum annuum* L.) como fuente alternativa de aislamiento del producto, ya que de acuerdo con varios autores (Maoka *et al.*, 2002; Schweiggert *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2014), es la fuente más abundante de este compuesto. El compuesto mayoritario de la oleoresina obtenida del pimentón es la capsantina, seguida de la capsorubina, y se encontró que este compuesto se vende como extracto enriquecido (EEC), o como extracto crudo (Quiminet, 2015/08)

Se encontró una patente la cual se siguió para obtener al compuesto, (EEC), que fue caracterizado químicamente para determinar si se trataba del mismo compuesto ya obtenido de *R. communis* L. Las primeras pruebas no coincidieron con las reportadas en la literatura debido a diferencias en metodología, pero con los últimos análisis químicos (RMN) se determinó que el compuesto aislado de *R. communis* L., y el EEC de *Capsicum annuum* L. corresponden al mismo compuesto con la diferencia de que el EEC contiene compuestos traza que se podrían evaluar en otro estudio para descartar en efecto sinérgico o de potenciamiento. Las señales observadas en los análisis de RMN correspondieron principalmente a las dobles ligaduras características del compuesto, así como a los grupos hidroxilo, al grupo cetona y a los ciclos hexeno y pentano (Anexo 1)

## V.2 CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA CAPSANTINA

### V.2.1 Germinación

En la mayoría de los estudios fitotóxicos (o actividad herbicida), se evalúan los compuestos sobre malezas o plantas modelo en etapa pre-emergente, es decir, se estudia la inhibición de la germinación. En este estudio también se realizó esta evaluación fitotóxica debido a que este compuesto no ha sido estudiado previamente para esta actividad. Los modelos evaluados (*P. ixocarpa*, *L. sativa*, *T. aestivum* y *L. perenne*) no son considerados malezas, excepto *L. perenne*, pero sirven como parte de un estudio de discernimiento, además que varios grupos en el mundo los han utilizado para estos mismos estudios (Holm *et al.*, 1979; Macías *et al.*, 1995; Handiseni *et al.*, 2011)

Se observó que el compuesto inhibe la germinación y la elongación de raíz en modelos dicotiledóneas (75 % en *L. sativa* y 48 % en *P. ixocarpa*, respectivamente), mientras que en los modelos monocotiledóneas se observó un incremento en la elongación de raíz (43 % en *P. ixocarpa* y 46 % en *L. perenne*), lo cual sugiere que se trata de un compuesto con actividad fitotóxica específica para dicotiledóneas. El mayor efecto observado fue en *L. sativa*, un modelo utilizado en la evaluación de herbicidas emergentes; sin embargo es necesario evaluar el compuesto en especies de malezas y determinar si el efecto solo es sobre plantas dicotiledóneas.

En *P. ixocarpa* y en *L. perenne*, se observó un efecto ya reportado por primera vez por Southam *et al.*, en 1943 (cuando observaron el crecimiento de un hongo con cierto compuesto); en estos modelos se observaron inhibiciones con bajas concentraciones y potenciamiento con altas concentraciones, este efecto se le llama hormesis. La hormesis se refiere a una alteración en la tendencia de las curvas dosis-respuesta, donde con concentraciones bajas se tiene un efecto contrario al observado con altas. Se cree que es

resultado de la compensación de los sistemas de los organismos vivos. Este efecto no ha sido esclarecido del todo pero para su explicación se han propuesto dos modelos que actúan de manera coordinada.

MODELO 1 o de RETROALIMENTACIÓN, en este modelo se propone que el compuesto induce a enzimas del citocromo P<sub>450</sub> para que se transforme en un metabolito reactivo, el cual reduce su toxicidad por medio de otras enzimas (como glutatión-S-transferasa, cisteína-glutamato-ligasa y glicosiltransferasa)

MODELO 2 o de CONTROL DIRECTO, en éste se propone que las enzimas que reducen la toxicidad (del modelo 1), pueden ser inducidas también por el compuesto, por cual el balance entre concentraciones del compuesto ya reactivo y el compuesto inicial esta desequilibrado.

Con estos modelos sabemos que si el compuesto a cierta concentración tiene comportamiento similar con el modelo 1, pero a diferente concentración puede tener un comportamiento similar con el modelo 1 y con el modelo 2, lo cual se observa como una inversión del efecto observado, y se explica por la sobrecompensación (Calabrese *et al.*, 2005; Duke *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009)

Con estos resultados se tiene un antecedente para la continuación del estudio del compuesto capsantina como herbicida pre-emergente.

### **V.2.2 Ensayos *in vitro*, sitio de acción**

Dentro de los métodos de control de malezas, el uso de herbicidas o matadores de malezas se ha convertido en la práctica agrícola más confiable y menos costosa para el control de las malezas. También es conocido que varios compuestos pueden interferir con el transporte de electrones fotosintético, y este factor ha sido explotado por las compañías agroquímicas para el desarrollo de los herbicidas. Más del 30 % de los herbicidas que se han desarrollado inhiben el FSII teniendo diferentes sitios de acción pero con diferente eficacia, lo cual ha generado que los herbicidas más activos sean los únicos utilizados y esto ha desarrollado, desde los 60's, biotipos de malezas resistentes, por ello encontrar nuevos compuestos herbicidas se ha convertido en un reto (Najafpour *et al.*, 2012)

Se observó que la capsantina es un inhibidor del transporte de electrones no cíclico, teniendo diferentes sitios de acción, los cuales se encuentran tanto en el FSII como en el FSI y que los sitios de acción caracterizados en el FSII son en el OEC (complejo emisor de oxígeno), en el transporte de electrones desde la clorofila P<sub>680</sub> hasta la quinona B (Q<sub>B</sub>). Se observó también que el compuesto tiene diferentes sitios de acción independientes de la concentración, en el FSI, y dependientes de la concentración, en el FSII.

Comparando los resultados obtenidos con los obtenidos utilizando un herbicida comercial (el DCMU, que cuenta con su sitio de acción en la Quinona A o Q<sub>A</sub>), se observó que el herbicida comercial posee el mayor efecto inhibitorio, sin embargo cabe mencionar que la mayoría de los herbicidas aislados de plantas tienen menor actividad de los herbicidas comerciales debido a que los comerciales se encuentran en formulación. Sin embargo el

observar un efecto de un herbicida natural ya es un logro, porque este efecto siempre se puede mejorar con la formulación.

De acuerdo con la literatura, se han reportado compuestos con más de uno sitio de acción pero son muy pocos (Macías *et al.*, 2008), por lo cual al observar que el compuesto evaluado posee mínimo tres sitios de acción es relevante para futuras investigaciones, por ejemplo en el diseño de nuevos herbicidas.

Por la estructura del compuesto capsantina, no se sugeriría a este compuesto como candidato para tener un efecto herbicida, debido a que estos pigmentos accesorios se encuentran en las plantas como auxiliares en la captación de la luz, así como para compensar la formación de los radicales libres y como protección contra la fotoinhibición (Raval *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2009). Pero, al presentar dos grupos hidroxilo libre, éstos podrían ser ionizados y entonces actuar como agentes caotrópicos o quelantes de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Cl^-$ , que afectarían al OEC (Golbeck *et al.*, 1980; Peters *et al.*, 2003), y así se podría explicar uno de los sitios de acción en el FSII.

La fluorescencia de la clorofila *a* estudiada para este compuesto nos indica diferentes daños. De acuerdo con los estudios de Strasser *et al.*, 1995, las curvas de fluorescencia polifásica OJIP pueden ser analizadas y mediante integraciones respecto a un control se pueden determinar los daños (o bandas) específicos para el FSII. Al evaluar un control positivo (DCMU), se observó que éste presentó un aumento rápido del desarrollo de la fluorescencia durante los dos primeros milisegundos (2 ms) de la iluminación, transformando la secuencia regular OJIP en una curva OJ, y por medio de la integración se puede observar una banda J (en este mismo tiempo), que sugiere la inhibición en la reoxidación de  $Q_A$ . Un efecto diferente se observa con un control positivo como el Tris (inhibidor del lado donador del FSII), donde se observa un ascenso rápido a los 0.3 ms y le sigue una disminución en el nivel de desarrollo de fluorescencia cercano a  $F_0$  (o fluorescencia inicial), esta curva se transforma en la curva OK donde se observa una banda K (0.3 ms), indicando que se inhibe el OEC. Al observar el comportamiento de la fluorescencia de la clorofila *a* en cloroplastos aislados intactos y aislados lisados, con el compuesto capsantina se observó una banda J lo cual nos indica que el comportamiento es similar al DCMU y que el sitio de acción del compuesto se encuentra del lado aceptor de electrones del FSII y podría ser la reoxidación de  $Q_A$ .

También se analizó la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas de espinacas con las concentraciones evaluadas en cloroplastos y con mayores concentraciones, debido a que se ha observado (en ensayos anteriores en este laboratorio) que al evaluar el compuesto, ya en hojas, se requiere mayor cantidad para llegar al sitio de acción. En hojas se observó lo mismo que en los cloroplastos con concentraciones de 42  $\mu M$  (una banda J), mientras que con concentraciones a partir de 85  $\mu M$  se observó una banda K, lo cual indica que el sitio de acción es dependiente de la concentración en hojas. Este comportamiento no es nuevo, ya que la mayoría de los compuestos tienen un efecto *in vitro* (con cloroplastos), y al evaluarlos *in vivo* (en hojas), el efecto desaparece, disminuye o cambia, esto se puede deber a que el medio es diferente *in vivo*. En las pruebas *in vivo* hay más barreras que en

las pruebas *in vitro*: las hojas cuentan con una capa protectora de lípidos (cutícula), las células tienen otras membranas, existen otros organelos en donde puede llegar el compuesto y además existen diferentes compuestos que pueden metabolizar el compuesto, como las enzimas.

Todo lo anterior sugiere que el compuesto, tanto en cloroplastos como en hojas, presenta más de un sitio de acción, dependiendo de la concentración utilizada.

### **V.3 CONSIDERACIONES PARA ESTUDIOS POSTERIORES**

Se mencionó anteriormente que la capsantina puede estar no esterificada y esterificada, por lo que se podría evaluar el efecto de la esterificación para observar si el efecto herbicida aumenta o no. Como antecedente ya se ha reportado que los ácidos grasos insaturados presentan actividad herbicida (Morales, 2010), por lo que la evaluación del compuesto esterificado con este tipo de ácidos grasos podría ser comparada contra el efecto del compuesto no esterificado y contra el efecto de la mezcla del compuesto no esterificado y esterificado.

De acuerdo con los estudios de Izawa *et al.*, 1972 y 1974, se han determinado sólo tres posibles comportamientos de los compuestos con efecto herbicida en cloroplastos, pero debido a que recientemente se cuenta con mayor tecnología y que algunos compuestos reportados cuentan con actividad herbicida pero no se ha identificado su sitio de acción, se sugiere que para completar este estudio de la actividad herbicida de la capsantina, además de evaluarlo en ensayos de germinación sobre malezas, se deberían evaluar otros efectos sobre malezas en fase de planta que ya hayan presentado resistencia y así poder determinar si el compuesto es adecuado para sustituir a algún otro herbicida.

# CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

## VI.1 Conclusiones

- ✓ La capsantina, compuesto aislado del pimentón (*Capsicum annuum*), y por primera vez de la planta *Ricinus communis* L., presentó actividad herbicida pre- y post-emergente con varios sitios de acción dependiendo de la concentración; se observó que la capsantina inhibió el paso de electrones en el fotosistema II (de H<sub>2</sub>O a SiMo a bajas concentraciones y de DPC a DCPIP a altas concentraciones), y en el fotosistema I.

## VI.2 Perspectivas

- Es necesario purificar al 99.9 % la capsantina, identificar otros compuestos que se encuentran en muy baja concentración del Extracto Enriquecido en Capsantina y determinar su actividad herbicida para descartar que el efecto observado sea de algún otro compuesto.
- Se debe investigar su efecto en ensayos *in vivo* para determinar si existe inhibición del crecimiento (biomasa seca) o algún efecto en la fluorescencia de la clorofila *a* en plantas asperjadas.

# CAPÍTULO VII. REFERENCIAS

---

Anaya AL, Cruz-Ortega R., 2001. La alelopatía: algunos estudios de casos y posibles aplicaciones. En Anaya AL, Espinosa-García FJ, Cruz-Ortega R (eds). Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza y Valdez Editores. Pp. 33-67

Acharya C y Khan NA., 2013. A triterpenoid saponin from the seeds of *Ricinus communis* and its antimicrobial activity. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. 49. No. 1. Pp.54-57

Ahmad P., Ashraf M., Younis M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N. A., Al-Qurainy, F., 2012 Role of transgenic plants in agriculture and biopharming *Biotechnology Advances* 30: 524-540

Aguilar A., Romero G., Chávez A., King B., Lotina B., 2008 Biflavonoids isolated from *Shilaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6994-7000

Allen J., Holmes N., 1974 Electron transport partial reactions. *Photosynthesis Energy transduction. A practical approach* (Hipkins M., Baker N., eds.) IRL Press: Oxford, U. K. 119-128

Arnon D., *et al.*, 1949 Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* *Plant Physiology* 24: 1-15

Black M. y Bewley JD., 1994. Seeds: Germination, Structure and Composition. En: SEEDS. Physiology of development and germination. Plenum Press, New York. Pp. 1-30

Bolhár-Nordenkamp HR y Öquist G., 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall DO, Scurlock JMO Bolhár-Nordenkamp HR, Leegood RC y Long SP (eds). Photosynthesis and production in a Changing Environment. A Field and laboratory Manual. Chapman and Hall, London United Kingdom. Pp 193-205

Bosland PW., *et al.*, 1996 Capsicums: Innovative uses of an ancient crop Pp 479-487 En: Progress in new crops. J. Janick (ed.) ASHS Press, Arlington, VA

Calabrese EJ., Blain R., 2005 The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview *Toxicology Applied Pharmacology* 202 289-301

Calera MR., Soto F., Sánchez P., Bye R., Hernández B., Anaya AL., Lotina, B., Mata R., 1995 Biochemical active sesquiterpene lactones from *Ratibida latipalearis*. *Phytochemistry* 40, 419-425

Campbell MK y Farrell SO (2004). Bioquímica. Ed. Internacional Thompson Australia. Pp. 615-627

Chaudhry O., *et al.*, 2008. Herbicide-Resistance and Weed-Resistance Management Chapter on Current Review of the Herbicide-Resistance

Chávez D., Mata R., Iglesias, R., Lotina B., 2001 Annonaceous acetogenins: naturally occurring inhibitors of ATP synthesis and photosystem II in spinach chloroplasts *Plant Physiology* 111: 262-268

CONABIO, 2009. Euphorbiaceae *Ricinus communis* L. En línea. Internet. Agosto 2014. Disponible en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)

Czamota MA., Paul RN., Dayan FE., Nimbal CI. y Weston LA., 2001. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII inhibitor in *Sorghum spp.* root exudates. *Weed Technology*. 15:813-825

Deli József M., Péter MZ., Tóth G., 2001. Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during Ripening: Biosynthesis of carotenoids in Red Paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1517-1523

De Prado R., Jorrín J., García-Torres L., 1997. Weed and Crop Resistance to Herbicides. *Kluwer Academic Publishers*. Dordrecht

De Prado R., Jorrin L., *et al.*, 2001. Uso de Herbicidas en la Agricultura del Siglo XXI. Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba. Córdoba

De Prado R., Ruiz E., 2005. Resistencia a Herbicidas en malezas: detección en campo, invernadero y laboratorio. Memorias del XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)

Dilley R., *et al.*, 1972 Ion transport ( $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  exchange phenomena) *Methods of Enzymology* 24, 68-74

Duke SO., Abbas HK., 1995 Natural products with potencial use as herbicides *Allelopathy: Organisms, Processes and Applications* ACS Symposium Series 582 348-362

Duke SO., Dayan F., Romagni J., Rimando A., 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Resistance*. 40: 99-111

Duke SO., Cedergreen N., Velini ED., Belz RG., 2006 Hormesis: Is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Hormesis and Phytotoxins* 29-33

EFSA, 2006 Part II. Capsanthin, Cintranaxanthin and Cryptoxanthin No. 386 Pp 1-40 En: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request from the Commission on the safety of use of colouring agents in animal nutrition Question No. EFSA-2003-060

Evans DA., *et al.*, 1999 How can technology feed the world safely and sustainably? *Pesticide Chemistry and Bioscience: The Food Environment Challenge* 124

- Fischer NH, Weidenhamer JD, Riopel JL, Quijanos L, Menelau MA, 1990. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure activity study. *Phytochemistry* 29: 2479-2483
- Flores KJ., 2016 Evaluación del posible efecto herbicida de los ácidos grasos (tridecanóico y heptadecanóico) y la capsaicina, identificados en *Capsicum annuum* L. Tesis LICENCIATURA. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias
- Fujii Y., *et al.*, 2001 Screening and future exploitation of allelopathic plants as alternative herbicides with special reference to Hairy Vetch *Journal of Crop Production* 4:2, 257-275
- Ghersa CM., Roush ML., Radosevich SR., Cordray SM., 1994 Coevolution of agroecosystems and weed management. *BioScience*. 44: 85-94
- Golbeck JH, Martin IF, Fowler CF., 1980 Mechanism of linoleic acid-induced inhibition of photosynthetic electron transport. *Plant Physiology* 65: 705-713
- Gómez MR., Ochoa N., 2013 Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* spp.) *International Journal of Molecular Sciences* 14:19025-19053
- González VR, 2007 Obtención y caracterización química y bioquímica de metabolitos secundarios con actividad herbicida de las hojas de *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. Tesis LICENCIATURA Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química
- 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. *REB* 27: 119-129
- Handiseni M., Brown J., Zemetra R., Mazzola M., 2011 Herbicidal activity of Brassicaceae seed meal on wild oat (*Avena fatua*), Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*), redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*), and prickly lettuce (*Lactuca serriola*) *Weed Technology* 25: 127-134
- Harkay-Vinkler M., 1974 Storage experiments with raw material of seasoning paprika with particular reference to the red color pigment components *Acta Alimentaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 3: 239-249
- Heap I., *et al.*, 2014. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. En línea. Internet. Sábado 29 de Marzo. Disponible en [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)
- Hipkins M., *et al.*, 1986 Photosynthesis transduction a practical approach *IRL. Press Oxford Washington*
- Holm LG., Pancho JV., Herberger JP., Plucknett DL., 1979 A Geographical Atlas of World Weeds New York: John Wiley & Sons



Ikan R., *et al.*, 1991 Natural products: a laboratory guide 2nd ed. Academic Press, Inc., EEUU.

INEGI, 2010. En línea. Internet. Marzo 2014. Disponible en [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)

Izawa S., y Good NE., 1972 Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation *Methods in Enzymology* B24 355-377

Izawa S., *et al.*, 1974 Photosynthesis I Chapter Inhibitors of Electron Transport En: *Encyclopedia of Plant Physiology* Springer-Verlag (ed) 5: 266-282

Jena J., Gupta AK., 2012. *Ricinus communis* Linn: a phytopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceuticak Sciencies*. 4: 4 Pp. 25-29

Jiménez A., Mata R., Lotina, B., Anaya A., 1998 Interference of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with photosynthetic electron transport *Z. Naturforsch*, 53c, 55-59

Kanner J., Harel S., Palevitch D., Ben-gera I., 1977 Color retention in sweet paprika powder as affected by moisture contents and ripening stage *Journal or Food Technology* 12: 59-64

Kim S., Ha TY., Hwang IK., 2009 Analysis, bioavailability and potential healthy effects of capsanthin, natural red pigment from *Capsicum spp.* *Food Reviews International* 25: 198-213

King 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 MAESTRÍA. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Kogan MA., Pérez AJ., 2003. Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile pp. 22-31

Kudsk P., Streibig JC., 2003. Herbicides – a two edged sword *Weed Research* 43, Pp. 90-102

LeBaron HM., Gressel J., 1982. *Herbicide Resistance in Plants*. John Wiley & Sons. New York

León C., 2009 Fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos de la planta *Xylosma flexuosa* para la obtención de metabolitos secundarios con actividad herbicida: Lupenol TESIS Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química

Macías FA., *et al.*, 1995. Allelopathy. *ACS Symposium Series ACS Publications*. 582:23 310-329

Macías FA., Molinillo JMG., Torres A., Varela RM., Castellano D., 1997. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry* 45, 683-687

Macías FA., Galindo JC., 2001. Terpenoides alelopáticos: estructuras, actividad y aplicaciones. En: Anaya AL, Espinosa-García FJ, Cruz-Ortega R (eds). Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza y Valdez Editores. Pp 137-162

Macías FA., Molinillo JMG., Galindo JCG., Varela RM., Simonet AM., Castellano D., 2008 The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides *Journal of Crop Production* 4 (2): 237-255

Macías P., 2012. Herbicidas orgánicos vs Herbicidas químicos. Monografía LICENCIATURA. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas

Maeda H., Saito S., Nakamura N., Maoka T., 2013 Paprika pigments attenuate obesity-induced inflammation in 3t3-L1 adipocytes. *ISRN inflammation* 2013: 763758

Manpreet R., Dhamija H., Prashar B., Sharma S., 2012. *Ricinus communis* L. Review. *International Journal of PharmTech Research* 4 (4): 1706-1711

Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N., 2002 Rapid identification of carotenoids in a combination of Liquid Chromatography / UV-Visible Absorption Spectrometry by Photodiode-Array Detector and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (LC/PAD/APCI-MS) *Journal of Oleo Science* 51 (1): 1-9

Materska M., Perucka I., 2005 Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1750-1756

Meixueiro CJ., 2008 Ensayo in vivo de extractos orgánicos de plantas endémicas mexicanas y ensayo biodirigido del extracto hexánico de hojas de *Cercocarpus macrophyllus* para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida Tesis LICENCIATURA Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química

Mills J., *et al.*, 1980 Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts *FEBS Lett* 112: 173-177

Morales F., 2010 Fraccionamiento biodirigido de la planta *Cecropia obtusifolia* Bertol, para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida Tesis MAESTRIA Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química

Morales F., 2014. Síntesis de derivados de metabolitos secundarios aislados de plantas y evaluación de su efecto como posibles herbicidas. Tesis DOCTORADO. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Morales, F., Olivares, K., 2015 Flavonoids affect the Light Reaction of Photosynthesis in vitro and in vivo as well as the growth of plants *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (37): 8106-8115

Mori T., Ohnishi M., Komiyama M., Tsutsui A., Yabushita H., Okada H., 2002 Growth inhibitory effect of paradicsompaprika in cancer cell lines *Oncology Reports* 9:807-810

Najafpour MM., *et al.*, 2012 Applied Photosynthesis En Tech Croacia Capítulo Photosynthetic Inhibitors 3-22

Nelson D., Cox MM., 2009. Lehninger principles of biochemistry.5ª Edición. Editorial W. H. Freeman and Company, New York

Nery MG., 2011. Fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico de la planta *Piscidia piscipula* para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. Tesis LICENCIATURA. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química

Oleszek W., *et al.*, 1987 Allelopathic effects of volatiles from some Cruciferae species on lettuce, barnyard grass and wheat growth *Plant and Soil* 271-273

Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., Bansal YK., 2015 Secondary Metabolites of Plants and their role: overview *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 9 (3): 293-304

Perez A., Martin HD., Sies H., Stahl W., 2002 Incorporation of carotenoids from paprika oleoresin into human chylomicrons *British Journal of Nutrition* 89: 787-793

Powles SB., Holtum JAM 1994. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton

Powles SB., Shaner DL., 2001. *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC Press. Boca Raton

Pradeep PS, Ambika, SMS Chauhan., 2008. Activity guided isolation of antioxidants from leaves of *Ricinus communis* L. *Food Chemistry* Vol. 114. Pp. 1069-1072

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* 41: 117-124

Quiminet, Consulta 2015/08 Búsqueda en internet

Qin-Gang T., Xiang-Hai C., Zhi-Zhi D., Xiao-Dong L., 2009. Three terpenoids and a Tocopherol-Related Compound from *Ricinus communis* L. *Verlag Helvetica Chimica Acta* AG 92 2762-2768

Raval MK., Biswal B., Biswal UC., 2005 The mystery of oxygen evolution: analysis of structure and function of Photosystem II, the water-plastoquinone oxido-reductase *Photosynthesis Research* 85: 267-293

Raven PH., Evert RF., Eichorn 1990 Biology of plants 6a. edición Freeman and company (ed) New York, EEUU

- Rice EL., *et al.*, 1984 Allelopathy 2a edición New York: Academic Press.
- Rodriguez A, González MD., Nuez F., 2001 Carotenoid composition and vitamin a value in aji (*Capsicum baccatum* L.) and Rocoto (*C. pubescens* R & P), 2 pepper species from the andean región *Journal of Food Science* 75: S446-S453
- Ryan GF., *et al.*, 1970 Resistance of common groundsel to simazine and atrazine *Weed Science* 53:84-89
- Saha S., Ouitrakul R., Izawa S., Good N., 1971 Electrone transport and phosphorylation in chloroplasts as function of the electron acceptor *Journal of Biological Chemistry* 246, 3204-3209
- Shah SNM., Tian SL., Gong ZH., Arisha MH., 2014 Studies on metabolism of capsanthin and its regulation under different conditions in pepper fruits (*Capsicum spp.*) *Annual Research & Review in Biology* 4 (7): 1106-1120
- Schweiggert U., Kammerer DR., Carle R., Schieber A., 2005 Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annum* L.) by HPLC/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 2617-2628
- Sitton D., West CA., 1975. Casbene: an anti-fungal diterpene produced in cell-free extracts or *Ricinus communis* seedlings. *Phytochemistry*. Vol. 14. Pp. 1921-1925
- Strasser RJ, Srivastava A., Govindjee, 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transients in plants and cyanobacteria. *Photochemistry Photobiology* Vol. 61. Pp. 32-42
- Strasser R., Srivastava A., Tsimilli-Michael M., 2000 The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples *Probing Photosynthesis, Mechanism, Regulation, Adaptation*. Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (Eds.) Taylor & Francis Pp. 445-483
- Southam CM y Erlich J., 1943 Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture *Phytopathology* 33: 517-524
- Thanaboripat D., *et al.*, 2011 Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts *KMITL Science Technology Journal* 11: 35-42
- Voet D., Voet J., Pratt CW., 2005. Fundamentals of Biochemistry. 2ª. Edición. John Wiley & Sons, New York.
- Vyvyan JR., *et al.*, 2002. Allelochemicals as leads fro new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*. 58:1631-1646
- Wu Z., Deng X., He Z., Wang J., 2012 Extraction of Functional Capsanthin *Advanced Materials Research* 441: 517-521

Yamano Y., Ito M., 2001 Total synthesis of capsanthin using Lewis acid-promoted region- and stereoselective rearrangement of tetrasubstituted epoxide *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49 (12): 1662-1663

Ya-Qin L., Yanagawa S., Sasanuma T., Sasakuma T., 2004 Orange fruit color in *Capsicum* due to deletion of capsanthin-capsorubin synthesis gene *Breeding Science* 54: 33-39

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 *Journal of Biological Chemistry* 266: 22847-22850

Zavaleta A., 2011. Análisis de la fluorescencia de la clorofila a en la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad inhibitoria en la fotosíntesis en *Guazuma ulmifolia*. Tesis LICENCIATURA. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias

Zhang Q., Pi J., Woods CG., Andersen ME., 2009 Phase I to II cross-induction of xenobiotic metabolizing enzymes: A feedforward control mechanism form potential hermetic responses *Toxicology and Applied Pharmacology* 237 345-356

# CAPÍTULO VIII. ANEXOS

## VIII.1 ANEXO 1: Identificación de capsantina

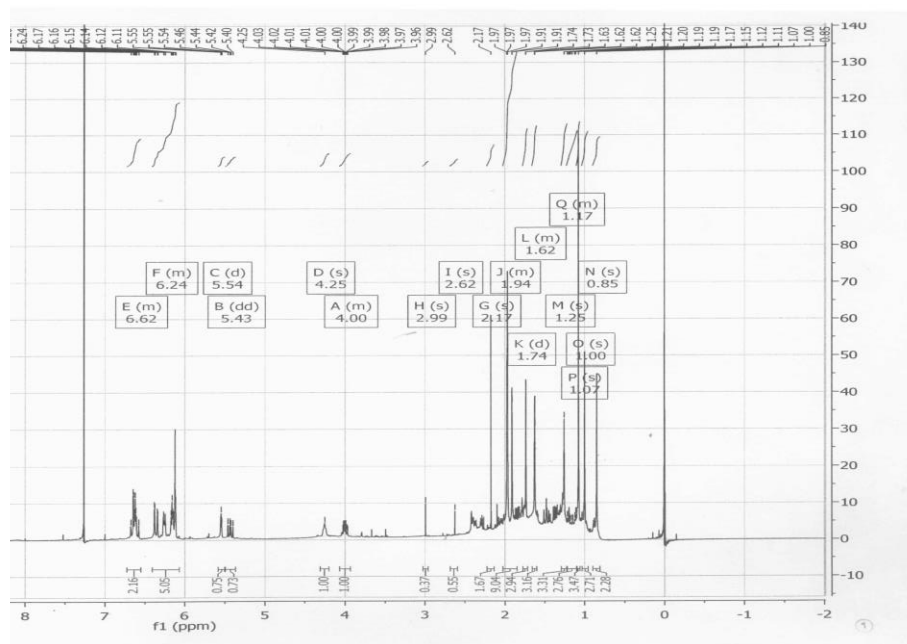


Figura A1.1. Resonancia Magnética Nuclear Protónica del metabolito aislado FH5.

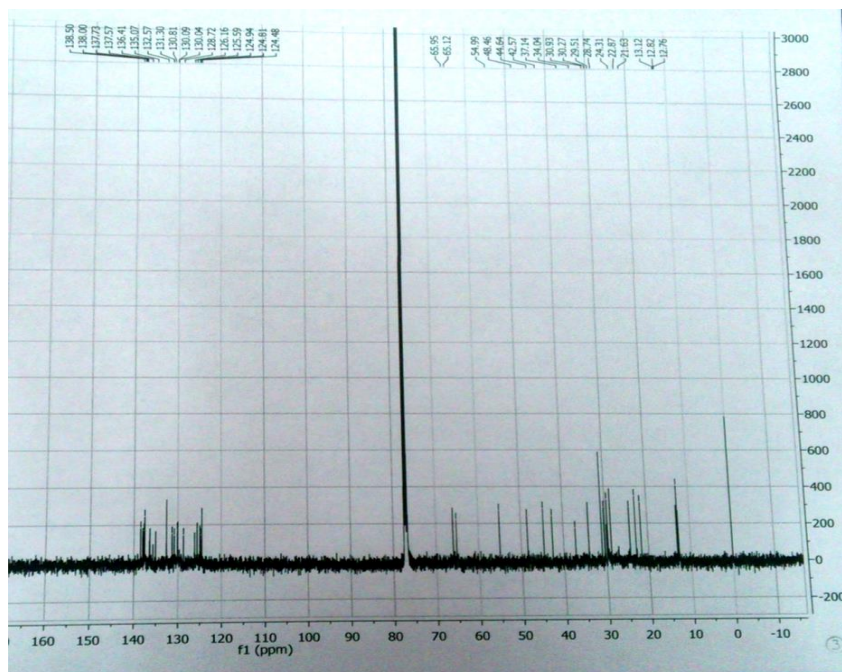


Figura A1.2. Resonancia Magnética Nuclear Carbono 13 del metabolito aislado FH5.

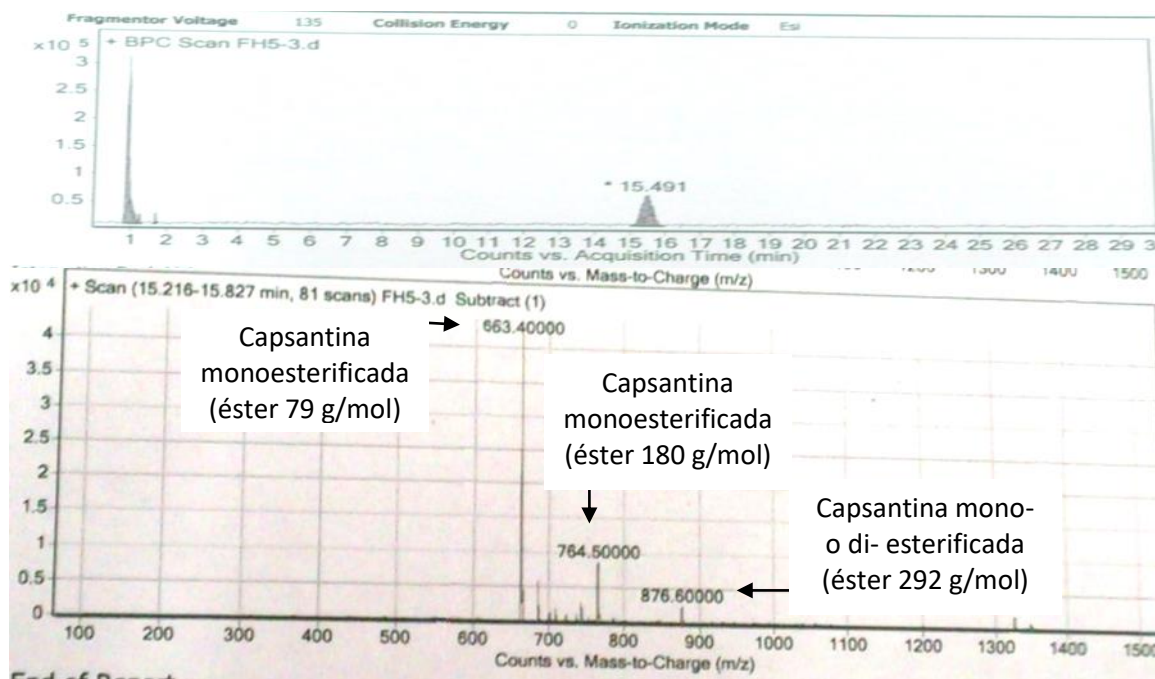
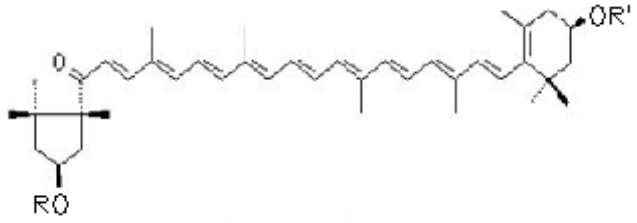
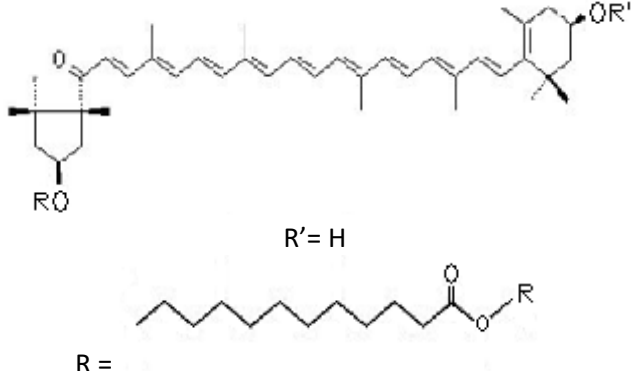
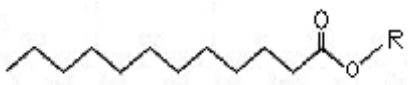
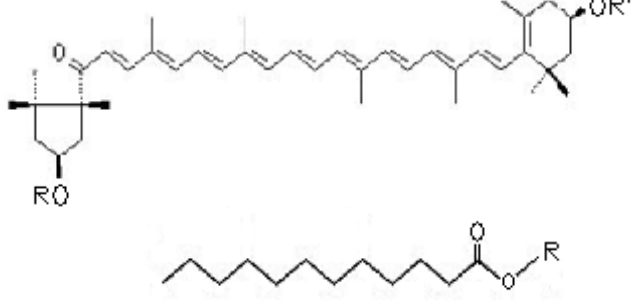
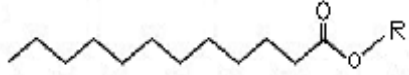


Figura A1.3. HPLC acoplado a Masas del metabolito aislado FH5.

**Tabla A1.1. Formas de la capsantina: no esterificada y ejemplos de esterificada.** Deli József *et al.*, 2001.

Compuesto	Masa molecular (g/mol)	Estructura química
Capsantina no esterificada	584	 <p style="text-align: center;"><math>R = R' = H</math></p>
Capsantina Monoesterificada (laurato C12:0)	768	 <p style="text-align: center;"><math>R' = H</math></p> <p style="text-align: center;"><math>R =</math> </p>
Capsantina diesterificada (dilaurato C12:0)	950	 <p style="text-align: center;"><math>R = R' =</math> </p>



VIII.2 ANEXO 2: Resultados de ensayos de germinación y elongación de tallos y raíces al evaluar la capsantina.

Tabla A2.1. Ensayo de germinación y elongación de tallos y raíces al evaluar la capsantina.

DE: Desviación Estándar

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	TOMATE (parámetro $\pm$ DE)			LECHUGA (parámetro $\pm$ DE)			TRIGO (parámetro $\pm$ DE)			PASTO (parámetro $\pm$ DE)		
	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Germinación (semillas)	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Germinación (semillas)	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Germinación (semillas)	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Germinación (semillas)
0 (con agua)	3.7 $\pm$ 1.72	0.6 $\pm$ 0.35	18 $\pm$ 2.00	3.8 $\pm$ 0.55	3.7 $\pm$ 0.83	32 $\pm$ 2.64	2.4 $\pm$ 0.74	4.2 $\pm$ 1.51	17.3 $\pm$ 2.08	4.3 $\pm$ 2.28	1.9 $\pm$ 1.40	29 $\pm$ 1.53
0 (DMSO 2 % v/v)	3.7 $\pm$ 1.80	0.9 $\pm$ 1.12	15 $\pm$ 4.36	3.8 $\pm$ 0.56	3.8 $\pm$ 0.94	25 $\pm$ 5.29	2.2 $\pm$ 0.60	3.9 $\pm$ 1.18	17.8 $\pm$ 1.76	3.6 $\pm$ 2.13	1.9 $\pm$ 1.09	27 $\pm$ 3.51
25	3.6 $\pm$ 1.90	0.6 $\pm$ 0.43	10 $\pm$ 1.00	3.8 $\pm$ 0.61	4.3 $\pm$ 0.74	18 $\pm$ 2.00	2.0 $\pm$ 0.58	4.1 $\pm$ 1.53	11.2 $\pm$ 1.26	3.3 $\pm$ 2.44	1.3 $\pm$ 1.36	18 $\pm$ 1.53
50	4.1 $\pm$ 1.71	1.7 $\pm$ 1.36	6 $\pm$ 2.00	3.9 $\pm$ 0.75	3.7 $\pm$ 1.09	11 $\pm$ 2.08	1.8 $\pm$ 0.60	3.8 $\pm$ 1.07	11.7 $\pm$ 0.58	4.0 $\pm$ 2.12	2.1 $\pm$ 1.39	18 $\pm$ 1.15
100	3.3 $\pm$ 1.70	0.7 $\pm$ 0.56	14 $\pm$ 2.00	4.0 $\pm$ 0.49	3.5 $\pm$ 0.97	3 $\pm$ 2.00	2.0 $\pm$ 0.60	4.8 $\pm$ 1.28	14.2 $\pm$ 1.26	3.8 $\pm$ 2.07	1.6 $\pm$ 1.33	29 $\pm$ 2.52

Tabla A2.2. Porcentajes respecto al control (DMSO 2 % v/v) del ensayo de germinación y elongación de tallos y raíces al evaluar la capsantina.

E: Error

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	TOMATE (parámetro $\pm$ E)			LECHUGA (parámetro $\pm$ E)			TRIGO (parámetro $\pm$ E)			PASTO (parámetro $\pm$ E)		
	Tallo (%)	Raíz (%)	Germinación (%)	Tallo (%)	Raíz (%)	Germinación (%)	Tallo (%)	Raíz (%)	Germinación (%)	Tallo (%)	Raíz (%)	Germinación (%)
25	98.17 $\pm$ 4.90	68.93 $\pm$ 3.44	110 $\pm$ 5.5	98.91 $\pm$ 4.95	114 $\pm$ 5.7	96.49 $\pm$ 4.82	92.09 $\pm$ 4.60	105.6 $\pm$ 5.28	96.15 $\pm$ 4.80	91.19 $\pm$ 4.55	71.7 $\pm$ 3.58	81.16 $\pm$ 4.05
50	110.2 $\pm$ 5.51	189.3 $\pm$ 9.46	90 $\pm$ 4.5	101.8 $\pm$ 5.09	97.13 $\pm$ 4.86	47.37 $\pm$ 2.36	84.42 $\pm$ 4.22	98.19 $\pm$ 4.90	92.31 $\pm$ 4.61	111 $\pm$ 5.55	113.2 $\pm$ 5.66	82.61 $\pm$ 4.13
100	89.89 $\pm$ 4.49	73.18 $\pm$ 3.65	220 $\pm$ 11	104.4 $\pm$ 5.22	93.68 $\pm$ 4.68	26.32 $\pm$ 1.31	93.43 $\pm$ 4.67	124.6 $\pm$ 6.23	119.2 $\pm$ 5.96	106 $\pm$ 5.3	87.78 $\pm$ 4.38	124.6 $\pm$ 6.23

### VIII.3 ANEXO 3: Análisis estadístico de varianzas (ANOVA).

Tabla A3.1. ANOVA de una vía para el ensayo de germinación al evaluar la capsantina.

ENSAYO DE:	<i>Phytalis ixocarpa</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Lolium perenne</i>																																																																																																																																																																																																
ELONGACIÓN DE TALLO	<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>48</td> <td>3818</td> <td>79.33333333</td> <td>2.3467037</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>36</td> <td>3115</td> <td>86.52777778</td> <td>2.2425578</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1.5173282</td> <td>1</td> <td>1.5173282</td> <td>0.00071</td> <td>0.5342723</td> <td>3.8625594</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>231.52337</td> <td>72</td> <td>3.2156019</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>233.04069</td> <td>73</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	48	3818	79.33333333	2.3467037	cr DMSO	36	3115	86.52777778	2.2425578	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	1.5173282	1	1.5173282	0.00071	0.5342723	3.8625594	Dentro de los grupos	231.52337	72	3.2156019				Total	233.04069	73					<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>36</td> <td>3318</td> <td>92.16666667</td> <td>0.5266222</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>37</td> <td>3211</td> <td>86.78378378</td> <td>0.5188889</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>0.022525</td> <td>1</td> <td>0.022525</td> <td>0.00023</td> <td>0.6242333</td> <td>3.8625594</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>41.79651</td> <td>72</td> <td>0.5805071</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>41.81903</td> <td>73</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	36	3318	92.16666667	0.5266222	cr DMSO	37	3211	86.78378378	0.5188889	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	0.022525	1	0.022525	0.00023	0.6242333	3.8625594	Dentro de los grupos	41.79651	72	0.5805071				Total	41.81903	73					<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>36</td> <td>3118</td> <td>86.61111111</td> <td>0.5599056</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>39</td> <td>3417</td> <td>87.61538462</td> <td>0.5178977</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1.221241</td> <td>1</td> <td>1.221241</td> <td>0.1290772</td> <td>0.7264787</td> <td>3.8625594</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>13.862395</td> <td>75</td> <td>0.1848185</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15.083636</td> <td>76</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	36	3118	86.61111111	0.5599056	cr DMSO	39	3417	87.61538462	0.5178977	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	1.221241	1	1.221241	0.1290772	0.7264787	3.8625594	Dentro de los grupos	13.862395	75	0.1848185				Total	15.083636	76					<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>80</td> <td>3818</td> <td>47.725</td> <td>0.5178977</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>89</td> <td>3255</td> <td>36.57303371</td> <td>0.5266222</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>19.97596</td> <td>1</td> <td>19.97596</td> <td>5.9993951</td> <td>0.0481841</td> <td>3.9212113</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>799.834723</td> <td>155</td> <td>5.160223993</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>779.232229</td> <td>156</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	80	3818	47.725	0.5178977	cr DMSO	89	3255	36.57303371	0.5266222	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	19.97596	1	19.97596	5.9993951	0.0481841	3.9212113	Dentro de los grupos	799.834723	155	5.160223993				Total	779.232229	156				
	RESUMEN																																																																																																																																																																																																			
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	48	3818	79.33333333	2.3467037																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	36	3115	86.52777778	2.2425578																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	1.5173282	1	1.5173282	0.00071	0.5342723	3.8625594																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	231.52337	72	3.2156019																																																																																																																																																																																																	
Total	233.04069	73																																																																																																																																																																																																		
RESUMEN																																																																																																																																																																																																				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	36	3318	92.16666667	0.5266222																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	37	3211	86.78378378	0.5188889																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	0.022525	1	0.022525	0.00023	0.6242333	3.8625594																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	41.79651	72	0.5805071																																																																																																																																																																																																	
Total	41.81903	73																																																																																																																																																																																																		
RESUMEN																																																																																																																																																																																																				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	36	3118	86.61111111	0.5599056																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	39	3417	87.61538462	0.5178977																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	1.221241	1	1.221241	0.1290772	0.7264787	3.8625594																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	13.862395	75	0.1848185																																																																																																																																																																																																	
Total	15.083636	76																																																																																																																																																																																																		
RESUMEN																																																																																																																																																																																																				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	80	3818	47.725	0.5178977																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	89	3255	36.57303371	0.5266222																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	19.97596	1	19.97596	5.9993951	0.0481841	3.9212113																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	799.834723	155	5.160223993																																																																																																																																																																																																	
Total	779.232229	156																																																																																																																																																																																																		
ELONGACIÓN DE RAÍZ	<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>48</td> <td>3818</td> <td>79.33333333</td> <td>2.3467037</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>36</td> <td>3115</td> <td>86.52777778</td> <td>2.2425578</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1.5173282</td> <td>1</td> <td>1.5173282</td> <td>0.00071</td> <td>0.5342723</td> <td>3.8625594</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>231.52337</td> <td>72</td> <td>3.2156019</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>233.04069</td> <td>73</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	48	3818	79.33333333	2.3467037	cr DMSO	36	3115	86.52777778	2.2425578	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	1.5173282	1	1.5173282	0.00071	0.5342723	3.8625594	Dentro de los grupos	231.52337	72	3.2156019				Total	233.04069	73					<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>36</td> <td>3318</td> <td>92.16666667</td> <td>0.5266222</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>37</td> <td>3211</td> <td>86.78378378</td> <td>0.5188889</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>0.022525</td> <td>1</td> <td>0.022525</td> <td>0.00023</td> <td>0.6242333</td> <td>3.8625594</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>41.79651</td> <td>72</td> <td>0.5805071</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>41.81903</td> <td>73</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	36	3318	92.16666667	0.5266222	cr DMSO	37	3211	86.78378378	0.5188889	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	0.022525	1	0.022525	0.00023	0.6242333	3.8625594	Dentro de los grupos	41.79651	72	0.5805071				Total	41.81903	73					<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>36</td> <td>3118</td> <td>86.61111111</td> <td>0.5599056</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>39</td> <td>3417</td> <td>87.61538462</td> <td>0.5178977</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>1.221241</td> <td>1</td> <td>1.221241</td> <td>0.1290772</td> <td>0.7264787</td> <td>3.8625594</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>13.862395</td> <td>75</td> <td>0.1848185</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15.083636</td> <td>76</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	36	3118	86.61111111	0.5599056	cr DMSO	39	3417	87.61538462	0.5178977	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	1.221241	1	1.221241	0.1290772	0.7264787	3.8625594	Dentro de los grupos	13.862395	75	0.1848185				Total	15.083636	76					<p>ANÁLISIS DE varianzas de un factor</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">RESUMEN</th> </tr> <tr> <th>Grupos</th> <th>Cuenta</th> <th>Suma</th> <th>Promedio</th> <th>Varianza</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cr</td> <td>80</td> <td>3818</td> <td>47.725</td> <td>0.5178977</td> </tr> <tr> <td>cr DMSO</td> <td>89</td> <td>3255</td> <td>36.57303371</td> <td>0.5266222</td> </tr> </tbody> </table> <p>ANÁLISIS DE varianzas</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Origen de las variaciones</th> <th>Suma de cuadrados</th> <th>Grados de libertad</th> <th>Promedio de cuadrados</th> <th>F</th> <th>Probabilidad &gt; para F</th> <th>Valor crítico para F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Entre grupos</td> <td>19.97596</td> <td>1</td> <td>19.97596</td> <td>5.9993951</td> <td>0.0481841</td> <td>3.9212113</td> </tr> <tr> <td>Dentro de los grupos</td> <td>799.834723</td> <td>155</td> <td>5.160223993</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>779.232229</td> <td>156</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	RESUMEN					Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	cr	80	3818	47.725	0.5178977	cr DMSO	89	3255	36.57303371	0.5266222	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F	Entre grupos	19.97596	1	19.97596	5.9993951	0.0481841	3.9212113	Dentro de los grupos	799.834723	155	5.160223993				Total	779.232229	156				
	RESUMEN																																																																																																																																																																																																			
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	48	3818	79.33333333	2.3467037																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	36	3115	86.52777778	2.2425578																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	1.5173282	1	1.5173282	0.00071	0.5342723	3.8625594																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	231.52337	72	3.2156019																																																																																																																																																																																																	
Total	233.04069	73																																																																																																																																																																																																		
RESUMEN																																																																																																																																																																																																				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	36	3318	92.16666667	0.5266222																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	37	3211	86.78378378	0.5188889																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	0.022525	1	0.022525	0.00023	0.6242333	3.8625594																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	41.79651	72	0.5805071																																																																																																																																																																																																	
Total	41.81903	73																																																																																																																																																																																																		
RESUMEN																																																																																																																																																																																																				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	36	3118	86.61111111	0.5599056																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	39	3417	87.61538462	0.5178977																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	1.221241	1	1.221241	0.1290772	0.7264787	3.8625594																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	13.862395	75	0.1848185																																																																																																																																																																																																	
Total	15.083636	76																																																																																																																																																																																																		
RESUMEN																																																																																																																																																																																																				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza																																																																																																																																																																																																
cr	80	3818	47.725	0.5178977																																																																																																																																																																																																
cr DMSO	89	3255	36.57303371	0.5266222																																																																																																																																																																																																
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad > para F	Valor crítico para F																																																																																																																																																																																														
Entre grupos	19.97596	1	19.97596	5.9993951	0.0481841	3.9212113																																																																																																																																																																																														
Dentro de los grupos	799.834723	155	5.160223993																																																																																																																																																																																																	
Total	779.232229	156																																																																																																																																																																																																		

# GERMINACIÓN

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	36	12	4
01-DMSO	3	45	15	15

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	15.0	1	15.0	1.7781304	0.2042711
Dentro de los grupos	40	4	10.0		
Total	55.0	5			

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	36	12	4
01-DMSO	3	45	15	15
20-UM	3	30	10	1
30-UM	3	30	10	4
100-UM	3	45	15	1

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	25.0	4	6.25	31.22275	0.0147211
Dentro de los grupos	66	15	4.4		
Total	121.0	19			

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	36	12	7
01-DMSO	3	35	11.67	25

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	11.0	1	11.0	4.2	0.07950
Dentro de los grupos	36	4	9.0		
Total	47.0	5			

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	36	12	7
01-DMSO	3	35	11.67	25
20-UM	3	36	12	4
30-UM	3	32	10.67	1
100-UM	3	45	15	4

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	125.2667	4	31.31667	6.46220	0.0041354
Dentro de los grupos	14.88889	15	0.992593		
Total	140.1556	19			

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	32	10.67	4.333333
01-DMSO	3	33.5	11.17	1.083333

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	0.375	1	0.375	0.1011238	0.74829186
Dentro de los grupos	34.83333	4	8.708333		
Total	35.20833	5			

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	32	10.67	4.333333
01-DMSO	3	33.5	11.17	1.083333
20-UM	3	31.5	10.5	1.583333
30-UM	3	33	11.0	0.333333
100-UM	3	42.5	14.166667	1.583333

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	115.1	4	28.775	13.179389	0.00536154
Dentro de los grupos	21.83333	15	1.455556		
Total	136.9333	19			

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	30	10	2.333333
01-DMSO	3	45	15	26.666667

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	10.66667	1	10.66667	1.4245454	0.2942817
Dentro de los grupos	29.33333	4	7.333333		
Total	40	5			

Análisis de varianza de un factor				
RESUMEN				
Grupos	Cuentas	Suma	Promedio	Varianza
01	3	36	12	29.33333
01-DMSO	3	45	15	26.66667
20-UM	3	33	11	17.66667
30-UM	3	33	11	17.66667
100-UM	3	42	14	26.66667

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F
Entre grupos	412.69667	4	103.17417	20.912262	7.59976-05
Dentro de los grupos	45.33333	15	3.022222		
Total	458.03	19			

Tabla A3.2. ANOVA de dos vías para el ensayo de germinación al evaluar la capsantina.

Ensayo	ANOVA de dos vías (comparaciones)																																																																																																																																
<b>GERMINACIÓN</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4" data-bbox="905 397 1480 430">2way ANOVA Multiple comparisons</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="905 446 1241 462">1</td> <td data-bbox="905 446 1241 462">Within each column, compare rows (simple effects within columns)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 462 1241 479">2</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 479 1241 495">3</td> <td data-bbox="905 479 1241 495">Number of families</td> <td data-bbox="1241 479 1480 495">4</td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 495 1241 511">4</td> <td data-bbox="905 495 1241 511">Number of comparisons per family</td> <td data-bbox="1241 495 1480 511">4</td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 511 1241 527">5</td> <td data-bbox="905 511 1241 527">Alpha</td> <td data-bbox="1241 511 1480 527">0.05</td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 527 1241 544">6</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 544 1241 560">7</td> <td data-bbox="905 544 1241 560">Dunnett's multiple comparisons test</td> <td data-bbox="1241 544 1480 560">Mean Diff.</td> <td data-bbox="1480 544 1711 560">95.00% CI of diff.</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 560 1241 576">8</td> <td></td> <td></td> <td data-bbox="1480 560 1711 576">Significant?</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 576 1241 592">9</td> <td data-bbox="905 576 1241 592">TRIGO</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 592 1241 609">10</td> <td data-bbox="905 592 1241 609">Control Germinación vs. Control DMSO G</td> <td data-bbox="1241 592 1480 609">-0.5</td> <td data-bbox="1480 592 1711 609">-5.477 to 4.477</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 609 1241 625">11</td> <td data-bbox="905 609 1241 625">Control Germinación vs. 25 uM G</td> <td data-bbox="1241 609 1480 625">6.167</td> <td data-bbox="1480 609 1711 625">1.189 to 11.14</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 625 1241 641">12</td> <td data-bbox="905 625 1241 641">Control Germinación vs. 50 uM G</td> <td data-bbox="1241 625 1480 641">5.667</td> <td data-bbox="1480 625 1711 641">0.6895 to 10.64</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 641 1241 657">13</td> <td data-bbox="905 641 1241 657">Control Germinación vs. 100 uM G</td> <td data-bbox="1241 641 1480 657">3.167</td> <td data-bbox="1480 641 1711 657">-1.811 to 8.144</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 657 1241 673">14</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 673 1241 690">15</td> <td data-bbox="905 673 1241 690">LECHUGA</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 690 1241 706">16</td> <td data-bbox="905 690 1241 706">Control Germinación vs. Control DMSO G</td> <td data-bbox="1241 690 1480 706">7</td> <td data-bbox="1480 690 1711 706">2.023 to 11.98</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 706 1241 722">17</td> <td data-bbox="905 706 1241 722">Control Germinación vs. 25 uM G</td> <td data-bbox="1241 706 1480 722">14</td> <td data-bbox="1480 706 1711 722">9.023 to 18.98</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 722 1241 738">18</td> <td data-bbox="905 722 1241 738">Control Germinación vs. 50 uM G</td> <td data-bbox="1241 722 1480 738">21.33</td> <td data-bbox="1480 722 1711 738">16.36 to 26.31</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 738 1241 755">19</td> <td data-bbox="905 738 1241 755">Control Germinación vs. 100 uM G</td> <td data-bbox="1241 738 1480 755">29</td> <td data-bbox="1480 738 1711 755">24.02 to 33.98</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 755 1241 771">20</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 771 1241 787">21</td> <td data-bbox="905 771 1241 787">TOMATE</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 787 1241 803">22</td> <td data-bbox="905 787 1241 803">Control Germinación vs. Control DMSO G</td> <td data-bbox="1241 787 1480 803">3</td> <td data-bbox="1480 787 1711 803">-1.977 to 7.977</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 803 1241 820">23</td> <td data-bbox="905 803 1241 820">Control Germinación vs. 25 uM G</td> <td data-bbox="1241 803 1480 820">8</td> <td data-bbox="1480 803 1711 820">3.023 to 12.98</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 820 1241 836">24</td> <td data-bbox="905 820 1241 836">Control Germinación vs. 50 uM G</td> <td data-bbox="1241 820 1480 836">12</td> <td data-bbox="1480 820 1711 836">7.023 to 16.98</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 836 1241 852">25</td> <td data-bbox="905 836 1241 852">Control Germinación vs. 100 uM G</td> <td data-bbox="1241 836 1480 852">4</td> <td data-bbox="1480 836 1711 852">-0.9772 to 6.977</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 852 1241 868">26</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 868 1241 885">27</td> <td data-bbox="905 868 1241 885">PASTO</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 885 1241 901">28</td> <td data-bbox="905 885 1241 901">Control Germinación vs. Control DMSO G</td> <td data-bbox="1241 885 1480 901">2.667</td> <td data-bbox="1480 885 1711 901">-2.311 to 7.644</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 901 1241 917">29</td> <td data-bbox="905 901 1241 917">Control Germinación vs. 25 uM G</td> <td data-bbox="1241 901 1480 917">11.67</td> <td data-bbox="1480 901 1711 917">6.689 to 16.64</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 917 1241 933">30</td> <td data-bbox="905 917 1241 933">Control Germinación vs. 50 uM G</td> <td data-bbox="1241 917 1480 933">11.67</td> <td data-bbox="1480 917 1711 933">6.689 to 16.64</td> </tr> <tr> <td data-bbox="905 933 1241 950">31</td> <td data-bbox="905 933 1241 950">Control Germinación vs. 100 uM G</td> <td data-bbox="1241 933 1480 950">0.6667</td> <td data-bbox="1480 933 1711 950">-4.311 to 5.644</td> </tr> </tbody> </table>	2way ANOVA Multiple comparisons				1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)			2				3	Number of families	4		4	Number of comparisons per family	4		5	Alpha	0.05		6				7	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	8			Significant?	9	TRIGO			10	Control Germinación vs. Control DMSO G	-0.5	-5.477 to 4.477	11	Control Germinación vs. 25 uM G	6.167	1.189 to 11.14	12	Control Germinación vs. 50 uM G	5.667	0.6895 to 10.64	13	Control Germinación vs. 100 uM G	3.167	-1.811 to 8.144	14				15	LECHUGA			16	Control Germinación vs. Control DMSO G	7	2.023 to 11.98	17	Control Germinación vs. 25 uM G	14	9.023 to 18.98	18	Control Germinación vs. 50 uM G	21.33	16.36 to 26.31	19	Control Germinación vs. 100 uM G	29	24.02 to 33.98	20				21	TOMATE			22	Control Germinación vs. Control DMSO G	3	-1.977 to 7.977	23	Control Germinación vs. 25 uM G	8	3.023 to 12.98	24	Control Germinación vs. 50 uM G	12	7.023 to 16.98	25	Control Germinación vs. 100 uM G	4	-0.9772 to 6.977	26				27	PASTO			28	Control Germinación vs. Control DMSO G	2.667	-2.311 to 7.644	29	Control Germinación vs. 25 uM G	11.67	6.689 to 16.64	30	Control Germinación vs. 50 uM G	11.67	6.689 to 16.64	31	Control Germinación vs. 100 uM G	0.6667	-4.311 to 5.644
	2way ANOVA Multiple comparisons																																																																																																																																
	1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)																																																																																																																															
	2																																																																																																																																
	3	Number of families	4																																																																																																																														
	4	Number of comparisons per family	4																																																																																																																														
	5	Alpha	0.05																																																																																																																														
	6																																																																																																																																
	7	Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.																																																																																																																													
	8			Significant?																																																																																																																													
	9	TRIGO																																																																																																																															
	10	Control Germinación vs. Control DMSO G	-0.5	-5.477 to 4.477																																																																																																																													
	11	Control Germinación vs. 25 uM G	6.167	1.189 to 11.14																																																																																																																													
	12	Control Germinación vs. 50 uM G	5.667	0.6895 to 10.64																																																																																																																													
	13	Control Germinación vs. 100 uM G	3.167	-1.811 to 8.144																																																																																																																													
	14																																																																																																																																
	15	LECHUGA																																																																																																																															
	16	Control Germinación vs. Control DMSO G	7	2.023 to 11.98																																																																																																																													
	17	Control Germinación vs. 25 uM G	14	9.023 to 18.98																																																																																																																													
	18	Control Germinación vs. 50 uM G	21.33	16.36 to 26.31																																																																																																																													
	19	Control Germinación vs. 100 uM G	29	24.02 to 33.98																																																																																																																													
	20																																																																																																																																
	21	TOMATE																																																																																																																															
	22	Control Germinación vs. Control DMSO G	3	-1.977 to 7.977																																																																																																																													
	23	Control Germinación vs. 25 uM G	8	3.023 to 12.98																																																																																																																													
	24	Control Germinación vs. 50 uM G	12	7.023 to 16.98																																																																																																																													
	25	Control Germinación vs. 100 uM G	4	-0.9772 to 6.977																																																																																																																													
	26																																																																																																																																
	27	PASTO																																																																																																																															
	28	Control Germinación vs. Control DMSO G	2.667	-2.311 to 7.644																																																																																																																													
	29	Control Germinación vs. 25 uM G	11.67	6.689 to 16.64																																																																																																																													
30	Control Germinación vs. 50 uM G	11.67	6.689 to 16.64																																																																																																																														
31	Control Germinación vs. 100 uM G	0.6667	-4.311 to 5.644																																																																																																																														

		2way ANOVA Multiple comparisons			
		Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	
<b>ELONGACIÓN DE RAÍZ</b>	1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)			
	2				
	3	Number of families	4		
	4	Number of comparisons per family	4		
	5	Alpha	0.05		
	6				
	7	Dunnett's multiple comparisons test		Mean Diff.	95.00% CI of diff.
	8				
	9	TRIGO			
	10	Control Raíz vs. Control DMSO R	0.4	-0.2411 to 1.041	No
	11	Control Raíz vs. 25 uM R	0.146	-0.5736 to 0.8656	No
	12	Control Raíz vs. 50 uM R	0.4333	-0.2953 to 1.162	No
	13	Control Raíz vs. 100 uM R	-0.5919	-1.268 to 0.08438	No
	14				
	15	LECHUGA			
	16	Control Raíz vs. Control DMSO R	-0.0811	-0.5512 to 0.389	No
	17	Control Raíz vs. 25 uM R	-0.6094	-1.085 to -0.1341	Yes
	18	Control Raíz vs. 50 uM R	0.02748	-0.5834 to 0.6384	No
	19	Control Raíz vs. 100 uM R	0.1578	-0.6197 to 0.9354	No
	20				
	21	TOMATE			
	22	Control Raíz vs. Control DMSO R	-0.3284	-0.9762 to 0.3195	No
	23	Control Raíz vs. 25 uM R	-0.04564	-0.6749 to 0.5837	No
	24	Control Raíz vs. 50 uM R	-1.141	-1.911 to -0.3704	Yes
	25	Control Raíz vs. 100 uM R	-0.08428	-0.6647 to 0.4961	No
	26				
	27	PASTO			
	28	Control Raíz vs. Control DMSO R	-0.04404	-0.4934 to 0.4053	No
	29	Control Raíz vs. 25 uM R	0.5284	0.05169 to 1.007	Yes
	30	Control Raíz vs. 50 uM R	-0.2471	-0.7222 to 0.228	No
	31	Control Raíz vs. 100 uM R	0.2286	-0.1951 to 0.6523	No
<b>ELONGACIÓN DE TALLO</b>	1	Within each column, compare rows (simple effects within columns)			
	2				
	3	Number of families	4		
	4	Number of comparisons per family	10		
	5	Alpha	0.05		
	6				
	7	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?
	8				
	9	TRIGO			
	10	Control Tallo vs. Control DMSO T	0.2632	-0.7478 to 1.274	No
	11	Control Tallo vs. 25 uM T	0.4132	-0.7218 to 1.548	No
	12	Control Tallo vs. 50 uM T	0.5798	-0.5691 to 1.729	No
	13	Control Tallo vs. 100 uM T	0.3841	-0.6824 to 1.451	No
	14	Control DMSO T vs. 25 uM T	0.15	-0.9848 to 1.285	No
	15	Control DMSO T vs. 50 uM T	0.3167	-0.8323 to 1.466	No
	16	Control DMSO T vs. 100 uM T	0.121	-0.8455 to 1.187	No
	17	25 uM T vs. 50 uM T	0.1667	-1.093 to 1.426	No
	18	25 uM T vs. 100 uM T	-0.02903	-1.214 to 1.155	No
	19	50 uM T vs. 100 uM T	-0.1957	-1.394 to 1.002	No
	20				
	21	LECHUGA			
	22	Control Tallo vs. Control DMSO T	-0.00798	-0.7492 to 0.7333	No
	23	Control Tallo vs. 25 uM T	0.03339	-0.7162 to 0.783	No
	24	Control Tallo vs. 50 uM T	-0.07718	-1.04 to 0.8861	No
	25	Control Tallo vs. 100 uM T	-0.1757	-1.402 to 1.05	No
	26	Control DMSO T vs. 25 uM T	0.04137	-0.7915 to 0.8743	No
	27	Control DMSO T vs. 50 uM T	-0.0692	-1.099 to 0.9603	No
	28	Control DMSO T vs. 100 uM T	-0.1677	-1.446 to 1.111	No
	29	25 uM T vs. 50 uM T	-0.1106	-1.146 to 0.9249	No
	30	25 uM T vs. 100 uM T	-0.2091	-1.493 to 1.074	No
	31	50 uM T vs. 100 uM T	-0.09852	-1.518 to 1.321	No
32					
33	TOMATE				
34	Control Tallo vs. Control DMSO T	0.03027	-0.9913 to 1.052	No	
35	Control Tallo vs. 25 uM T	0.09845	-0.8939 to 1.091	No	
36	Control Tallo vs. 50 uM T	-0.3475	-1.562 to 0.867	No	
37	Control Tallo vs. 100 uM T	0.406	-0.5092 to 1.321	No	
38	Control DMSO T vs. 25 uM T	0.06818	-1.043 to 1.18	No	
39	Control DMSO T vs. 50 uM T	-0.3778	-1.692 to 0.936	No	
40	Control DMSO T vs. 100 uM T	0.3758	-0.6676 to 1.419	No	
41	25 uM T vs. 50 uM T	-0.446	-1.737 to 0.8452	No	
42	25 uM T vs. 100 uM T	0.3076	-0.7072 to 1.322	No	
43	50 uM T vs. 100 uM T	0.7535	-0.4794 to 1.986	No	
44					
45	PASTO				
46	Control Tallo vs. Control DMSO T	0.7082	-0.003751 to 1.417	No	
47	Control Tallo vs. 25 uM T	1.028	0.2747 to 1.791	Yes	
48	Control Tallo vs. 50 uM T	0.3106	-0.4387 to 1.06	No	
49	Control Tallo vs. 100 uM T	0.4898	-0.1784 to 1.158	No	
50	Control DMSO T vs. 25 uM T	0.3197	-0.4729 to 1.112	No	
51	Control DMSO T vs. 50 uM T	-0.3976	-1.186 to 0.3911	No	
52	Control DMSO T vs. 100 uM T	-0.2184	-0.9306 to 0.4938	No	
53	25 uM T vs. 50 uM T	-0.7174	-1.546 to 0.1118	No	
54	25 uM T vs. 100 uM T	-0.5381	-1.295 to 0.2185	No	
55	50 uM T vs. 100 uM T	0.1792	-0.5734 to 0.9319	No	

#### VIII.4 ANEXO 4: Propuestas de artículos:

##### **A4. 1 Propuesta 1: Compuestos volátiles determinados para dos malezas abundantes en México.**

##### **Identification of volatile secondary metabolites in fresh leaves of *Ricinus communis* L. and *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. by solid phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS)**

Valeria Ortega Mendoza<sup>1</sup>, Maria Isabel Aguilar Laurents<sup>2</sup>, Blas Lotina-Hennsen<sup>1</sup>, Martha Juana Martínez Gordillo<sup>4</sup>, Georgina Duarte Lisci<sup>3</sup> and Beatriz King-Díaz<sup>1\*</sup>

Departments of Biochemistry<sup>1</sup>, Pharmacy<sup>2</sup> and Unity of Services for the Attention of Investigation (USAI)<sup>3</sup>, Faculty of Chemistry, and Herbarium of Faculty of Sciences<sup>4</sup>, Autonomous National University of Mexico, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 D. F., México.

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:  
kingbeat@unam.mx;

Tel.: +55-5622-5294.

## Abstract

The volatile organic compounds or VOCs are produced by the plants and may provide information to obtain the protective service from putatively mutualistic carnivores. In this work the VOCs were identified from the fresh leaves of *Ricinus communis* L. and *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br., two weed plants growing in Mexico City, by solid phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The founded compounds were compared against the reported compounds of essential oils in those plants. Compounds with simple structures with low molecular mass (40-275 g/mol) (carboxylic acids, aldehydes and alcohols mainly) were obtained in *R. communis* L. by SPME-GC/MS, being the main constituents found 3-Hexen-1-ol (42.65 %), *trans*-2-Hexenal (21.57 %), 1-Hexen-3-ol (16.46 %) and Ethanol, 2-butoxy (4.43 %). *Trans*-2-Hexenal was the only one which has been reported in essential oil of this plant. Otherwise, the main compounds founded in *L. nepetifolia* (L.) R. Br. were Hexane. 3-methoxy (34.85 %), 3-Octanone (38.58 %), Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1á,7á,8aá)]- (7.07 %) and 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (6.32 %). 3-Octanone and Copaene were the compounds which, also, have been reported in essential oil of this plant. For the first time, were identified compounds in fresh leaves of two weeds that have been reported in essential oils.

Key words: *Ricinus communis*, *Leonotis nepetifolia*, HS-SPME-GC-MS, VOCs, secondary metabolites.

## **Introduction**

### **Volatile organic compounds VOCs**

A large number of studies have provided evidence of the “talking trees” phenomena in different plants as *Arabidopsis*, alder, maize, tobacco and bean [21].

The volatile organic compound or VOCs are responsible of these phenomena, they are produced by the plants and may provide information, food or housing to obtain the protective service from putatively mutualistic carnivores. Some VOCs are induced in response to herbivores [22].

The intra-plant and the inter-plant interactions are mediated by volatiles in nature for defense/priming responses in neighboring plants. Some of the VOCs serve as allelochemicals and inhibit the germination, growth and development of grasses nearby, through the air and soil for example E-2-Hexenal and camphor [21].

### ***Ricinus communis* L.**

Castor bean plant (*Ricinus communis* L.) or wonder tree belongs to the family of Euphorbiaceae and is cultivated in many countries as an ornamental annual plant in gardens. The plant is native to tropical Africa. In México this plant is invasive and growth wild in abandoned land in the Tehuacan region of Puebla, in Guerrero State and in Mexico City. This plant, which is called “higuerilla” by the local people in Mexico City has been used as a repellent against insects and for herbal medicine to cure some diseases [1], it has various activities as antioxidant, anti-diabetic, anti-inflammatory, antitumor, analgesic, larvicidal, anti-conceptive, anti-asthmatic and it have some toxic compounds [1,2,3]. Previous chemical investigation on *R. communis* L. led to the isolation of sterols



[3], alkaloids [5] [6], diterpenoids [7], coumarin, and flavonoids [5] [8] and by hydrodistillation from the aerial parts essential oils were obtained different compounds were identified as  $\alpha$ -thujone, 1, 8-cineole,  $\alpha$ -pinene, camphor and camphene [9].

### ***Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br.**

Klip dagga or lion's ear plant (*Leonotis nepetifolia*) is a species in the Lamiaceae (mint) family. The plant is a robust annual herb, about 1-2 m tall, inflorescence globose whorled at upper nodes with orange flowers. Two varieties were identified as var. *nepetifolia* (with long orange hairs on corolla) and variety *africana* (hairs usually pale yellow colored). The plant is found in waste places and around villages, is considered as a weed of waste lands and cultivated areas and it is used in the treatment of kidney diseases, dysmenorrhea, diarrhea, asthma, rheumatism, rickets, headaches, for the treatment of wounds, hysterical convulsion and epilepsy. The leaves are brewed as a tea for fever, cough, womb prolapsed and malaria; also the methanol extract is suitable for the extraction of antioxidant compound and it can reduce the cell viability upon 50 % at very low concentration (anti-cancer activity); a variety of biological activities including antispasmodic, antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antioxidative, antiasthmatic and others have been reported for the crude extracts or pure compounds from this plant [15, 16, 17, 19]. In Mexico, the name 'mota' is given for this plant which suggest its use as a marijuana substitute [18]. Different compounds were identified on *L. nepetifolia*. as spiroabdanes [18], alkaloids, iridoid glycosides, diterpenoids, flavonoids, tannins, vitamin A [19] and volatile oil [19, 20] and by hydrodistillation from the aerial parts essential oils were obtained other compounds [20].

In the present study for first time, volatile secondary metabolites were identified from the fresh leaves of *R. communis* L. and *L. nepetifolia* with the combination of complementary analytical techniques as solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), and were compared against the compounds previously reported.

## **Experimental**

### ***Biological material***

*Ricinus communis* L. and *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br., plants were collected in Mexico City in August 2014 with the permission of the REPSA (Reserve of San Angel's Pedregal). They were identified by Dr Martha Juana Martínez Gordillo, and a *R. communis* L. specimen (voucher No. 131501) was deposited in the Herbarium of the Sciences Faculty of Autonomous National University of Mexico.

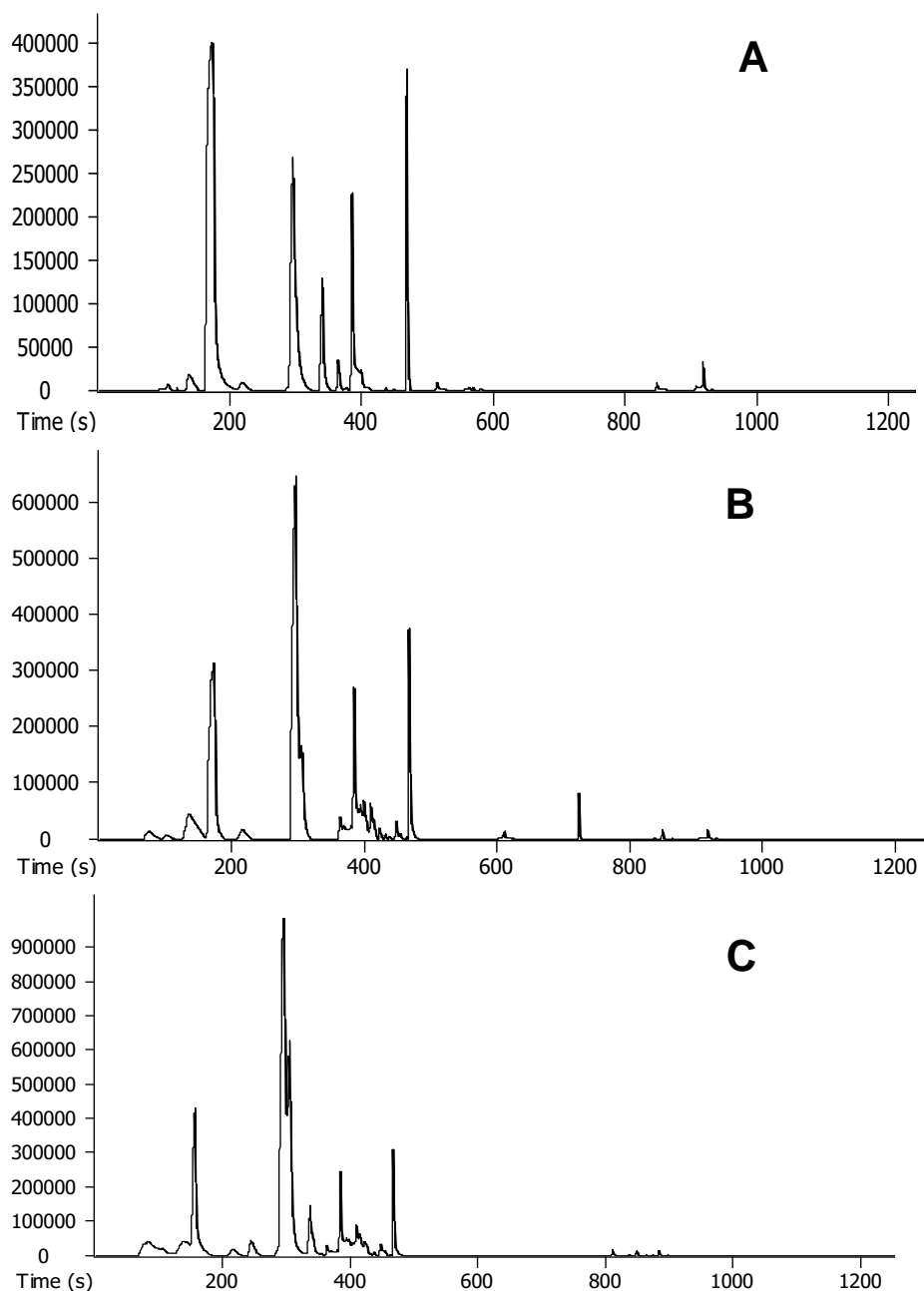
### ***Extraction of volatile organic compounds***

Volatile organic compounds were extracted by the manual SPME holder using a gray fiber 50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS Stable-Flex purchase from Supelco Inc. (USA). 600 mg of leaves of *R. communis* L. or of *L. nepetifolia* were collected in 10 mL of tube hermetically sealed with Septa PTEE-silicon; 2 mL of deionised water and 500 mg of sodium chloride were added to extract the compounds. The fiber was exposed in the headspace (HS) of the tube with leaves at different times and temperatures and it was used the optimal temperature to obtain the minimal background (45 °C and 40 min for *R. communis* L. and 25 °C and 10 min for *L. nepetifolia*). The best results were analyzed two more times.

### ***HS-SPME-GC-MS analyses***

The volatile compounds were determined by gas chromatography (GC) Agilent 6890N coupled to a mass spectrophotometer (MS) Leco Pegasus 40. The separation of volatile compounds was achieved with a 10 m X 0.18 mm column, 0.18 µm film thickness (5 % of phenyl methyl silicon DB5) with the following temperature program. The start temperature of 40 °C was held for 3 min, followed by a rate of 20 °C / min to 300 °C. The injector port temperature was 300 °C. After 1 min of using splitless mode, the split was set to 1 mL / min (carrier helium 5.0). The transfer line temperature was 250 °C, resulting in an ion source temperature of 200 °C; electron impact ionization was used and mass spectra were recorded with a scan range of 33-500 amu. Retention

indices of the sample compounds were calculated on the basis of homologous *n*-alkane hydrocarbons analyzed under identical GC-MS conditions (library of reference compounds). This method was already successfully applied to the analysis of volatiles [10, 11, 12].



**Figure1.** Gas chromatography (GC) of volatile compounds from *R. communis* L. leaves. GC chromatograms obtained of HS-SPME-GC-MS technique with (A) 15 min, (B) 30 min and (C) 45 min of fiber exposure at 45 °C.

## Results and discussion

VOCs of *R. communis* L. leaves were analyzed for the first time by using HS-SPME-GC-MS and were identified. The results of the measurements are shown in Table 1.

Compounds found in the *R. communis* L. leaves have simple structures (carboxylic acids, aldehydes and alcohols mainly) with low molecular mass compounds (40-275 g/mol), according to the type of fiber used, in this assay.

In previous studies of essential oils from *R. communis* L. leaves were reported different volatile compounds (Table 2) but just two of them (hexenal and *trans*-2-Hexenal) were found in the *R. communis* L. leaves. The compounds in the *L. nepetifolia* (L.) R. Br., leaves had low molecular mass (116–204 g/mol), Table 2. The reported VOCs were finally compared against those were founded and three are similar (3-Octanone, Copaene and Caryophyllene).

In previous reports some VOCs were obtained employing hydrodistillation technique, which concentrate by heat treatment [9, 13, 14], and the major volatile were obtained with SPME technique [10], this technique used in this study too, offers high sensitivity and it is non-invasive, whereby the integrity of the compounds is assured. In this way, we suggest that the difference in the found compounds can be due to the compounds already reports were obtained from the essential oils obtained from the leaves and our volatiles metabolites were obtained from the freshly harvested leaves.

**Table 1. Comparison between the compounds founded in fresh leaves and in essential oil of *Ricinus communis* L.**

NI: No indicated SD: Standard Deviation RI: Retention Index HD: Hydrodistillation technique SPME: Solid Phase MicroExtraction

Compound	Area (% ± SD)	RI experimental	Similarity	Compound	RI theoric	Area <sup>theoric</sup> (%)	Method <sup>1</sup>	Reference
Dimethyl sulfide	2.36 ± 0.17	81.54	608	Acetic acid	600	2.3	Essential oils with SPME	10
Furan, 2-ethyl	2.60 ± 2.21	147.24	684	Propanoic acid	680	<0.5	Essential oils with SPME	10
Hexenal	17.87 ± 6.80	296.04	799	Hexenal	801	12.08	Essential oils with SPME	10
<i>trans</i> -2-Hexenal	17.87 ± 6.80	296.04	858	<i>trans</i> -2-Hexenal	848	<0.5	Essential oils with SPME	10
3-Hexen-1-ol	35.34 ± 6.80	304.09	868	NI	NI	NI	NI	NI
1-Hexen-3-ol	13.63 ± 6.80	307.55	872	NI	NI	NI	NI	NI
Ethanol, 2-butoxy	3.67 ± 3.81	334.09	904	Heptanal	901	16.13	Essential oils with SPME	10
<i>cis</i> -3-Hexenoic acid, methyl ester	2.67 ± 2.42	351.94	930	α-Pinene	934	8.63	HD and SPME	9, 10, 13, 14
<i>trans, trans</i> -2,4-Heptadienal	2.96 ± 1.98	404.94	994	Hexanoic acid	986	<0.5	Essential oils with SPME	10
Benzeneacetaldehyde	0.98 ± 0.76	424.79	1049	1,8-Cineole	1044	30.98	HD and SPME	9, 10, 13, 14

**Table 2. Comparison between the compounds founded in fresh leaves and in essential oil of *Leonotis nepetifolia* (L.) R.**

**Br.**

**NI:** No indicated **SD:** Standard Deviation **RI:** Retention Index **HD:** Hydrodistillation technique **CG:** Gas Chromatography **CG/MS:** Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry

Compound	Area (% ± SD)	RI <sub>experimental</sub>	Similarity	Compound reported	RI <sub>theoric</sub>	Area (%)	Method <sup>1</sup>	Reference
Hexane, 3-methoxy-	34.85 ± 18.41	223.25	871	NI	NI	NI	NI	NI
3-Octanone	38.58 ± 16.11	394.55	909	3-octanone		0.2	HD and CG, CG/MS	20
3-Octanol	4.30 ± 4.46	408.95	770	NI	NI	NI	NI	NI
1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-	1.84 ± 0.63	435.7	921	NI	NI	NI	NI	NI
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	6.32 ± 6.06	460.91	932	NI	NI	NI	NI	NI
1,3-Cyclohexadiene, 1,2,6,6-tetramethyl-	0.48 ± 0.13	508.01	910	NI	NI	NI	NI	NI
1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-	0.75 ± 0.31	576.86	890	NI	NI	NI	NI	NI
Copaene	1.28 ± 0.24	587.16	900	alfa y beta-copaene	NI	4.0	HD and CG, CG/MS	20
Cyclobuta[1,2:3,4]dicyclopentene, decahydro-3a-methyl-6-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1à,3aà,3bà,6aà,6bà)]-	1.15 ± 0.33	593.71	729	NI	NI	NI	NI	NI
Caryophyllene	1.55 ± 0.98	606.26	923	beta-caryophyllene		20.6	HD and CG, CG/MS	20
1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-	1.84 ± 0.66	617.77	895	NI	NI	NI	NI	NI
Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1à,7à,8aà)]-	7.07 ± 4.94	639.6	934	NI	NI	NI	NI	NI

**Table 3. Another volatile compounds reported from *Ricinus communis* L.**

RI: Retention index NI: No indicated

Identified compound	[CAS number]	RI	Area (%)	Reference
Acetic acid	[69-19-7]	600	2.3	10
Propanoic acid	[79-09-4]	680	<0.5	10
Octane	[111-65-9]	800	2.98	10
Hexenal	[66-25-1]	801	12.08	10
Furfural	[98-01-1]	815	<0.5	10
<i>trans</i> -2-Hexenal	[505-57-7]	848	<0.5	10
Valeric acid	[109-52-4]	893	0.51	10
2-Heptanone	[110-43-0]	893	<0.5	10
Styrene	[100-42-5]	893	2.63	10
2-Propenoic acid butylester	[141-32-2]	898	1.2	10
Nonane	[111-84-2]	900	<0.5	10
$\gamma$ -Butyrolactone	[96-48-0]	900	<0.5	10
Heptanal	[111-71-7]	901	16.13	10
$\alpha$ -Pinene	[80-56-8]	934	8.63	9, 10, 13, 14
		932	16.88	
		NI	13.1	
<i>trans</i> -2-Heptenal	[18829-55-5]	956	1.96	10
Benzaldehyde	[100-52-7]	962	<0.5	10
$\beta$ -Pinene	[127-91-3]	982	0.6	10
Hexanoic acid	[142-62-1]	986	<0.5	10
<i>p</i> -Cymene	[99-87-6]	1029	<0.5	10
Limonene	[138-86-3]	1031	1.53	10
1,8-Cineole	[470-82-6]	1037	9.18	9, 10, 13, 14
		1044	30.98	
		NI	65.2	
Benzylalcohol	[100-51-6]	1039	<0.5	10
2-Hexylfuran	[3777-70-6]	1074	1.17	10
Camphene	[79-92-5]	948	7.48	9, 14
$\alpha$ -thujone	[546-80-5]	1131	31.71	9, 14
Camphor	[464-49-3]	1174	12.92	9, 13, 14
		NI	15.8	
$\beta$ -Caryophyllene	[87-44-5]	NI	5.6	13

**Table 4. Other volatile compounds reported from *Leonotis nepetifolia* (L.) R.**

**Br.**

<b>Compound</b>	<b>Area (%)</b>	<b>Reference</b>
octene	6.9	20
alfa-thujene	0.3	20
benzaldehyde	0.1	20
alfa-pinene	0.6	20
heptanol	0.9	20
1-octen-3-ol	1.8	20
3-octanone	0.2	20
sabinene	0.2	20
beta-pinene	0.1	20
myrcene	0.6	20
1, 8-cineole	0.2	20
(Z)-beta-ocimene	4.9	20
(E)-beta-ocimene	1.5	20
linalool	0.9	20
verbanol	0.8	20
eugenol	0.3	20
(E)-beta-damascenone	0.4	20
alfa-copaene	3.4	20
beta-bourbonene	1.2	20
beta-elemene	4	20
beta-caryophyllene	20.6	20
beta-copaene	0.6	20
alfa-humulene	12.1	20
germacrene D	8.6	20
bicyclogermacrene	2.9	20



delta-cadinene	1.9	20
caryophyllene oxide	7.5	20
humulene oxide	4.5	20
11, 1(10), 5(6)-germacradienol	0.8	20

## Conclusion

By first time, were identified compounds in fresh leaves of two weeds (*Ricinus communis* L. and *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br.) that have been reported in essential oils. Ten volatile compounds were identified for the first time from leaves *R. communis* L., by SPME technique being the main constituents found 3-Hexen-1-ol (26.72 %), *trans*-2-Hexenal (12.23 %), 1-Hexen-3-ol (8.66 %), Ethanol, 2-butoxy (4.95 %) and Hexenal (4.18 %). And for *L. nepetifolia* (L.) R. Br., the main constituents were Hexane, 3-methoxy- (34.85 %), 3-Octanone (38.58 %), Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1à,7à,8aà)]- (7.07 %), 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (6.32 %) and 3-Octanol (4.30 %).

## References

- [1] CONABIO, Heike Vibrans (ed.), 2009. Malezas de México. Ficha *Ricinus communis* L., Latter access: February 6, 2015.
- [2] Manpreet *et al.*, 2009. *Ricinus communis* L. Review. International Journal of PharmTech Research 4:4 1706-1711.
- [3] Qin-Gang *et al.*, 2009. Three terpenoids and a Tocopherol-Related Compound from *Ricinus communis* L. *Verlag Helvetica ChimicaActa* AG 92 2762-2768.).
- [4] X. Zhang, F. Han, P. Gao, D. Yu, S. Liu, 2007. Bioassay-guided fractionation of antifertility components of castorbean (*Ricinus communis* L.) seed extracts *Nat. Prod. Res.* 21, 982.

- [5] S. S. Kang, G. A. Cordell, D. D. Soejarto, H. H. S. Fong, 1985 Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*, *J. Nat. Prod.* 48, 155.
- [6] A. C. Leite, E. C. Cabral, D. A. P. dos Santos, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, M. F. das G. F. da Silva, 2005 Isolation of the alkaloid ricinine from the leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) through counter-current chromatography *Quim. Nova*, 28, 983.
- [7] D. Sitton, C. A. West, 1975. Casbene: an anti-fungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. *Phytochemistry*.
- [8] S. M. Khafagy, Z. F. Mahmoud, N. A. E. Salam, 1979 [Coumarins and Flavonoids of Ricinus communis Growing in Egypt](#). *Planta Med.* 37, 191.
- [9] Zarai Z, Chobba I.B., Mansour R.B., Békir A., Gharsallah N., Kadri A., 2012 Essential oil of the leaves of *Ricinus communis* L.: *In vitro* cytotoxicity and antimicrobial properties. *Lipids in Health and Disease* 11: 102-109.
- [10] Krist, Sabine *et al.*, 2008. Volatile compounds and triacylglycerol composition of original Indian fatty plant oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 127-140.
- [11] Vas, György *et al.*, 2004. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrum.* 39: 233-254.
- [12] Cuevas-Glory, L. F. *et al.*, 2008. Solid-phase micro extraction method development for headspace analysis of volatile compounds in honeys from Yucatan. *Téc. Pecu Méx* 46 (4): 387-395.
- [13] Stephanie Darmanin, Pierre Schembri Wismayer, Marie Therese Camilleri Podesta, Mark J. Micallef & Joseph A. Buhagiar, 2009. An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-

MEL-28 human melanoma cells. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 23:6, 561-571.

[14] Kadri *et al.*, 2011. Chemical composition and in vitro antioxidant properties of essential oil of *Ricinus communis* L. *J. Med. Plant. Res.* 5 (8): 1466-1470.

[15] Usharani Veerabadran *et al.*, 2013. Evaluation of antioxidant potential of leaves of *Leonotis nepetifolia* and its inhibitory effect on MCF7 and Hep2 cancer cell lines. *Asian Pac J Trop Dis* 3 (2): 103-110.

[16] Ayanwuyi *et al.*, 2009. Studies on anticonvulsant activity of methanol capitulum extract of *Leonotis nepetifolia* Linn. *Nig. Journ. Pharm. Sci.* 8 (1): 73-79.

[17] Reshmi Pushpan, K Nishteswar, Harshitha Kumari, 2012. Ethno medicinal claims of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. BR: A review. *Int. J Res. Ayur. Pharm.* 3 (6):783-785.

[18] Jun Li *et al.*, 2012. Bis-spirolabdane diterpenoids from *Leonotis nepetaefolia*. *J Nat Prod* 75, 728-734.

[19] Rupesh Pingale *et al.*, 2013. A review on ethnopharmacology, phytochemistry and bioactivity of *Leonotis Nepetifolia*. *Int J PharmTech Res* 5 (3): 1161-1164.

[20] Adebota O. Oyedeji, Olusegun Ekundayo & Wilfried A. König, 1999. Constituents of the Essential Oil from the leaves of *Leonotis nepetaefolia* (L.) Ait. f., *Journal of Essential Oil Research*, 11:6, 716-718.

[21] G.-i. Arimura *et al.*, 2010. Acquired immunity to herbivores and allelopathy caused by airborne plant emissions. *Phytochemistry* 71 1642-1649.

[22] Heil, Martin, 2007. Indirect defense via tritrophic interactions. *New Phytologist*. 41-61.

**A4. 2 Propuesta 2: Actividad herbicida de la capsantina aislada de *Ricinus communis* L. y de *Capsicum annuum* L.**

**Carotenoid isolated from *Ricinus communis* L. and *Capsicum annuum* plants affect growth and the light reaction of photosynthesis.**

By Valeria Ortega Mendoza, Maria Isabel Aguilar Laurents, Blas Lotina-Hennsen and Beatriz King-Díaz

Departments of Biochemistry and Pharmacy, Faculty of Chemistry, Autonomous National University of Mexico, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 D. F., México.

## Abstract

A bioactivity-guided chemical study of aerial parts of *Ricinus communis* and dried and pulverized pods of *Capsicum annum* led to the isolation of the carotenoid capsanthin from the chloroform-methanol extract and hexane-acetone extract, respectively. This compound was separated by preparative thin layer chromatography and was an active compound on ATP synthesis inhibition ( $I_{50}$  value was 7.5  $\mu\text{M}$ ), on photosynthetic electron transport (basal  $I_{50}$  = 49.7  $\mu\text{M}$ , phosphorylating  $I_{50}$  = 49.7  $\mu\text{M}$  and uncoupled  $I_{50}$  = 17  $\mu\text{M}$ ), and on Chlorophyll *a* fluorescence. Furthermore capsanthin acts as pre- and post-emergence plant growth inhibitor. In pre-emergence it displays wild-spectrum weed control, inhibiting germination of dicotyledonous (*Lactuca sativa*, by 20 %) seeds and also inhibited seedling growth. Capsanthin acts as a post-emergence plant growth inhibitor by reducing dry plant biomass for *L. sativa*, 18 days after its application: by 13% at 171.23  $\mu\text{M}$  and at the same concentration with three more aspersions, by 12% at 342.46  $\mu\text{M}$  with methyl cyclodextrin and by 25 % at 342.46  $\mu\text{M}$  with beta cyclodextrin. Therefore, we suggest that capsanthin will be a good biodegradable herbicide for weed control. Capsanthin also behave as a Hill reaction inhibitor, since inhibited the basal, phosphorylating and uncoupled electron flow from water to methyl viologen (MV); act as Hill reaction inhibitor, and his inhibition site is on photosystem II.

## Introduction

By a bioactivity-guided chemical study of the chloroform-methanol extract of in *Ricinus communis* L. leaves and shoots, capsanthine was been found for the first time and it was also founded in the hexane-acetone extract previously reported in *Capsicum annuum* pods [1]. Antifungal and anti-mutagenic activities of these compounds have also been reported. However, to our knowledge, the effect on photosynthesis of the chemical constituents of *Ricinus communis* has not been reported, also herbicidal activity has not been studied. In this paper, we report the effect of a carotenoid (capsanthine) on different photosynthetic activities at increasing concentrations from 0 to 300  $\mu\text{M}$  measured with polarographic techniques and fluorescence induction curves of chlorophyll *a* of photosystem II (PSII). As well as, they effect on germination and growth of two monocotyledonous and two dicotyledonous plants used as target, and also sprayed to leaves of the target plants. Measurements of changes to the chlorophyll fluorescence induction curve (Kautsky curve) have been used in photosynthesis research, and they can be used for the study of the effect of PSII-inhibiting compound [9,10]. Generally, fluorescence yield is highest when photochemistry and heat dissipation are lowest. Therefore, changes in the fluorescence yield reflect changes in photochemical efficiency and heat dissipation[11]. Chlorophyll *a* fluorescence is an intrinsic evidence of the photosynthetic system. The fluorescence transients, exhibited by photosynthetic organisms under different conditions, can be analyzed to provide detailed information about the structure, conformation and function of the photosynthetic apparatus and specially of photosystem II, by the analysis of the fast polyphasic fluorescence Kinetics O, J, I, P labeled as “JIP test” [12,13]. To know the site of action of the *Ricinus communis* secondary metabolites we discuss its effect on the J-I phase.

## Materials and Methodos

**Tested Material.** Aerial parts of *R. cumminis* were collected in D. F., Mexico, in 2012 (by Valeria, collection no. R1253), and a voucher specimen was deposited at the Biology Institute-Herbarium, UNAM, no. 95711. The air-dried leaves (500 g) were powdered and extracted exhaustively by maceration at room temperature with chloroform-methanol extract. The solvent was evaporated *in vacuum* to give a crude extract (15 g) that inhibited

ATP synthesis (**Figure 1**). The  $I_{50}$  value was 42 ppm. This extract was fractionated via column chromatography on silica gel (0.0063-0.200 mm) and eluted with a mixture of hexane-EtOAc with polarity ascendant gradient. From fractions eluted with hexane-EtOAc 80:20, capsanthin was spontaneously crystallized (20 mg). This compound was separated by repeated runs in preparative thin-layer chromatography (hexane-ethyl acetate 80:20 v/v), and their structures were confirmed by comparison of their physical (melting points) and spectroscopic properties (UV,  $^1\text{H}$ NMR,  $^{13}\text{C}$ NMR, HMQC, HMBC, and NOESY data) with those previously published (**14**). For the isolation of the same compound, the Patent No. US20120321730 was used and from the Dissolved Extract was confirmed his identity by comparison of their chemical (carotenoids color reaction) and spectroscopic properties.

**Seedling plant material.** The seeds of three plant species: tomato (*Physalis ixocarpa*), lettuce (*L. sativa*), *T. aestivum* and grass (*Lolium perenne*) were washed with a 10% sodium hypochlorite solution for 15 min in an orbital shaker. After this time the hypochlorite was removed and the seeds were rinsed three times with deionized water. 200 Seeds *L. perenne* were placed in 12 cm diameter pots containing a mixture of 50:25:25 v/v soil/peat-moss/agrolita. All pots were watered every third day and maintained in green house, at room temperature (25 - 30) °C and with a normal day/night (12/12h) illumination. After 15 days of emergence for tomato and grass and 20 days for clover, the plants were selected by uniformity. Plants of similar size were divided into three groups: the control, the experimental, and the positive control (50  $\mu\text{M}$  of DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)) and were sprayed manually with the compound at different concentrations. After 24, 48 y 72 h were kept in the dark for 1 h and then fluorescence Chl *a* were measured with a fluorometer Hansatech Model Handy PEA (Plant Efficiency Analyser). The compound was sprayed 3 times at 200  $\mu\text{M}$  and fluorescence was measured.

**Dry biomass.** After 15 days of treatment with the compounds, all plants were harvested at ground level and dried in an oven at 65 °C to reach constant weight. Then the dry mass was determined employing an analytical balance OHAUS model AP210-0 [17].

**Chlorophyll *a* fluorescence determination in intact leaves *in vivo*.** The chlorophyll *a* (Chl *a*) fluorescence determination was performed at 24, 48 and 72 h after treatment of plants; they were dark adapted for 30 min and the leaves were excited by saturating light from an array of three light-emitting diodes delivering 3000  $\mu\text{mol}$  of photons  $\text{ms}^{-1}$  of red

light (peak at 650 nm). Chlorophyll *a* fluorescence induction curves were measured at room temperature with a Fluorescence Hansatech apparatus Handy PEA (plant efficient analyzer). Induction curves were processed according to the concept and the equations of the JIP-test [18] and plotted with the program Biolyzer which executes the JIP test equations[19].

**Seed Germination Bioassays.** *Physalis ixocarpa*, *Lactuca sativa*, *Triticum aestivum* and *Lolium perenne* seeds were purchased from Semillas Berentsen S. A. de C. V. (Celaya, Guanajuato, Mexico). For these experiments the seeds were selected for uniformity, the damaged ones were discarded, and 50 seeds of *L. sativa*, *T. aestivum* and grass *Lolium perenne* and 20 seeds of *T. vulgare* were placed on filter paper (Whatman No. 1) in Petri dishes (85 mm diameter). The number of seeds was selected in accord to their size. In three replicate experiments, the paper was wetted with 10 mL of de-ionized water or test solution (the compound xxxx was dissolved in MeOH, the concentration of MeOH was less than 1% and paraquat was dissolved in deionized water). The dishes were wrapped with Parafilm and incubated at 28 °C in the dark and percentages of germination and root lengths were obtained after five days for *P. ixocarpa*, *L. sativa*, *T. aestivum* , and *L. perene*. The number of germinated seeds was determined according to the criteria of 1 mm extrusion of the root. Root and shoot length were measured for all seeds germinated. Statistical differences between the treatments were evaluated by the Student's t-test for assessing the statistical significance of the difference between two sample means. Control seed dishes contained the same amount of seeds, volume of water, and methanol (less than 1%) as the test solutions.

### **Seed Respiration**

**Chloroplasts Isolation and Chlorophyll Determination.** Intact chloroplasts were isolated from market spinach leaves (*Spinaceae oleraceae* L.) as previously published (12, 13) and suspended in a medium that contained 400 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, and 30 mM Tricine-KOH (pH 8.0). They were stored as concentrated suspensions in the dark while used at 4 C. The chlorophyll (Chl) concentration was measured according to Strain et al. (14).



**Determination of ATP Synthesis.** ATP synthesis was determined titrimetrically using a microelectrode Orion model 8103 Ross connected to a Corning potentiometer model 12 with expanded scale as reported by Dilley (15). The ATP synthesis reaction medium contained 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM KCN, 1 mM Tricine-KOH (pH 8.0), 50 μM methyl viologen (MV) as an exogenous electron acceptor in the presence of 1 mM ADP, and 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The reaction was started by turning on the light in the presence of chloroplasts (20 μg of Chl/ mL). Light-induced non-cyclic electron transport rate from water to MV was determined by using a Clark type electrode connected to YSI (Yellow Spring Instrument) model 530 oxygen monitor. The basal electron transport rate from water to MV was determined by illuminating chloroplasts (20 μg of Chl/ mL) during 1 min in the basal electron transport medium as previously published (16, 17). The basal electron transport medium was similar to the ATP synthesis medium except that 1 mM tricine was changed by 15 mM, and both 1 mM ATP and 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> were excluded. The phosphorylating non-cyclic electron transport rate from water to MV was measured as basal non-cyclic electron transport, but in this case, 1 mM ATP and 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> were added. Uncoupled non-cyclic electron transport from water to MV was tested with the basal electron transport medium, and 6 mM NH<sub>4</sub>Cl was used as uncoupler.

**Uncoupled PSII and Photosystem I (PSI) Electron Flow.** The uncoupled PSII and PSI electron flows were performed as uncoupled electron transport assays. PSII was measured from water to the reduction of DCPIP (dichlorophenol indophenol)-supported O<sub>2</sub> evolution. To Perform this, 1 μM DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-*p*- benzoquinone), 100 μM DCPIP, 500 μM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], and 6 mM NH<sub>4</sub>Cl were added; MV was omitted (13, 16).

**Uncoupled PSII partial reaction from H<sub>2</sub>O to SiMo** (sodium silicomolybdate) was determined as in PSII except that 1 μM DBMIB, 100 μM DCPIP, and 500 μM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], were omitted, and 200 μM SiMo and 10 μM DCMU [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] were added (17).

**The uncoupled PSII partial electron transport rate from DPC (diphenyl carbazide) to DCPIP /K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>],** was measured as the oxidized DCPIP reduction rate with a spectrophotometer Beckman DU 650 and determined in thylakoids previously treated with 0.8 M Tris (pH 8.0) and incubated for 30 min at 4 °C (18). The uncoupled PSI electron

transport rate was determined as oxygen consumption in a similar form to noncyclic basal electron transport rate with 10  $\mu\text{M}$  DCMU, 100  $\mu\text{M}$  DCPIP reduced with 300  $\mu\text{M}$  ascorbate, 50  $\mu\text{M}$  MMV, and 6  $\text{mM}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ , which were used in the medium (19). The  $I_{50}$  value for each activity is the concentration of the compound producing 50% inhibition. Stock solution for the compound was prepared with DMSO (dimethylsulfoxide). The DMSO concentrations were less than 2 %.

**Chlorophyll a Fluorescence of PSII in isolated chloroplasts.** Chlorophyll *a* fluorescence induction curves were measured at room temperature with a Hansatech Handy PEA (Plant Efficient Analyzer) as previously described by Strasser et al. (7) and King-Díaz et al., (20). The maximum fluorescence yield from the sample was generated using three light-emitting diodes (broad band 650 nm). The pulse duration was 1 s. The reaction medium used was as the one employed in basal noncyclic electron transport measurements. To monitor Chl *a* fluorescence transients, aliquots of dark-adapted thylakoids containing 20  $\mu\text{g}$  of Chl were transferred to filter paper by gravity with a dot-blot apparatus (Bio-Rad, United States) to ensure a homogeneous and reproducible distribution of thylakoids in the filter paper and dipped immediately in 3 mL of medium with different concentrations of the tested compound.

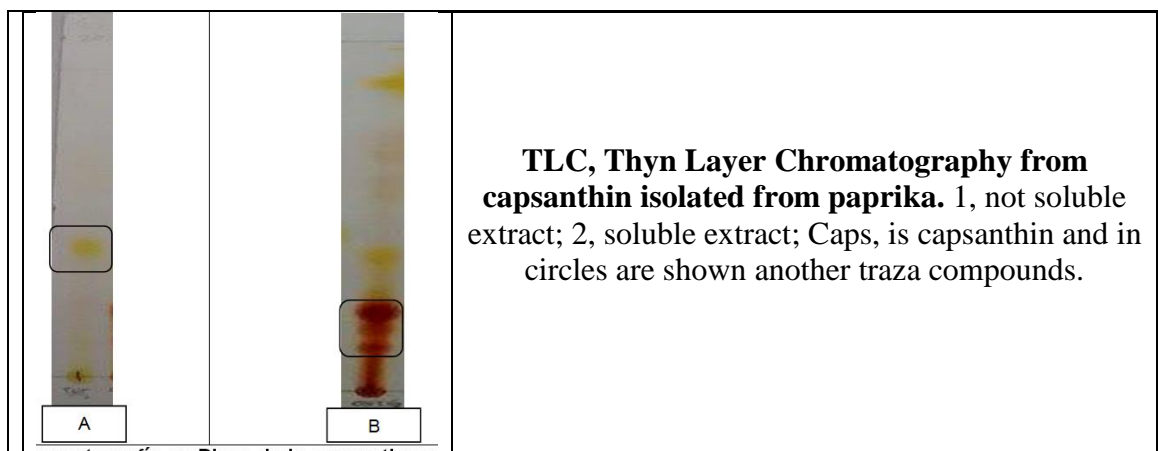
## RESULTS AND DISCUSSION

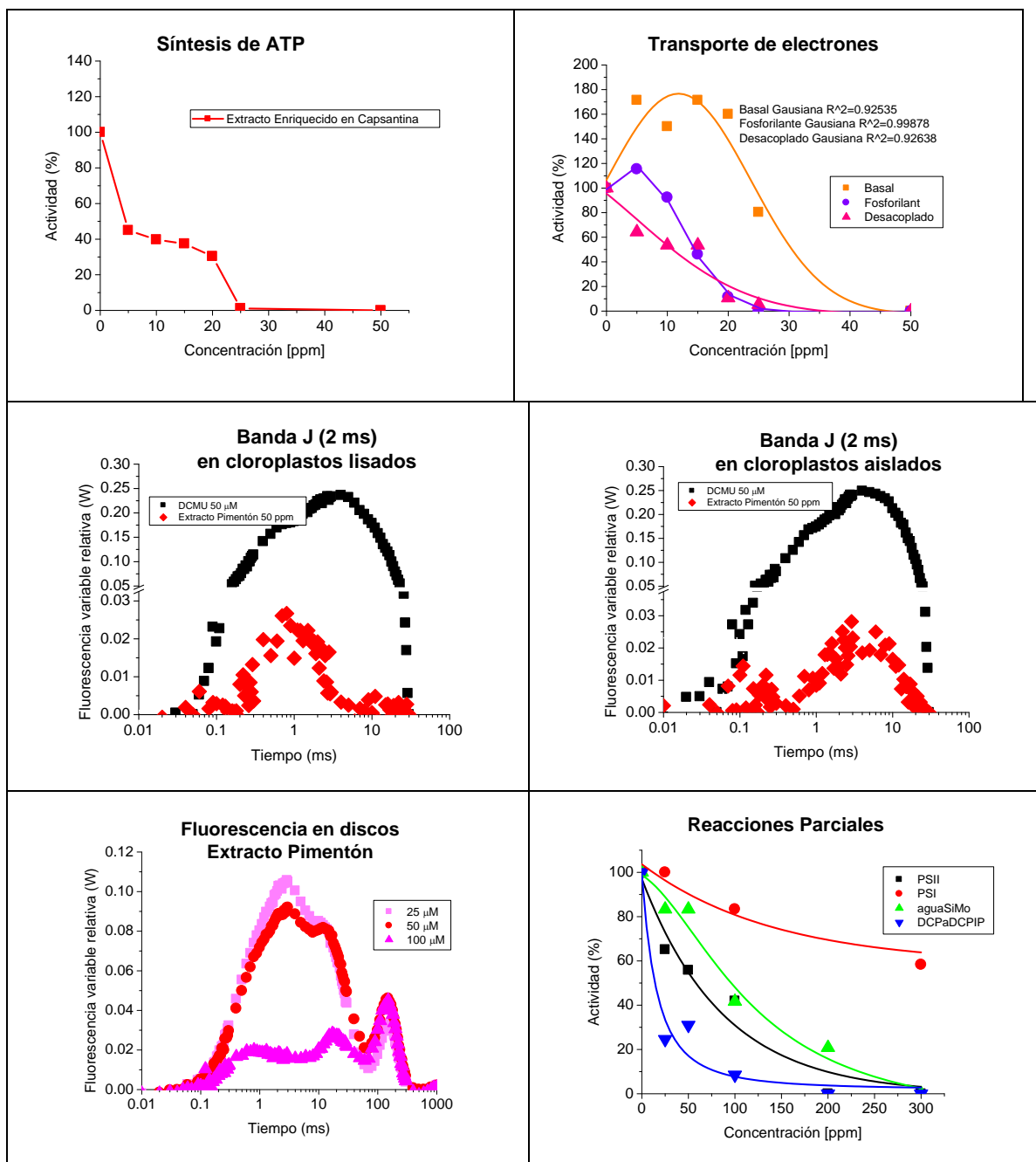
**Isolation of compound from chloroform-methanol leaves extract of *Ricinus communis*** plants. The chloroform-methanol extract from the aerial parts of *Ricinus communis* displayed inhibitory activity on basal, phosphorylating and uncoupled electron transport from water to MV (**Figure 2**). To know the compound responsible for this inhibitory activity, the chloroform-methanol extract was fractionated by column chromatography; then by thin-layer chromatography, the compound was isolated and characterized as the carotenoid capsanthin (**Figure 2**) as described in the Materials and Methods (45 and 30% of efficiency, respectively).

**Effect of capsanthin on different light reaction of photosynthesis.** The effect of the carotenoid on ATP synthesis coupled to electron transport from water to MV on freshly lysed intact spinach chloroplasts was determinate and the  $I_{50}$  value was 51  $\mu\text{M}$ . The light-

dependent photophosphorylation is coupled to electron transport. Thus, ATP formation can be inhibited by either blockage of the electron transport, by direct inhibition of the H<sup>+</sup>-ATPase, or by uncoupling of the ATP synthesis process from the electron transport (21). To elucidate the mechanism of action of capsanthin on photosynthesis, its effect on non-cyclic electron transport from water to MV (basal, phosphorylating, and uncoupled) was investigated. This compound inhibited basal, phosphorylating, and uncoupled electron transport in different degrees as concentrations of increases up to 300μM; phosphorylating and uncoupled electron transport rates were the most inhibited; their values were 30 and 76 μM, respectively. However, basal electron transport rate from water to MV was less inhibited, and these results suggest that during phosphorylating and uncoupled electron transport rates on thylakoids, suggest the target of capsanthin is exposed by conformational changes during illumination. Furthermore, in basal conditions, the target on the electron transport chain of thylakoids is buried for the compound.

**Localization of capsanthin interaction sites on PSII, PSI, and partial reactions.** To localize the site of inhibition on thylakoid electron transport chain, the effect of capsanthin on PSII, PSI, and the partial reactions were tested using artificial electron donors and electron acceptors, as well as appropriate inhibitors (21).





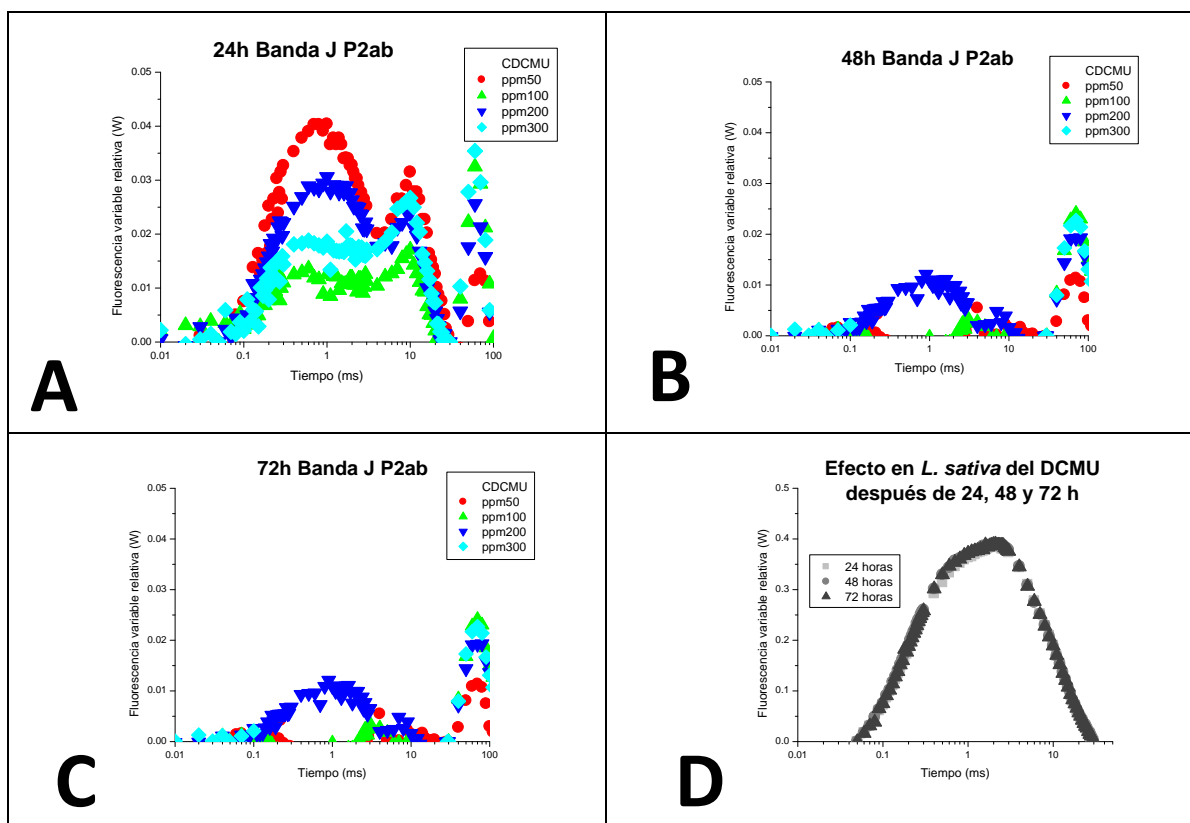
**Figure 2.** Inhibition of the electron transport chain of isolated spinach chloroplasts measured as basal (9), (■), phoshorylating (b), (●) and uncoupled (2) (▲) electron flow, from water to MV as a function of increasing concentrations of capsanthin. The control value rates were 600, 1401, and 1734 equiv  $e^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$ , respectively.

Measure of Chl *a* fluorescence transient on *P. ixocarpa*, *L. sativa*, *T. aestivum* and *L. perenne* plants leaves treated with capsanthin. The polarographic results indicate that

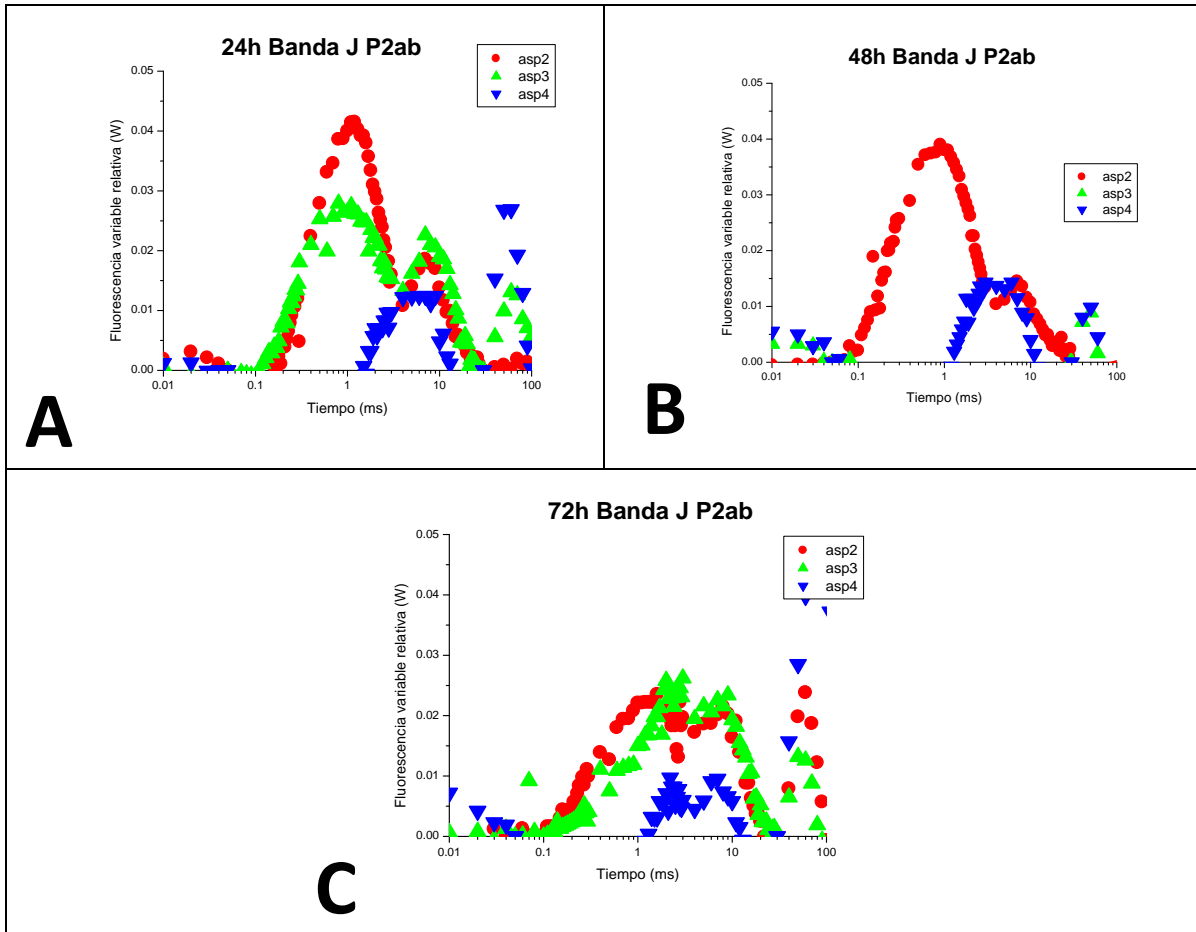
recinine act as Hill reaction inhibitor; in order to study the site of interaction of **1**, fluorescence of chlorophyll *a* of PS II was used, it gave an OJIP trace which indicate the precise time in which the alkaloid and carotenoid interact with PSII, therefore, the fluorescence of chlorophyll *a* were measured on freshly lysed spinach chloroplasts incubated for 5 min in the dark at room temperature. Control chloroplast contained the amount of DMSO used for each treatment, the treated chloroplasts contained various concentrations of the compounds (each concentration was measured three times); chloroplasts incubated with Tris and 10  $\mu$ M DCMU were used as positive.

Chlorophyll *a* fluorescence is an intrinsic evidence of the photosynthetic system. The fluorescence transients, exhibited by photosynthetic organisms under different conditions, can be analyzed to provide detailed information about the structure, conformation and function of the photosynthetic apparatus and especially of photosystem II, by the analysis of the fast polyphasic fluorescence kinetics O-J-I-P, labeled in the literature as 'JIP test' [18,23]. To further characterize the mechanism of action of the compound as a potential growth inhibitor, and could have effect on chlorophyll *a* fluorescence, they were sprayed from 0 to 200  $\mu$ M on *P. ixocarpa*, *Lactuca sativa* and *L. perenne* plants leaves. The chlorophyll *a* fluorescence was measured on plants leaves 24, 48 and 72 h after being sprayed with the compounds. Capsanthin showed effects on *Lactuca sativa*, (Table 1), at 50  $\mu$ M, 24 h, appeared band K and J; and in *L. perenne* appeared bands K and G; and at 100 y 200  $\mu$ M sprayed after 24 h appear only band G in *L. perenne*. And after 48 h being sprayed appears band J at 50 and **1**, 200  $\mu$ M appear band G in *Lactuca sativa*; further at 50  $\mu$ M, after 48 h of treatment appears band G in *Lolium perenne*. Finally at 72 h appears bands K and G 50  $\mu$ M in *Lactuca sativa*, and band G in *Lolium perenne*. With 100  $\mu$ M appears band G in *Lactuca sativa* and *Lolium perenne*, and with 200  $\mu$ M was sprayed appears band J in *Lactuca sativa* leaves. From the OJIP transients the following measured parameters were analyzed according to the JIP test [18]: fluorescence intensity level ( $F_0$ ) when plastoquinone electron acceptor pool ( $Q_A$ ) is fully oxidized and fluorescence level when  $Q_A$  is transiently fully reduced ( $F_M$ ).  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$  ( $F_J$ ), and  $F_5$  are fluorescence intensity levels at different times (0.05, 0.1, 0.3, 2 and 30 ms, respectively). Parameter "area" is the area over the curve between  $F_0$  and  $F_M$ , and relates the pool size of PS II electron transport acceptors [24]. From the measured parameters above mentioned other derived parameters were

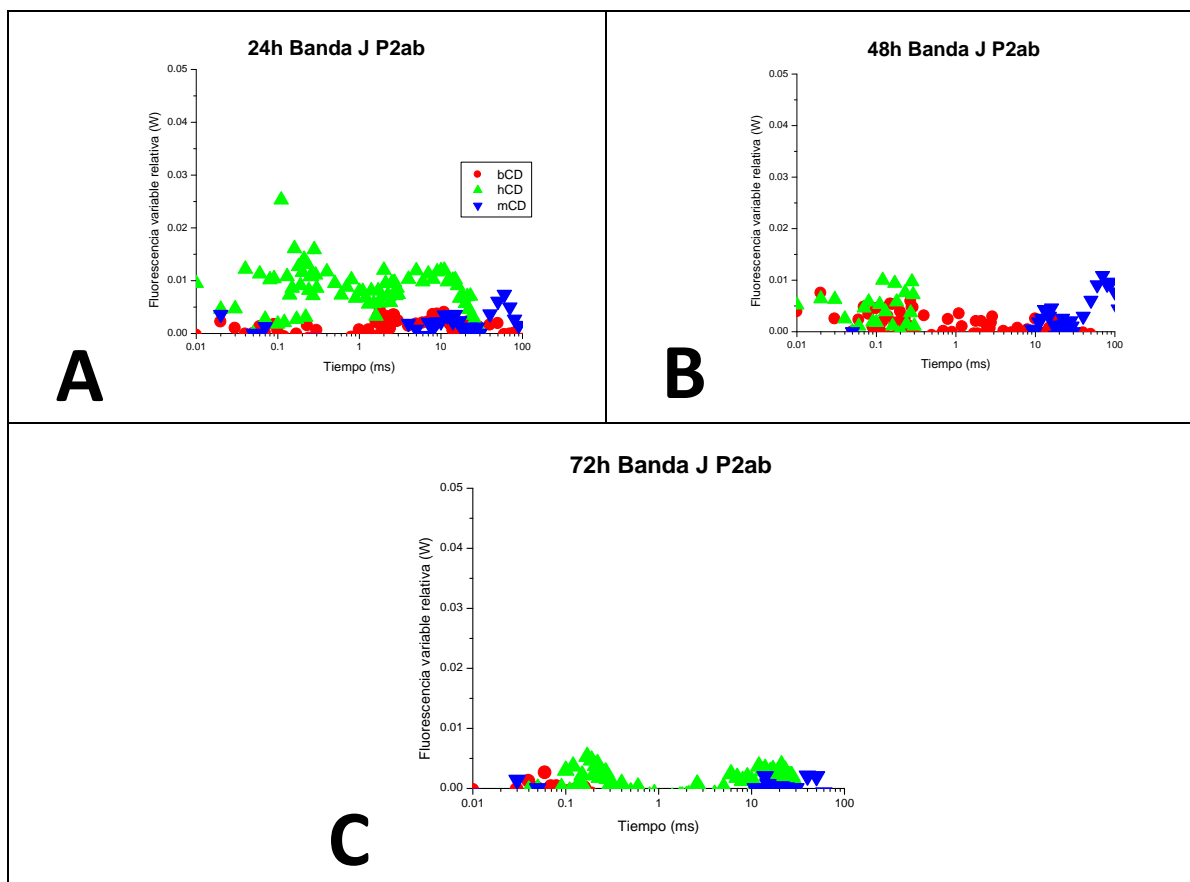
calculated (Table 4) with the program Biolyzer HP3 (from Laboratory University of Geneva; available at (<http://www.unige.ch/sciences/biologie/bioen>)).



**Figure 3. Effect *in vivo* on Chlorophyll a fluorescence of *L. sativa* with one dosis from capsanthin extract isolated from paprika with different concentrations. Effect on acceptor side of PSII (J Band on 2 ms), measured to 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) after dosis of capsanthin. Positive control was a comercial herbicide DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl urea) (D).**



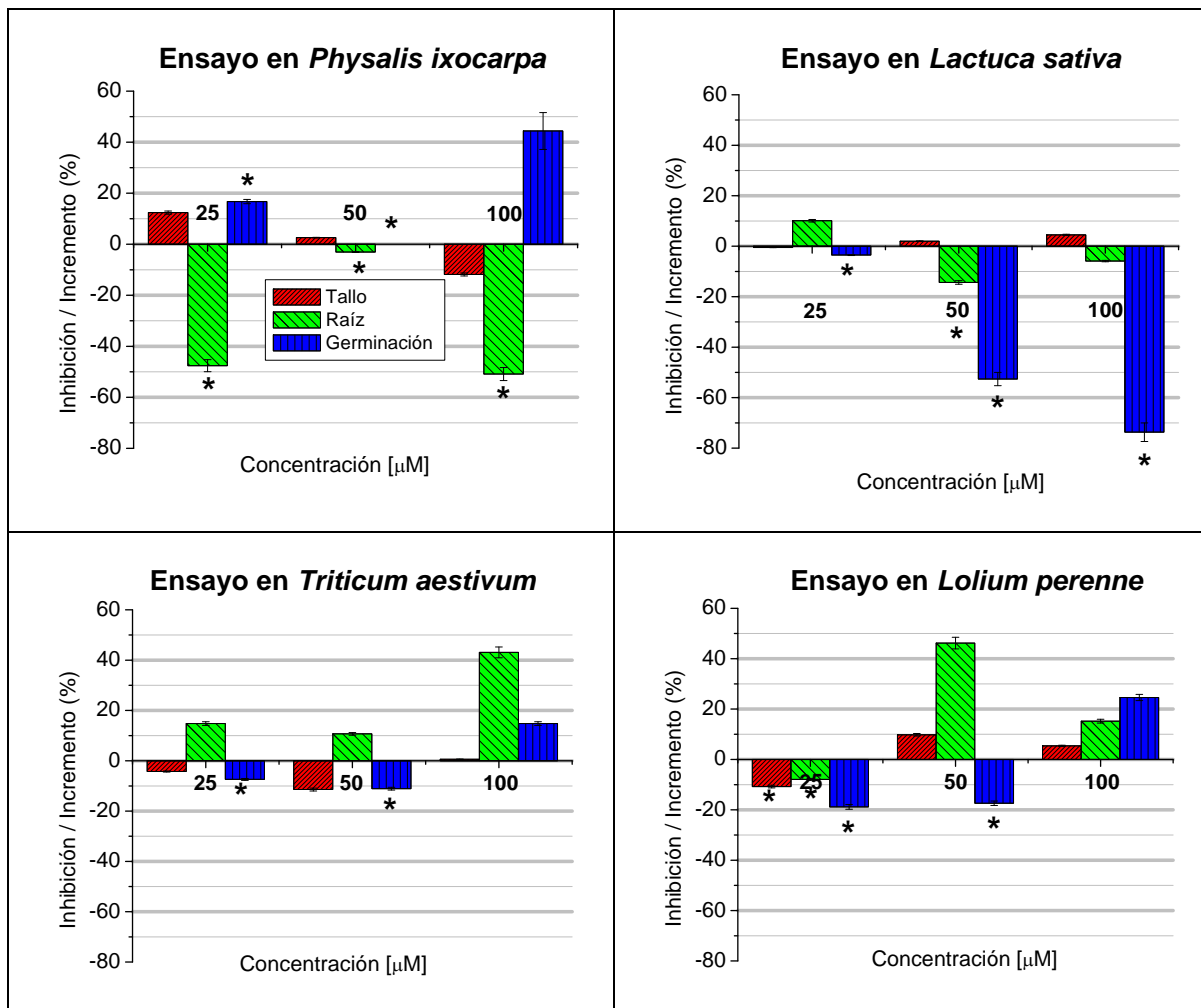
**Figure 4. Effecto *in vivo* on Chlorophyll a fluorescence of *L. sativa* using 2, 3 and 4 dosis from capsanthin extract isolated from paprika with 200 ppm. It was showed the effect on aceptor side from PSII (J Band on 2 ms) mesured to 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C) after the last dosis.**



**Figure 5.** Effect *in vivo* on Chlorophyll a fluorescence of *L. sativa* with one dosis of capsanthin extract isolated from paprika with 200 ppm, using adyuvants. Effect was showed on acceptor side of PSII (J Band on 2 ms) measured to 24 h (A), 48 h (B), and 72 h (C) after the dosis using  $\beta$ -cyclodextrine (bCD), hidroxy- $\beta$ -cyclodextrine (hCD) and methyl- $\beta$ -cyclodextrine (mCD).

**Pre-emergence bio-assay effect on seed germination and seedling growth.** Capsantine inhibited seed germination of *Physalis ixocarpa*, *L. perene*, *Lactuca sativa*, and *T. aestivum*, in a dose-dependent pattern (Figure 3).





**Figure 6. Germination assay of capsanthin.** Capsanthin effect on germination (■), shoot elongation (■) and root elongation (■) in dycotyledon plants (*Physalis ixocarpa* [tomato] and *Lactuca sativa* var. Paris Island Cos [lettuce]) and in monocotyledon plants (*Triticum aestivum* [wheat] y *Lolium perenne* [grass]). \* shows significant difference values comparing versus control, ANOVA two ways ( $p < 0.05$ ),  $n = 120$

*L. sativa*, *P. ixocarpa* and *T. aestivum* were the most sensitive species since germination were inhibited with 100 and 200  $\mu$ M by 30 - 90 % on *L. sativa*, 40 % on *P. ixocarpa* and 20 % *T. aestivum* plants. Figure 3 illustrates the inhibition of root length on *L. sativa* by 10 % seedlings produced by capsantine, but the same concentration enhanced shoot elongation on *P. ixocarpa*, (60 %), *T. aestivum*, (30 %), and *L. perenne* (20 %) and on *L. sativa* (15 %), The results indicate that capsanthin is specific for dicotyledonous plants by inhibiting germination, and elongation of root. However in a monocotyledonous plant have not

significant effect. Therefore, recinineact as a pre-emergent herbicide specific for dicotyledonous plants at concentrations from 15 to 200  $\mu\text{M}$ .

Table 1. Effect of capsanthin sprayed to a mono- and di- dicotiledonous plants after 24, 48 and 72 hs.

	<i>Lactuca sativa</i>			<i>Lolium perenne</i>		
Banda / Tiempo	K (0.3 ms)	J (3 ms)	G (100 ms)	K (0.3 ms)	J (3 ms)	G (100 ms)
24 h	- (50 $\mu\text{M}$ )	+	-	+	-	+
	- (100 $\mu\text{M}$ )	-	-	-	-	+
	-(200 $\mu\text{M}$ )	-	-	-	-	+
48 h	- (50 $\mu\text{M}$ )	+	+	-	-	+
	- (100 $\mu\text{M}$ )	-	+	-	-	-
	-(200 $\mu\text{M}$ )	+	-	-	-	-
72 h	+ (50 $\mu\text{M}$ )	-	+	-	-	+
	- (100 $\mu\text{M}$ )	-	+	-	-	+
	-(200 $\mu\text{M}$ )	+	-	-	-	-

**Biomass production.** The biomass production was estimated by measuring the dry weight of *P. ixocarpa*, *L. sativum* and *L. perenne* plants harvested after 14 days of application of the different compounds and compared with dry weight of plants treated with complexes of 50 IM DCMU and cyclodextrines. On *P. ixocarpa* plants, the total dry biomass decreased in concentration depending manner to 55% at 200  $\mu\text{M}$  of capsanthin; in plants treated with 300  $\mu\text{M}$ , this parameter decreased in 30 biomass of plants treated with 50  $\mu\text{M}$  DCMU decreased in 28%. The dry weight of *L. sativum* decreased with 50  $\mu\text{M}$  of complexes, dry biomass decreased 39%, 40% and 37%. In contrast, *L. perene* plants were not affected by any of the comp, except for DCMU complexes (data not showed), indicating that complexes only affected the dicotyledonous plants

**Table 2. Dry biomass of *Lactuca sativa* using capsanthin extract isolated from paprika.** NA: not applied. DCMU: comercial herbicide. CDs: adyuvants tested on laboratory, cyclodextrins.

COMPOUND	CONCENTRATION	<i>Lactuca sativa</i>	
		BIOMASS $\pm$ d.e.	ACTIVITY
Control -	NA	0.9870 $\pm$ 0.0491 g	100%
Control + (DCMU)	50 $\mu$ M	0.5197 $\pm$ 0.1558 g	52.65%
Capsanthin extract	50 ppm	0.9933 $\pm$ 0.0422 g	100.63%
	100 ppm	0.8515 $\pm$ 0.3157 g	86.27%
	200 ppm	0.9180 $\pm$ 0.2220 g	93.01%
	300 ppm	0.9404 $\pm$ 0.0524 g	95.28%
Capsanthin extract using more than one dosis	200 ppm 2dosis	1.0178 $\pm$ 0.1511 g	106.32%
	200 ppm 3dosis	1.0220 $\pm$ 0.3302 g	122.00%
	200 ppm 4dosis	0.7330 $\pm$ 0.0593 g	86.09%
Capsanthin extract using CDs	200 ppm betaCD	0.5574 $\pm$ 0.0688 g	75.50%
	200 ppm hidroxyCD	0.8488 $\pm$ 0.0942 g	99.84%
	200 ppm methylCD	1.1962 $\pm$ 0.1992 g	88.05%

**Acknowledgments.** The authors thank the financia support of the DGAPA-UNAM IT102012-3 and Valeria acknowledges the fellowship Awarded by CONACyT México.

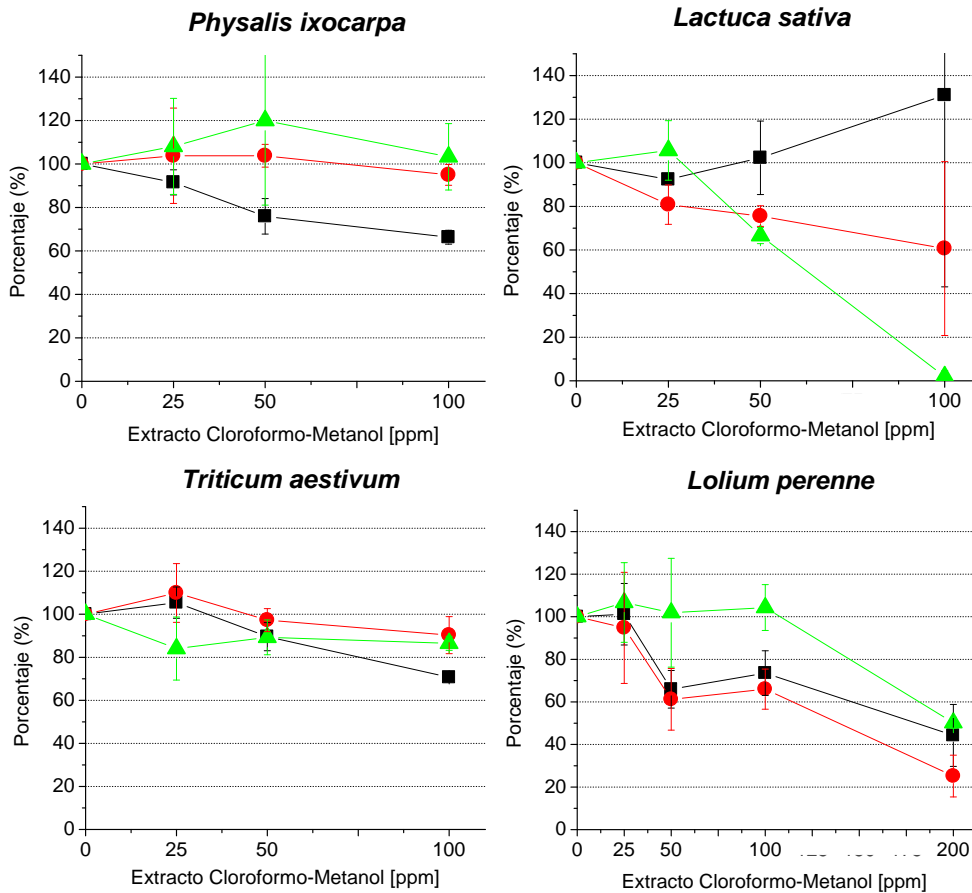
## References

1. (CONABIO, 2009. Euphorbiaaceae *Ricinus communis* L.
2. Manpreet *et al.*, 2009. *Ricinus communis* L. Review. International Journal of PharmTech Research 4:4 1706-1711.
3. Qin-Gang *et al.*, 2009. Three terpenoids and a Tocopherol-Related Compuond from *Ricinus communis* L. Verlag Helvetica Chimica Acta AG 92 2762-2768.).
4. Sitton D y West CA., 1975. Casbene: an anti-fungal diterpene produced in cell-free extracts or *Ricinus communis* seedlings. Phytochemistry. Vol. 14. Pp. 1921-1925.
5. Pradeep PS, Ambika, SMS Chauhan., 2008. Activity guided isolation of antioxidants from leaves of *Ricinus communis* L. Food Chemistry. Vol. 114. Pp. 1069-1072.; Manpreet *et al.*, 2009. *Ricinus communis* L. Review. International Journal of PharmTech Research 4:4 1706-1711.

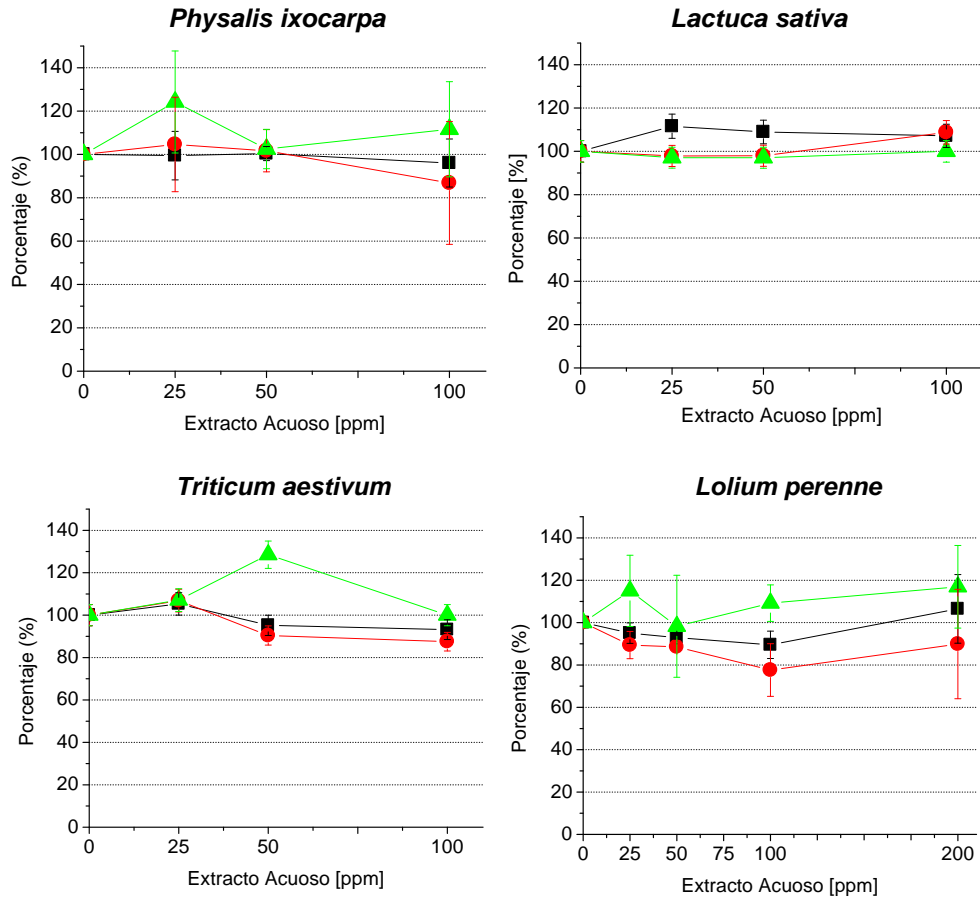
6. Jena, J. y Gupta AK., 2012. *Ricinus communis* Linn: a phytopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and PharmaceuticakSciencies*. Vol. 4 Issue 4. Pp.25-29.
7. Acharya C y Khan NA., 2013. A triterpenoidsaponin from the sedes of *Riinuscommunis* and its antimicrobial activity. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. 49. No. 1. Pp.54-57.).
8. (Lotina-Hennsen, B.; King-Diaz, B.; Aguilar, I.; Hernandez- Terrones, M. G. Plant secondary metabolites. Targets and mechanisms of allelopathy. In *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*; Reigosa, M. J., Pedrol, N., Gonzalez, L., Eds.; Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, 2005; p 37.).
9. (Strasser, R. J.; Srivastava, A.; Govindjee. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cianobacteria. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *66*, 32-45.
10. Christensen, M. G.; Teicher, H. B.; Streibig, J. C. Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening. *Pest Manage. Sci.* **2003**, *59*, 1303-1310.).
11. Strasser, R. J.; Stirbet, A. D. Estimation of the energetic connectivity of PSII centers in plants using the fluorescence rise O-JI-P; fitting of experimental data to three different PSII models. *Math. Comput. Simul.* **2001**, *56*, 451-461.).
12. R. J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, Analysis of the chlorophyll *a* Fluorescence transient, in: G. C. Papageorgion, Govindjee (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2004, pp. 321-362 (Chapter12).].
13. R. J. Strasser, A. Srivastava, Govindjee, Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transients in plants and cyanobacteria, *Photochem. Photobiol.* *61* (1995) 32-42.].
14. Johnson et al., 2005 *Journal of Analytical Toxicology* *29* 149-155.
15. Muhammad Rizwan-Ul-Haq et al., 2010 Impact of two medicinal plant extracts on glutathione *s*-transferase activity in the body tissues of *Spodopteraexigua* (Lepidoptera: noctuidae) *Pak. J. Bot* *42* (6) 3971-3979.
16. Sabina WanguiWachira et al., 2014 Toxicity of 6 plantas extracts and 2 pyridone alkaloids from *Ricinuscommunis* against the malaria vector *Anopheles gambiae* *Paratsites and Vectors* *7* 312-320.).

17. M. González-Ibarra, N. Farfán, C. Trejo, S. Uribe, B. Lotina-Hennsen, Selective herbicide activity of 2,5-di(benzylamine)-p-benzoquinone against the monocot weed *Echinochloa crus galli*. An in vivo analysis of photosynthesis and growth, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3415 - 3420.
18. B. J. Strasser, R. J. Strasser, Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test, in: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1995, pp. 977-980.
19. R. J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, Analysis of the chlorophyll a Fluorescence transient, in: G. C. Papageorgion, Govindjee (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2004, pp.321- 362 (Chapter12).

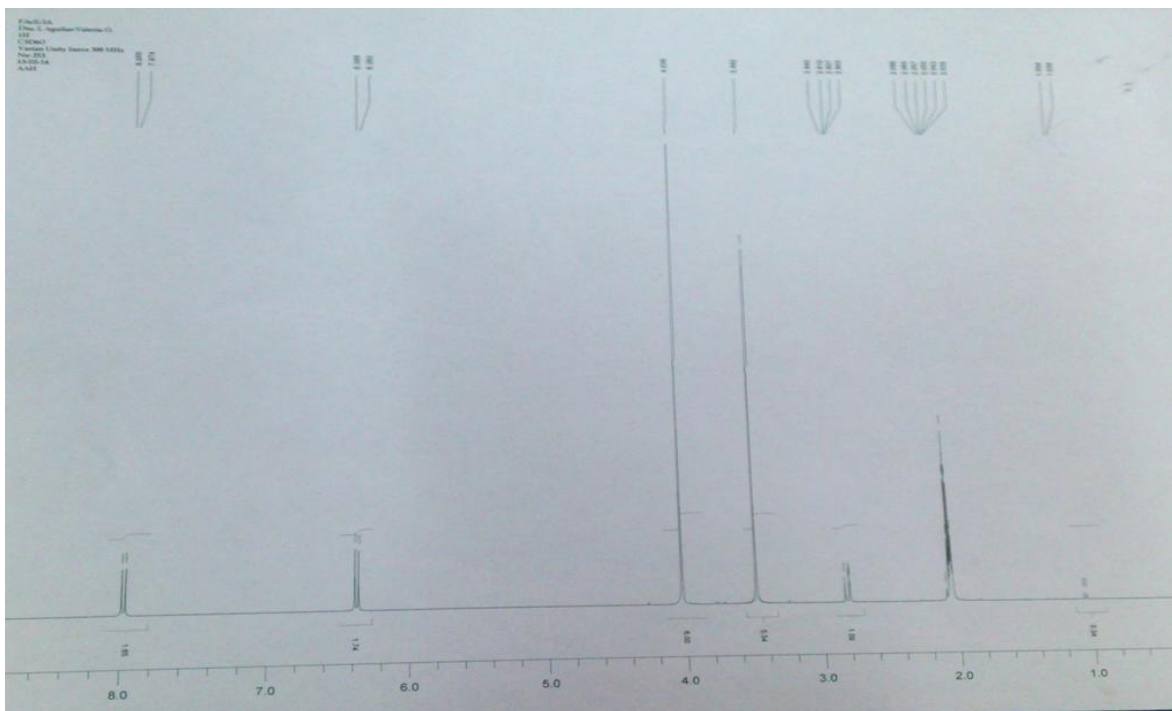
**A4. 3 Propuesta 3: Resultados obtenidos de la evaluación del efecto herbicida de dos alcaloides (recinina y N-demetil-recinina) aislados de *Ricinus communis* L.**



**Figura A4.3.1. Ensayo de germinación del extracto Cloroformo-Metanol obtenido de *Ricinus communis* L.** Se muestran resultados evaluados en plantas dicotiledóneas (*Physalis ixocarpa* tomate y *Lactuca sativa* lechuga) y en plantas monocotiledóneas (*Triticum aestivum* trigo y *Lolium perenne* pasto). ■ Elongación de tallo, ● Elongación de raíz y ▲ Germinación.



**Figura A4.3.2. Ensayo de germinación del extracto Acuoso obtenido de *R. communis* L.** Se muestran resultados evaluados en plantas dicotiledóneas (*Physalis ixocarpa* tomate y *Lactuca sativa* lechuga) y en plantas monocotiledóneas (*Triticum aestivum* trigo y *Lolium perenne* pasto). ■ Elongación de tallo, ● Elongación de raíz y ▲ Germinación.



**Figura A4.3.3. Resonancia Magnética Nuclear Protónica del metabolito aislado FAcE-3A1 (resinina).**



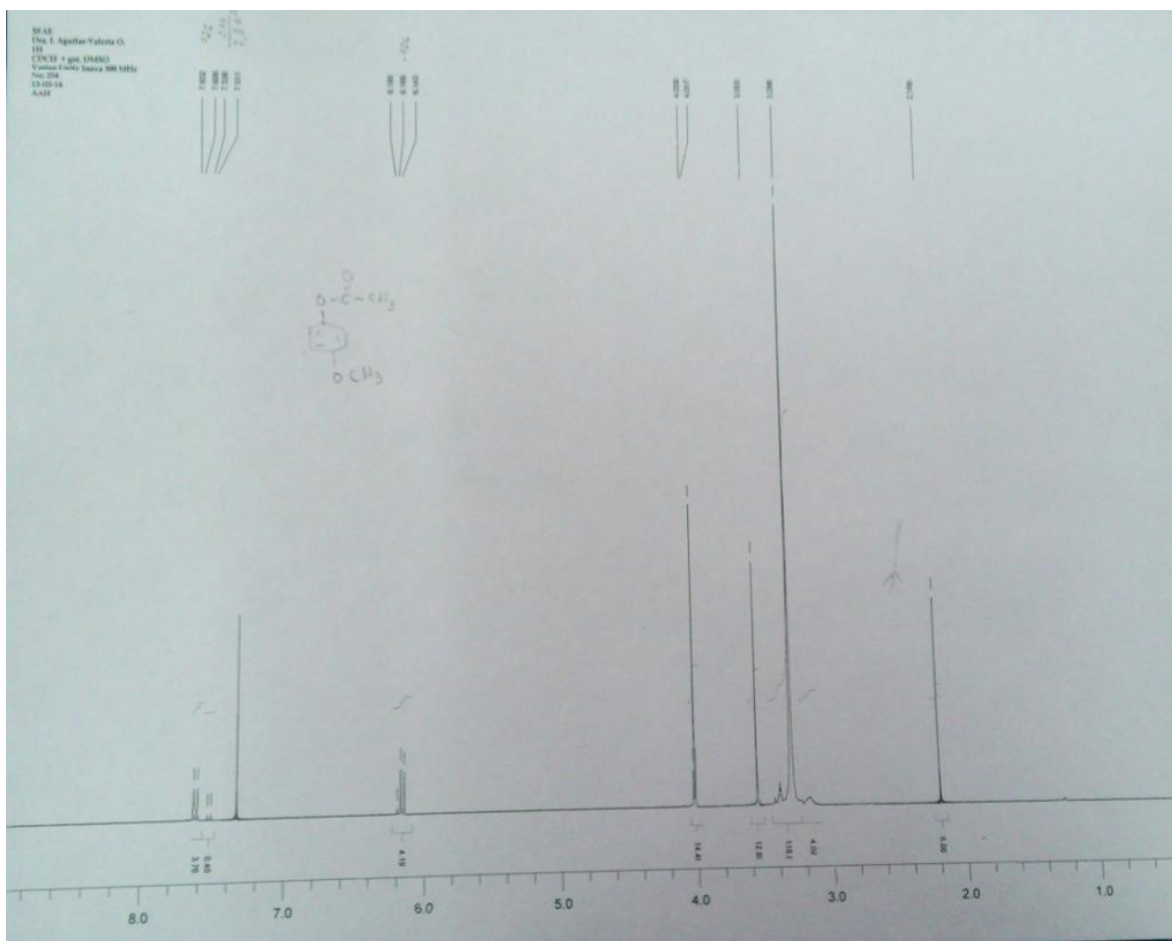


Figura A4.3.4. Resonancia Magnética Nuclear Protónica del metabolito aislado SFAE (N-demetil-recinina).

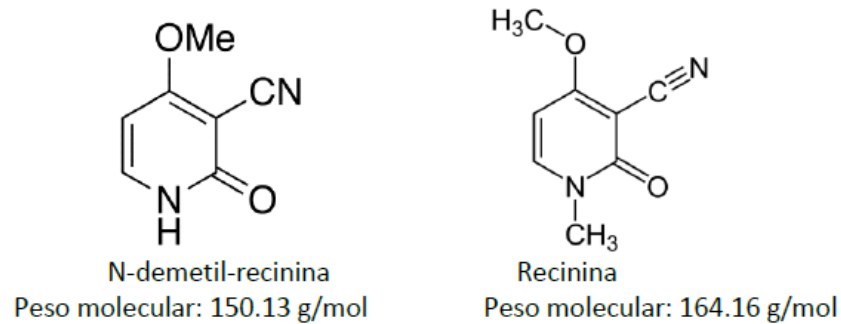


Figura A4.3.5. Estructuras químicas de la N-demetilrecinina y de la Recinina.

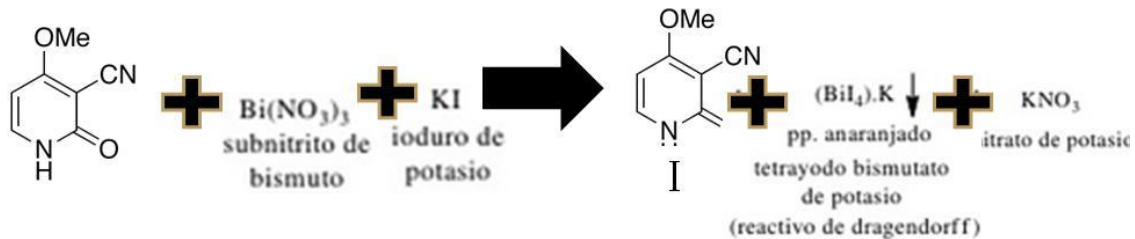


Figura A4.3.6. Reacción de Dragendorff, prueba para alcaloides.

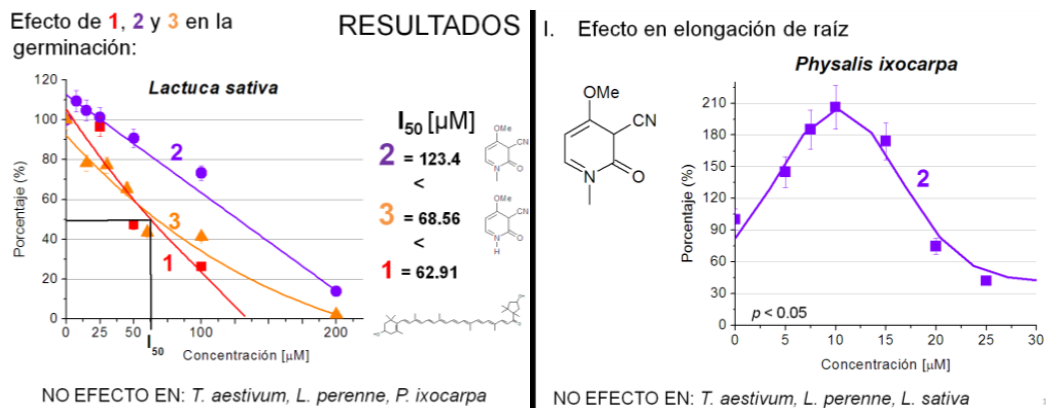


Figura A4.3.7. Ensayo de germinación (izquierda) y ensayo de elongación de raíz de recinina (derecha).

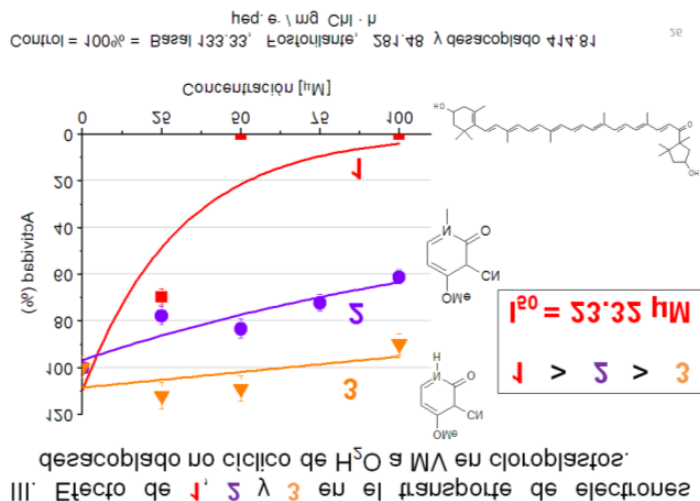
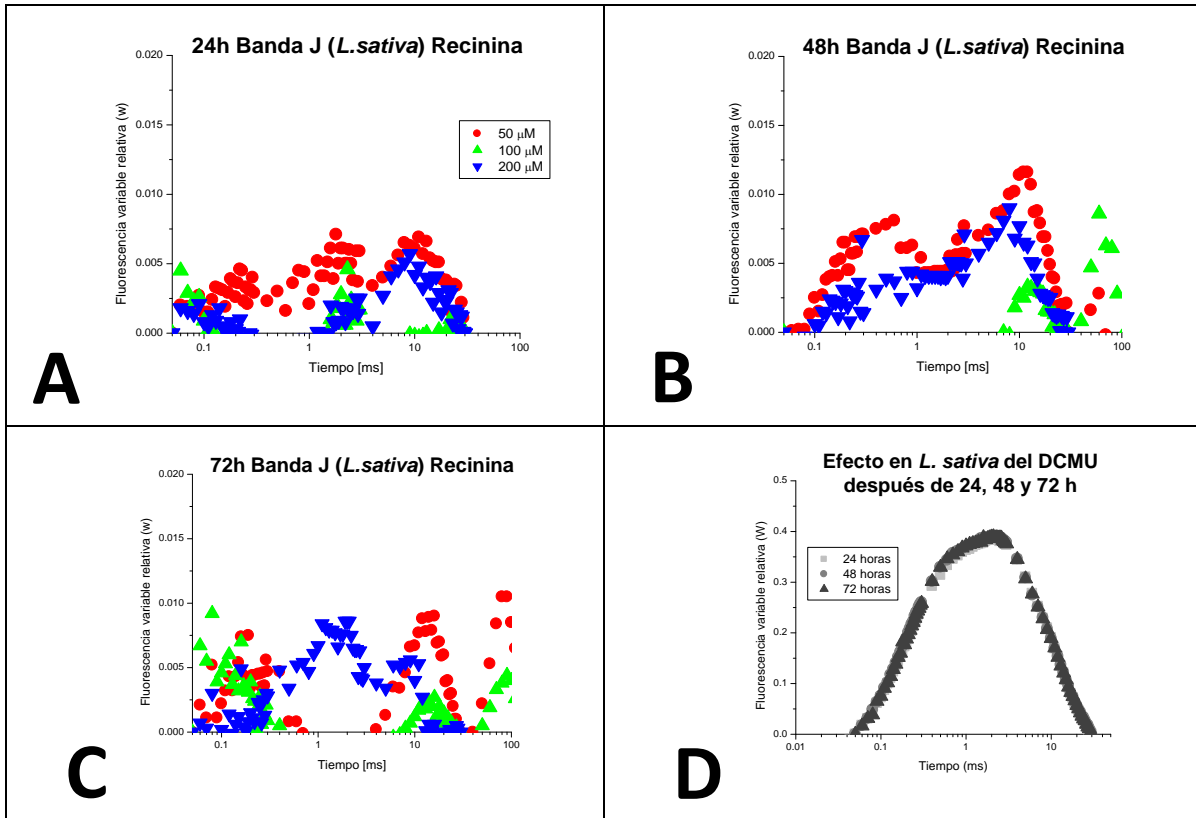


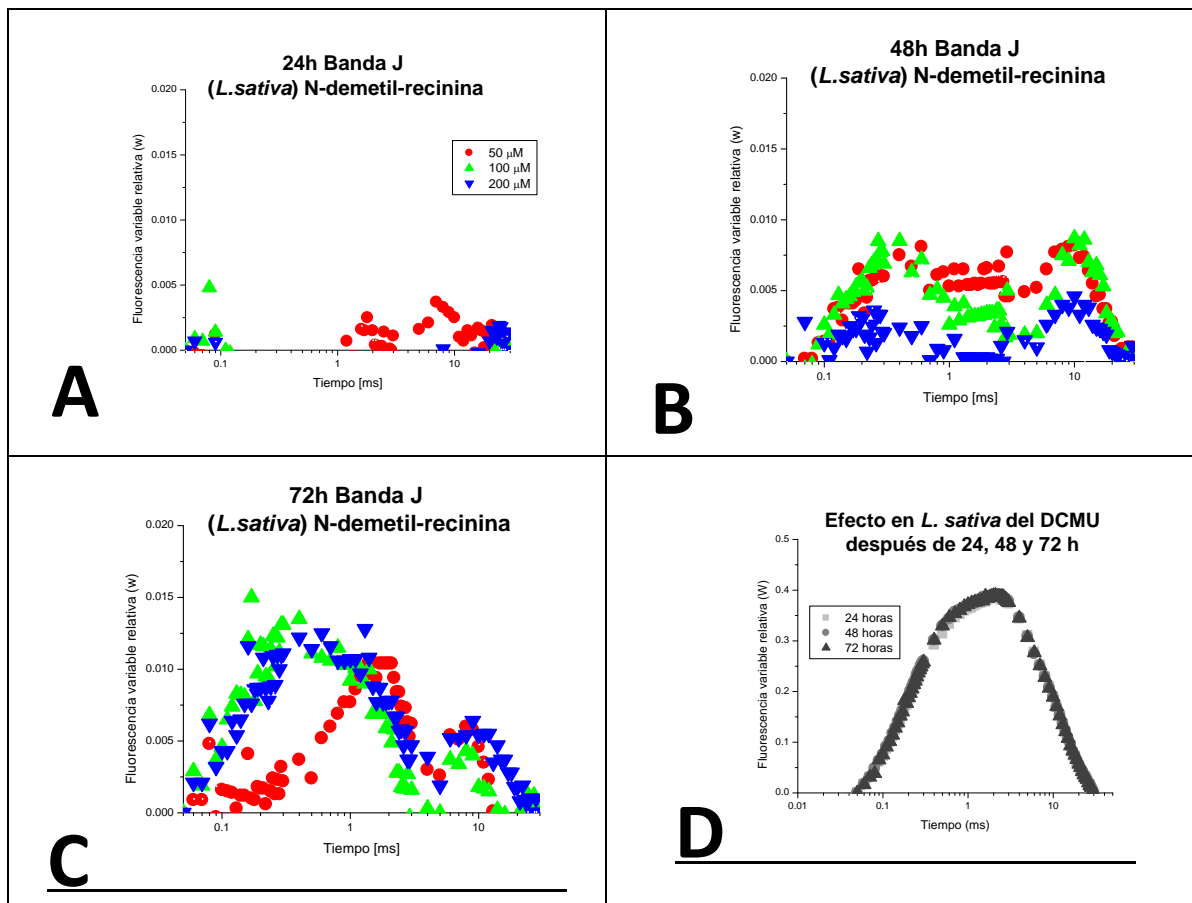
Figura A4.3.8. Efecto de 1 (capsantina), 2 (recinina) y 3 (N-demetil-recinina) sobre el transporte de electrones no cíclico fotosintético.



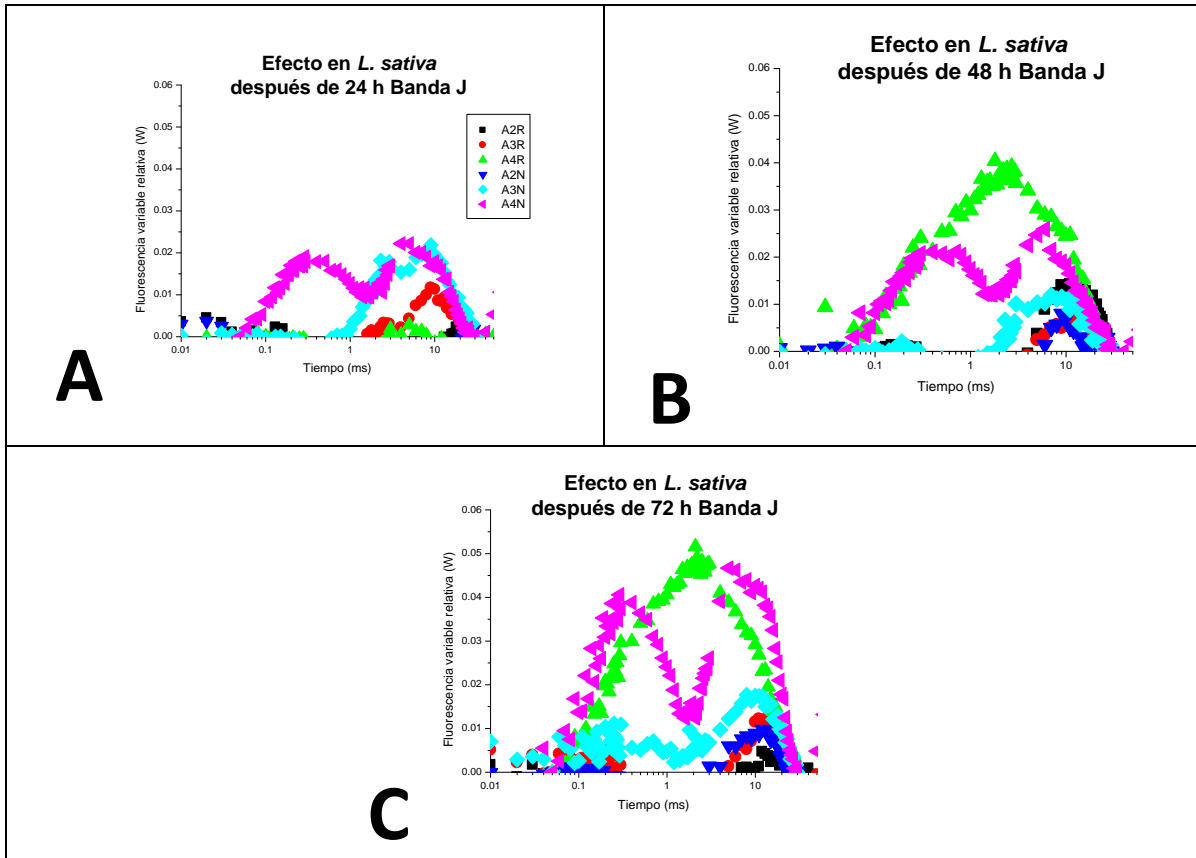
Figura A4.3.9. Efecto de Recinina (R) y N-demetil-recinina (N) sobre *Lactuca sativa* usando diferente número de aspersiones (A) a 200 μM.



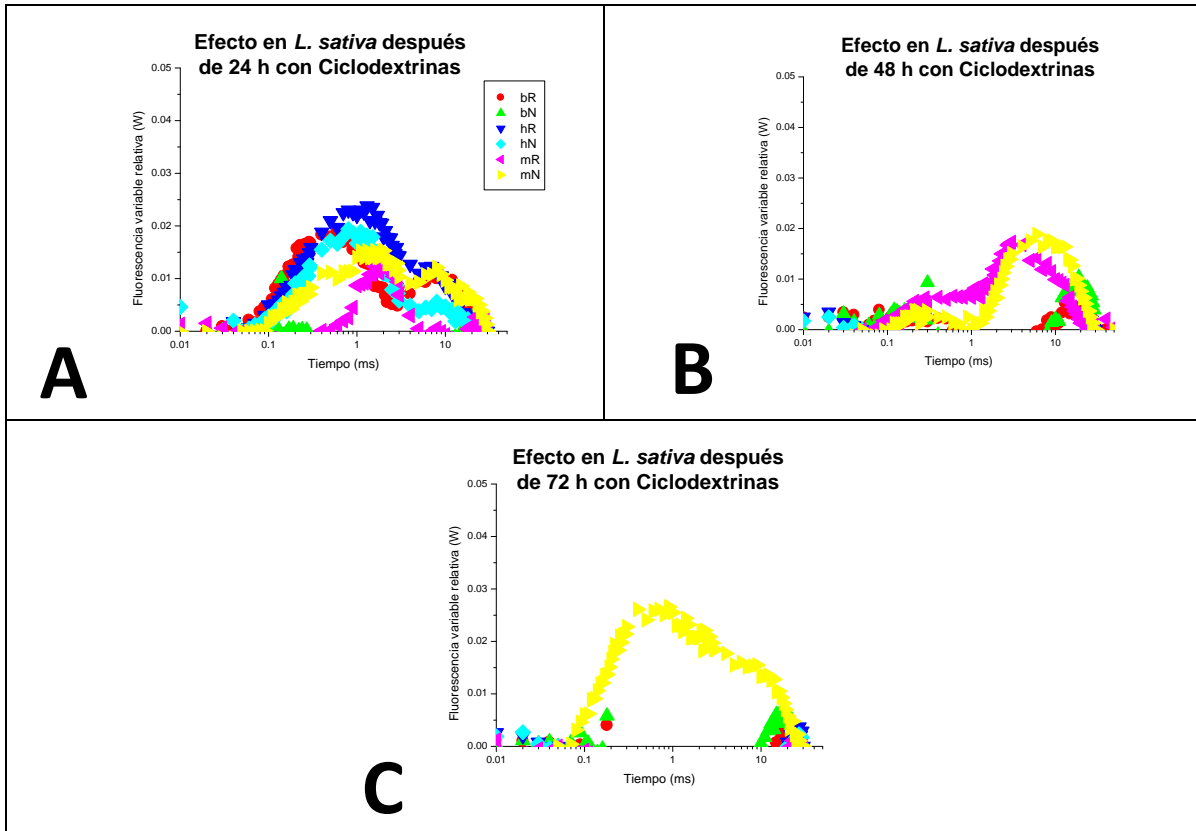
**Figura A4.3. 10. Efecto *in vivo* sobre la fluorescencia de la clorofila *a* con una aspersión de la RECININA a diferentes concentraciones.** Se muestra el efecto sobre el lado aceptor de electrones del fotosistema II (Banda J que aparece alrededor de 2 ms) medido a las 24 (A), 48 (B), y 72 (C) horas después de la aspersión y se utilizó como control positivo un herbicida comercial DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea) (D).



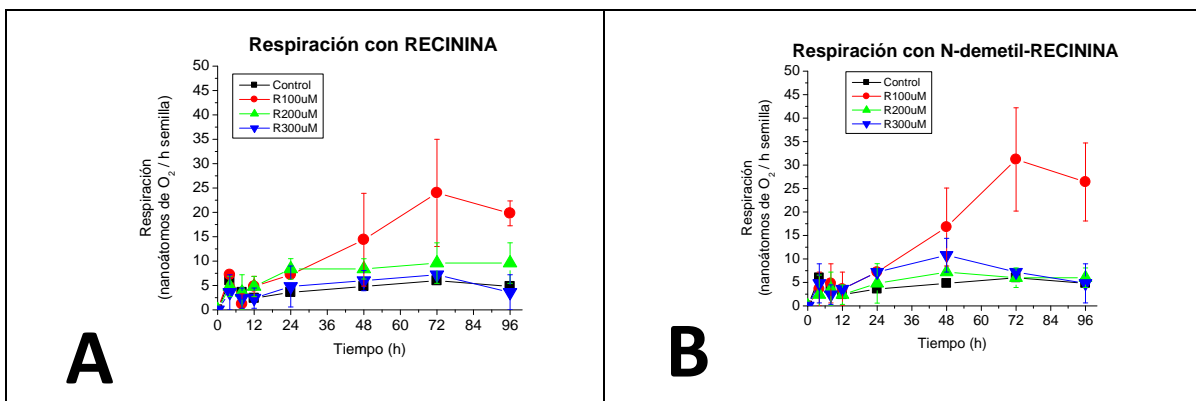
**Figura A4.3.11.** Efecto *in vivo* sobre la fluorescencia de la clorofila *a* con una aspersión de la *N*-DEMETIL-RECININA a diferentes concentraciones. 24 (A), 48 (B), y 72 (C) horas después de la aspersión y se utilizó como control positivo un herbicida comercial DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil urea) (D).



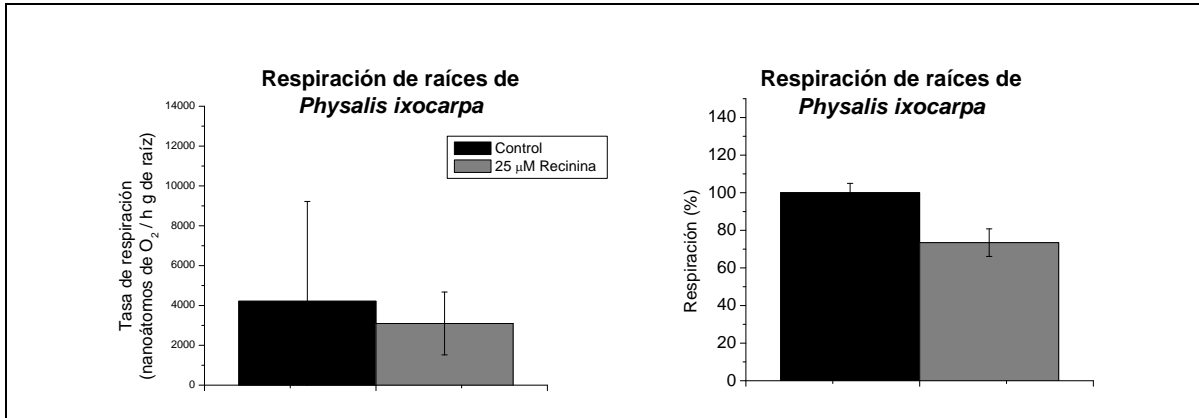
**Figura A4.3.12.** Efecto *in vivo* sobre la fluorescencia de la clorofila *a* con 2, 3 y 4 aspersiones de la RECININA y la *N*-DEMETIL-RECININA a 200  $\mu$ M. Se muestra el efecto sobre el lado aceptor de electrones del fotosistema II (Banda J que aparece alrededor de 2 ms) medido a las 24 (A), 48 (B), y 72 (C) horas después de la última aspersión.



**Figura A4.3.13. Efecto *in vivo* sobre la fluorescencia de la clorofila *a* con una aspersión de la RECININA (R) y *N*-DEMETIL-RECININA (N) a 200  $\mu$ M, utilizando adyuvantes. Se muestra el efecto sobre el lado aceptor de electrones del fotosistema II (Banda J que aparece alrededor de 2 ms) medido a las 24 (A), 48 (B), y 72 (C) horas después de la aspersión utilizando  $\beta$ -ciclodextrina (b), hidroxi- $\beta$ -ciclodextrina (h) y metil- $\beta$ -ciclodextrina (m).**



**Figura A4.3.14. Efecto de la Recinina (A) y la *N*-demetil recinina (B) sobre la respiración de semillas de *L. sativa* a 100  $\mu$ M.**



**Figura A4.3.15. Efecto de la Rescinina sobre la respiración de raíces de *P. ixocarpa* a 25 μM.**



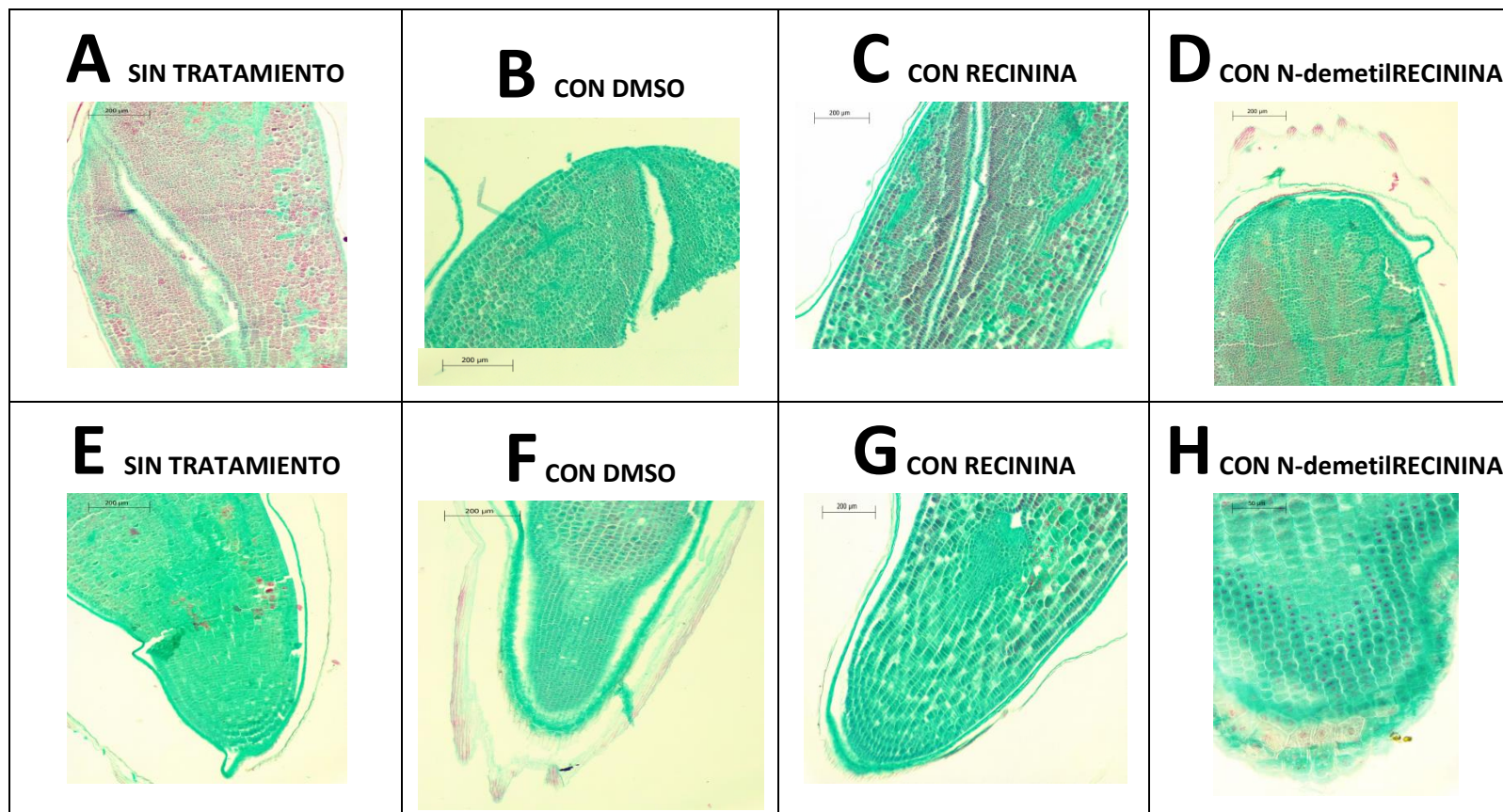


Figura A4.3.16. Observaciones de cotiledones (A, B, C y D) y de las raíces (E, F, G y H) de plántulas de *L. sativa* (con 24 horas de germinación) sin tratamiento, tratadas con DMSO (dimetilsulfoxido, disolvente), tratadas con resinina (a 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ) y tratadas con N-demetilresinina (a 70  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ).

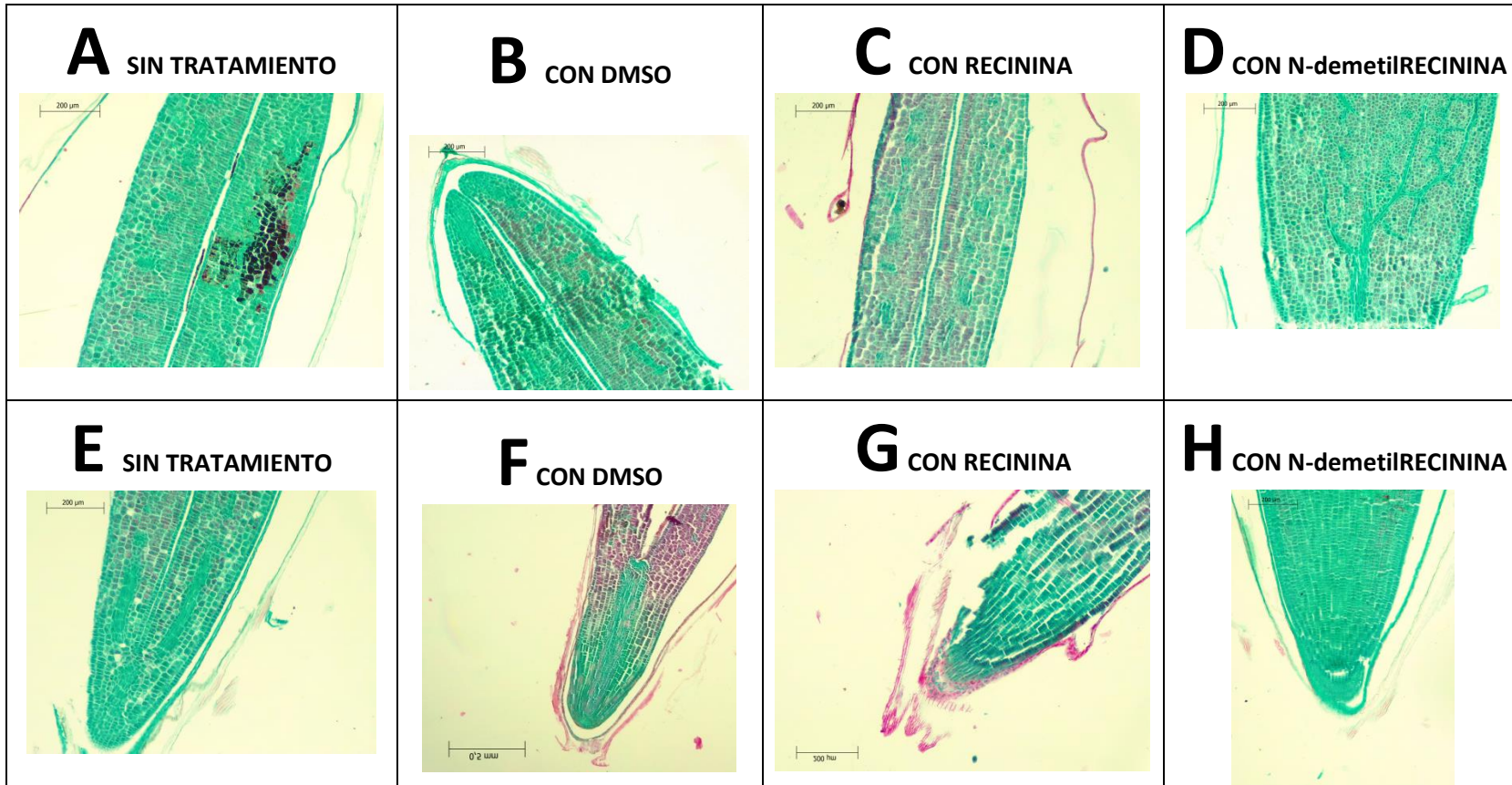


Figura A4.3.17. Observaciones de cotiledones (A, B, C y D) y de las raíces (E, F, G y H) de plántulas de *L. sativa* (con 48 horas de germinación) sin tratamiento, tratadas con DMSO (dimetilsulfoxido, disolvente), tratadas con resinina (a 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ) y tratadas con N-demetilresinina (a 70  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ).

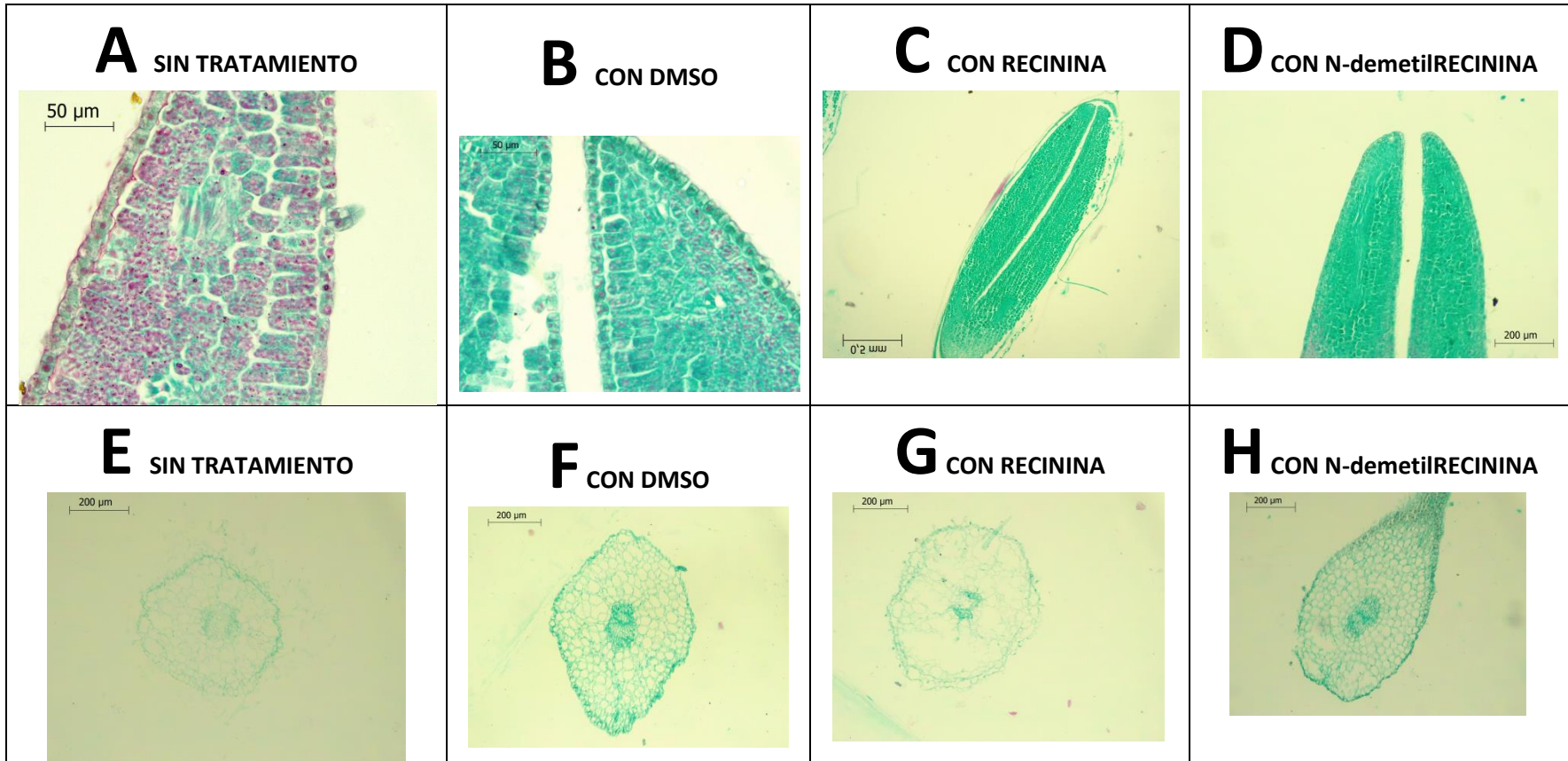


Figura A4.3.18. Observaciones de cotiledones (A, B, C y D) y de las raíces (E, F, G y H) de plántulas de *L. sativa* (con 72 horas de germinación) sin tratamiento, tratadas con DMSO (dimetilsulfoxido, disolvente), tratadas con resinina (a 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ) y tratadas con N-demetilresinina (a 70  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ).